

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

**CONTAMINAÇÃO POR FERRO EM NITOKRA sp.A PARTIR DE ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL**

JOÃO MARCOS SILVA ZOTTELE

Prof. Orientador: Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes

VITÓRIA

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA AMBIENTAL**

**CONTAMINAÇÃO POR FERRO EM NITOKRA sp.A PARTIR DE ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS COMO FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL**

JOÃO MARCOS SILVA ZOTTELE

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo como parte dos requisitos
para obtenção de título de mestre
no Programa de Pós-Graduação
em Oceanografia Ambiental, sob
orientação do Prof. Dr. Luiz
Fernando Loureiro Fernandes.

VITÓRIA

2020

*Ciência sem consciência é senão, a
ruína da própria existência...
François Rabelais.*

PÁGINA DEDICADA AO USO DA BIBLIOTECA

Agradecimentos

A minha mãe, por sempre me apoiar e incentivar, meu amor maior.

A Emme, ao meu lado, me apoiou incondicionalmente, fez meu coração continuar batendo quando pensava em parar, sendo casa, carinho e coração.

Aos meus queridos amigos da Base Oceanográfica da UFES em Aracruz, Taciana, Halysson, Mamaik, Luis Eduardo (Baiano), Jorginho, Filipe, Nelson, Erivaldo, Jéssica, Cybelle, Nínive e Luciano. Vocês foram imprescindíveis. Sintam-se parte fundamental.

Aos meus amigos e professores, essenciais nesta etapa, do muito que sabiam se dedicaram em me trazer luz e perspectivas para desenvolver este trabalho, Gustavo Martins, Baiano, Cybelle, Martina, Kyssyanne, Geandre, Fernanda, Patrick, Sarah, Carol Grilo, Fabian e Ghisolfi. Meu muito obrigado.

Aos meus amigos, Ronie, Rodrigo, Bruno, Geandre, Patrick, João Koppe, Aroldo, Fabio Bom, Mahatma, Gustavo e Sirvino pelas abstrações e risadas.

Ao Adalto, por ter disposto da atenção, tempo e conhecimento neste trabalho.

Ao Cabelo, desde a graduação, por me apontar o caminho da pesquisa e ensino.

Ao Fabian, pelo apoio, conhecimento elementar e por abraçar a proposta.

Ao Ghisolfi, pela perspectiva ímpar e das imprescindíveis cobranças (exageradas).

Ao Jean Joyeux, por ser essa enciclopédia de conhecimento, humildade e disposição.

Ao meu orientador, Luiz, pela visão crítica e verdadeira, apoio fundamental, disposição e desafio de desenvolver a proposta de estudo. Você é o cara.

Aquele que, direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, sintam-se parte integral, você têm meu agradecimento.

RESUMO

Concentrações sub-letais de substâncias tóxicas, estão entre os efeitos mais prejudiciais ao meio ambiente. Organismos-testes são amplamente utilizados como ferramentas chave, para identificação de agentes toxicantes, como forma de compreender a ação danosa aos ecossistemas. Este experimento foi realizado em 45 dias, utilizando a *Nitokra* sp. como organismo-teste, o que possibilitou o entendimento de efeitos prejudiciais em análise geracional e de variação na proporção sexual de copépodes após exposição ao ferro. Os resultados apontaram a diminuição da produtividade e alteração no recrutamento de destes indivíduos na concentração de 0,102 mg L⁻¹. Em concentrações de ferro acima de 0,178 mg L⁻¹ promove uma alteração significativa na proporção sexual de machos e fêmeas com relação controle. Padrões referenciais de lançamento de efluentes são baseados na representação dos efeitos agudos em populações aquáticas, no entanto, concentrações sub-letais, menores que os valores estabelecidos como seguros pelos órgãos de vigilância têm potencial de causar interferência ao desenvolvimento dos organismos.

Palavras-chave: copépodes, metais, teste crônico.

ABSTRACT

Sub-lethal concentrations of toxic substances are among the most harmful effects on the environment. Test organisms are widely used as tools for the identification of toxic agents, as a way to understand a harmful action to ecosystems. This experiment was carried out in 45 days, using a *Nitokra* sp. as a test organism, or that made it possible to understand harmful effects in generational analysis and variation in the sexual proportion of copepods after exposure to iron. The results indicated a decrease in the reproduction and the recruitment of these individuals at a concentration of 0.102 mg L^{-1} . In the case of iron above 0.178 mg L^{-1} , there is a change in the ratio of sexual males per female in almost half of the proportion in the control. Referential patterns of discharge of effluents are shown by a framework of aquatic life effects by acute tests, however, sub-lethal, concentrations lower than the values calculated as safe by the agencies responsible for damages caused by the potential interference and development of organisms.

Keywords: copepods, metals, chronic test.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Preparo das Soluções de Teste	14
4.1.1 Análises Químicas	15
4.2 Cultivo de Organismos Testes.....	16
4.3 Condições Iniciais do Teste	17
4.4 Parâmetros Físico-químicos do Teste	19
4.5 Carta Controle de Sensibilidade.....	19
4.6 Separação dos Organismos Teste	19
4.7 Alimentação dos Organismos Teste.....	20
4.8 Contagem de Organismos.....	22
5 RESULTADOS	26
5.1 Parâmetros Físico-químicos.....	26
5.2 Contagem de Organismos	26
5.2.1 Fêmeas Ovadas	26
5.2.2 Prole	28
5.2.3 Ovos Produzidos e Ovos Fecundados	29
5.2.4 Proporção Sexual	30
6 DISCUSSÕES.....	31
7 CONCLUSÕES	33
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9 ANEXOS.....	41

INTRODUÇÃO

A Ecotoxicologia compreende as interações entre os efeitos físico-químicos e os organismos de um ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Os ensaios ecotoxicológicos são utilizados na avaliação da qualidade ambiental em todo o mundo. Podem ser utilizados para detectar e avaliar a capacidade de um agente tóxico provocar efeito nocivo, utilizando organismos testes dos grandes grupos de uma cadeia ecológica (BRASIL, 2011).

Elementos xenobióticos, quando entram em contato com a água, podem se associar ao material particulado em suspensão preexistente no ambiente, por afinidade eletronegativa através de processos como a adsorção, complexação e precipitação (RAND, 1995). Os compostos metálicos persistem no ambiente principalmente por se associarem ao sedimento e à matéria orgânica (COLES *et al.*, 2012; NOWELL *et al.*, 2013). Estas interações podem desencadear efeitos deletérios de caráter agudo e/ou crônico para as comunidades biológicas de fundo e acumulam-se em concentrações superiores àquelas encontradas na coluna d'água dos ambientes aquáticos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2014).

A contaminação por metais no meio aquático é decorrente de processos industriais (mineração, fundição, acabamento e metalização de metais, fabricação de tintas e corantes) e de tubulações e tanques em sistemas domésticos (RAND, 1995). Alguns metais pesados são poluentes muito agressivos aos ecossistemas aquáticos devido a sua persistência no ambiente, toxicidade e capacidade de bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar (YANG *et al.*, 2014; HATJE *et al.*, 2017).

O despejo de compostos metálicos no ambiente aquático envolvendo metais pesados é extremamente temerário se comparado aos demais tipos de poluição, que, por sua vez, resulta em danos ambientais severos (RAND, 1995). Os metais não são degradáveis, são extremamente tóxicos e cumulativos em organismos vivos por meio da bioacumulação, como consequência por intoxicação promove o envenenamento da biota, ocasionando até mesmo a dizimação de seres vivos (RAMÍREZ *et al.*, 1987). Outros efeitos adversos à biota incluem o decréscimo na abundância de invertebrados bentônicos, aumento da mortalidade e mudanças comportamentais (RAND, 1995).

Os ecossistemas estuarinos apresentam maior vulnerabilidade aos danos de caráter toxicológico, da qual as interações de compostos químicos naturais e artificiais em concentrações anômalas no ambiente causam efeitos deletérios aos organismos. Esses compostos passam a interagir com os componentes abióticos e bióticos do sistema, o que definirá a toxicidade será o resultado dessa interação (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006).

Testes de toxicidade aquática devem ser realizados com organismos testes de espécies ecologicamente representativas e distribuídos no ambiente, geralmente base de cadeia e que possuam alta sensibilidade (RAND; PETROCELLI, 1985). Em linhas gerais, o Brasil possui como referência a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) em suas Normas Brasileiras (NBR), da qual definem, neste seguimento, organismos de fácil reprodução em laboratório e resultados quantificáveis através da análise estatística para realização de ensaios toxicológicos.

Como medida de conservação e minimização dos danos ao ambiente, as agências governamentais e organizações internacionais tem cada vez mais despendido ações e normativas de gestão ambiental e políticas públicas que possam amortecer os impactos da contaminação (HALPERN *et al.*, 2008; GREEN *et al.*, 2014; LE CORNU *et al.*, 2014). No entanto, um fator chave para haver sucesso no desenvolvimento dos ecossistemas em zonas de amortecimento está no fomento e eficiência da legislação e administração jurídica e fiscal por meio de resoluções, decretos e portarias.

O órgão federal brasileiro responsável pela definição de leis que competem ao controle ambiental é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Em março de 2005 foi publicado no Diário Oficial da União (D.O.U) a Resolução nº357, documento que classifica e fornece diretrizes ambientais para a definição dos corpos hídricos, condições, níveis e padrões de lançamento de efluentes no meio aquático. Em 2011, o órgão publicou também através do D.O.U, a normativa nº 430, de modo a substituir e alterar os artigos das resoluções CONAMA357/2005 e 396/2008, no âmbito de concentrações de lançamentos de efluentes em corpos hídricos e para estabelecer critérios de testes de ecotoxicidade.

Países em dimensões continentais como o Brasil, com altos índices de corrupção e desenvolvimento agrário comprometem o sucesso dos ecossistemas costeiros naturais. Como medida de mitigação está o desenvolvimento de metodologias e ferramentas como determinação de áreas de preservação (HALPERN *et al.*, 2008) e de utilização dos recursos sustentáveis (BONNET; DEARDEN, 2014). Para tanto, não se espera resultados diferentes como os de Batista e Edgar (2014) em que apenas 10% das Áreas de Preservação Ambiental (APA) mundiais foram consideradas bem sucedidas.

Diferentes tipos de poluição degradam o ambiente marinho, majoritariamente o lançamento de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado, resíduos fármacos e químicos e em grande escala a lavra da terra por recursos minerais (BATISTA *et al.*, 2014) e estes poluentes são complexados aos outros compostos existentes, quando em contato com a água do mar, potencializando seus efeitos eventualmente tóxicos aos organismos.

A poluição e a contaminação dos oceanos estão diretamente ligadas ao ambiente terrestre, pois todo material continental é carregado pelas chuvas, conduzido pelos rios e se concentram nos oceanos (CRAIN *et al.*, 2009). Tanto o desenvolvimento costeiro como a exploração de recursos naturais e minerais contribuem para o aumento da poluição e do impacto físico-químico nos ambientes marinhos (DAVENPORT; DAVENPORT, 2006).

Os impactos em áreas costeiras, principalmente de ambiente dinâmicos, como os estuários, tem o potencial de comprometem a integridade biológica (MAGRIS *et al.*, 2014) estabilidade econômica (VILLASANTE, 2013) e até a estabilidade climática (HUGHES *et al.*, 2013).

Os ecossistemas marinhos, em maior destaque para as zonas costeiras, têm suportado todo estresse de degradação em função da ocupação urbana e do lançamento contínuo de contaminantes, tanto na escala local quanto em escalas globais (HALPERN *et al.*, 2008; WORM *et al.*, 2006). De fato, os ambientes marinhos sempre proveram subsídio, meios e recursos fundamentais para o desenvolvimento humano intrínseco tanto em vias locais como globais (BURT *et al.*, 2014; POTTS *et al.*, 2014).

O desastre ambiental ocasionado pelo rompimento da barragem de rejeitos de Fundão descarregou toneladas de lama tóxica, no rio Doce promoveu o enriquecimento por ferro, tanto da coluna d'água como no sedimento de fundo na zona costeira norte do Estado do Espírito Santo (UFES, 2016). Este evento foi o ápice de um processo de contaminação decorrente da atividade de mineração desde o século XVIII, onde despejavam resíduos *in natura* no ambiente aquático formando extensas manchas alaranjadas, diferentes da cor barrenta dos períodos de cheia do rio Doce. (SAINT-HILAIRE, 1830).

Historicamente, há aproximações nos estudos envolvendo ambiente marinho utilizando água e sedimento, principalmente sedimentos, pois os processos físicos e químicos no meio aquático podem formar complexos e precipitem os poluentes para o fundo. (POWER; CHAPMAN, 1995; PEREIRA; SOARES, 2002; SERIANI *et al.*, 2006; MAGALHÃES; FERRÃO, 2008). Eventualmente a concentração destes compostos assume uma maior magnitude no sedimento que na coluna d'água (SCHUBAUER-BERIGAN, 1993; WENHOLZ e CRUNKILTON, 1995; INGERSOLL *et al.*, 2003).

Portanto, como peça fundamental, a ecotoxicologia é um campo multidisciplinar da ciência que busca o entendimento dos efeitos adversos de entidades com potencial de causar efeitos deletérios aos organismos vivos (ZAKREWSKI, 1999). Ciência esta fundamentada com metodologias objetivas em função da informação desejada para uma avaliação no ambiente (ABESSA *et al.*, 2008).

Os testes de toxicidade são desenvolvidos em toda parte do mundo para obtenção de resultados coletando amostras (SCHUBAUER-BERIGAN, 1993) onde há uma manipulação das condições controladas para avaliação do composto utilizado nos testes (ANDERSON *et al.*, 2007). São realizados ensaios expondo organismos-teste padronizados em diferentes concentrações de um contaminante ou amostra ambiental, possibilitando uma avaliação da toxicidade conjunta dos constituintes de natureza química complexa, tanto como suas interações (GUERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990; CETESB, 1997; COSTA *et al.*, 2008) podendo levar a uma avaliação no âmbito da toxicidade aguda ou crônica.

A toxicidade aguda é assim definida por envolver um curto período do ciclo de vida dos organismos testados. Neste caso, a toxicidade de substâncias químicas é avaliada em períodos de 24 ou 48h, objetiva a letalidade (FONSECA, 1991). Os testes de caráter crônico têm como objetivo a identificação de efeitos anômalos no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos testes em função do longo tempo de exposição, geralmente por mais de 96h (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Os testes ecotoxicológicos crônicos de efeito sub-letal são separados em três segmentos: Os testes de efeitos bioquímicos e fisiológicos analisam alterações hormonais e respiratórias; testes comportamentais (letargia, alimentação e estresse) e os testes histológicos, que estudam alterações e lesões nos tecidos corporais (RAND e PETROCELLI, 1985). Os testes crônicos são estimados a partir da Maior Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) e da Menor Concentração de Efeito Observado (CEO). O Valor Crônico (VC) é obtido através da média geométrica entre CENO e CEO (ABNT, 2010).

Presumir que a metodologia abordada no estudo toxicológico para organismos de água doce responde com a mesma sensibilidade de espécies marinhas é errôneo (BURGESS *et al.*, 1995).

As concentrações e condições físicas do ambiente podem alterar disponibilidade e absorção de um determinado elemento ou composto pelos organismos. E, futuramente, todos estes compostos estarão disponíveis em sinergia às mudanças climáticas em especial para o aumento da temperatura superficial dos oceanos e alterações no pH (EPA, 1989).

O ferro (Fe) é o sexto elemento mais abundante na crosta terrestre (SILVER, 1993), essencial para o desenvolvimento dos processos metabólicos (WEINBERG, 1989) como fotossíntese, respiração celular e assimilação de nitrogênio (MOREL et al. 1991; FALKOWSKI et al. 1998; MOREL e PRICE 2003). Carreado para os oceanos através dos rios, ao entrar em contato com a água do mar, o ferro reage fortemente com o cloro e o flúor, formando halogenetos, sais férricos e insolúveis (SILVER, 1993).

O ciclo do Fe nos oceanos envolve complexas interações com outros elementos, transformações e especiação química influenciando diretamente os processos de remoção e reciclagem interna (BOYD e ELLWOOD, 2010). As formas de Fe disponíveis e assimiláveis para os processos biológicos estão disponíveis em sua porção dissolvida (RAISWELL e CANFIELD, 2012). A solubilidade do Fe dissolvido aumenta com a presença dos poluentes ácidos (RAVELO-PÉREZ et al., 2016) e da complexação com compostos orgânicos presentes no ambiente marinho (MESKHIDZE et al., 2017).

A baixa solubilidade do Fe com a água do mar (MOFFET e ZIKA, 1987) faz com que as concentrações sejam maiores na região costeira, conseqüentemente, são menores à medida que se afastam da costa (MARTIN et al. 1989). Seus óxidos ferrosos são encontrados nos oceanos na forma de halogenetos em $2,3 \times 10^{-8}$ mol/L ou $1,3 \times 10^{-3}$ mg/L (SCHWOCHAU, 1984) e em sua forma hidratada $[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$ e $[\text{Fe}(\text{OH})_4]^-$ (EVANS, 1979).

Sedimentos contaminados podem atuar como uma fonte de transferência de contaminantes por toda uma teia trófica de um ambiente marinho (CAMARGO et al., 2015) partindo dos organismos bentônicos, em destaque ao grupo dos copépodes, por importância e representatividade, sendo superada apenas pelo grupo dos nematóides (HEIP et al., 1972) no ambiente de meio-fauna e meio-bentos atingindo os demais grupos se estendendo até os predadores de topo (BENGTSSON; BERGSTROM, 1987).

Estima-se que os copépodes sejam a subclasse mais numerosa no ambiente marinho, e que apenas 15% das espécies existentes sejam conhecidas (MAUCLINE, 1998). Divididos em ordens onde, as mais conhecidas e utilizadas em trabalhos, são: Harpacticoida, Calanoida e Cyclopoida. Copépodos da ordem Harpacticoida possuem ampla distribuição no ambiente aquático, predominantemente entre o sedimento de fundo, diferindo das demais ordens que possuem hábito pelágico. (HUYS et al., 1996)

A ordem Harpacticoida, em especial a espécie *Nitokra* sp. se destaca ainda pela tolerância às variações de salinidade entre 7 e 25 g/kg, com um ciclo de vida de aproximadamente 30 dias atingindo a fase de reprodução em 15 dias (LANG et al., 1948). Estes organismos são sensíveis aos estressores xenobióticos, tornando-os uma boa escolha para realização de testes ecotoxicológicos por demonstrar maior sensibilidade que outros organismos, além da facilidade de cultivo e manutenção em laboratório (LOTUFO, 1998; HACK et al., 2008).

A *Nitokra* sp. tem o melhor desenvolvimento e desempenho reprodutivo nas salinidades compreendidas entre 11,5 e 30 g/kg (WULFF *et al.*, 1972) com um valor ideal de salinidade estabilizado em 18,5 g/kg (ABRAHAM; GOPALAN, 1975) sendo esta, a salinidade utilizada como padrão de cultivo em laboratório (CHAPMAN *et al.*, 2007).

O método proposto por Lotufo e Abessa (2002) para análise de sedimentos contaminados utilizando como organismo teste a *Nitokra* sp. tem se mostrado uma ferramenta bastante útil na avaliação do potencial tóxico de compostos e elementos toxicantes. A representação e distribuição deste organismo por todo litoral do continente americano faz dela uma excelente ferramenta de avaliação costeira e estuarina em nível mundial (DAHL *et al.*, 2006; TARKPEA *et al.*, 1986; WERNERSSON *et al.*, 1999) e nacional (NILIN *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2013; KRULL *et al.*, 2014).

O amplo uso da *Nitokra* sp. nos ensaios ecotoxicológicos em diversas partes do mundo faz com que seja uma ferramenta confiável e de referência para testes de qualidade ambiental (BENGTSSON, 1981; LOTUFO e ABESSA, 2000). No entanto, testes crônicos são escassos para elementos individuais, e não encontrados com duração superior a 45 dias onde é possível encontrar estágios de até 03 gerações.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Desenvolver testes de toxicidade crônica para contaminação por ferro utilizando *Nitokra* sp. a fim de indicar efeitos decorrentes da exposição no ambiente marinho

Objetivos específicos:

- 1) Realizar testes de toxicidade crônica para identificar efeitos no desenvolvimento e no potencial reprodutivo de *Nitokra* sp.;
- 2) Avaliar os efeitos do ferro através do teste de toxicidade crônica a partir da concentração definida como limite na CONAMA 357 para águas salobras Classe II e III;

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TESTE

A solução inicial foi preparada dissolvendo cloreto de ferro III ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) da marca Fischer®, com pureza de 95%, em 1000 mL de água Academic Millipore™ (Billerica, MA, USA)(MiliQ®) à concentração inicial de 0,424 mg L⁻¹, correspondente a 100%. Foi utilizado um balão volumétrico de fundo chato para o armazenamento desta solução. Para a realização dos testes, a solução inicial foi diluída em concentrações teóricas de 50, 25 e 12,5% de $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em frascos âmbar de 1000 mL e acondicionados a 23°C e ao abrigo da luz (Fig 1).

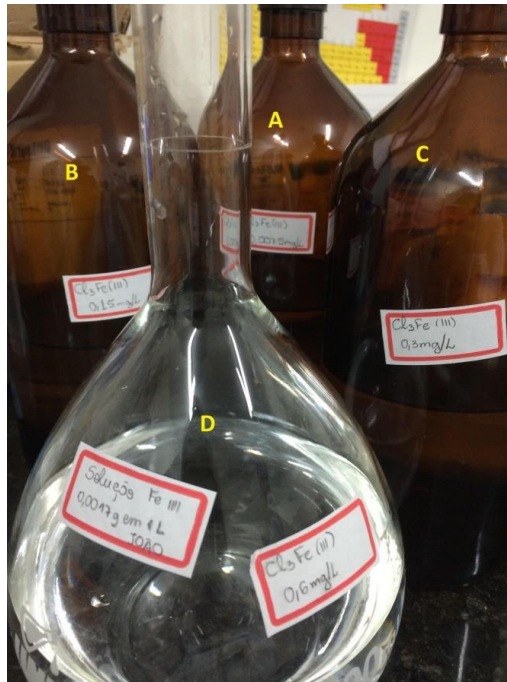


Figura 1- Solução estoque nas concentrações 0,424; 0,178; 0,102 e 0,026 mg/L de Cloreto de Ferro Heptahidratado III ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Para a elaboração das concentrações estipuladas neste estudo, foram acrescentados volumes de água MiliQ® autoclavada em 500 mL, retirados da solução inicial, mantendo a proporção de 50%. Em seguida, o processo foi repetido dividindo 500 mL do volume anterior acrescido de água MiliQ® autoclavada, nas concentrações teóricas de 100, 50, 25 e 12.5%(Fig.2)

Alíquotas de 10 mL das soluções elaboradas foram transferidas para tubos Falcon® estéreis de 15 mL, acidificadas a 1% de seu volume com ácido nítrico (H_2NO_3) e vedadas ao término do procedimento (Fig. 3). Os tubos foram levados à sala de Análise Química do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análise de Petróleos da UFES (LabPetro) e examinados por equipamento de análise de emissão óptica por plasma (ICP-OES), análogo ao Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), conforme orienta a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) em sua resolução 6020^a(EPA, 6020).

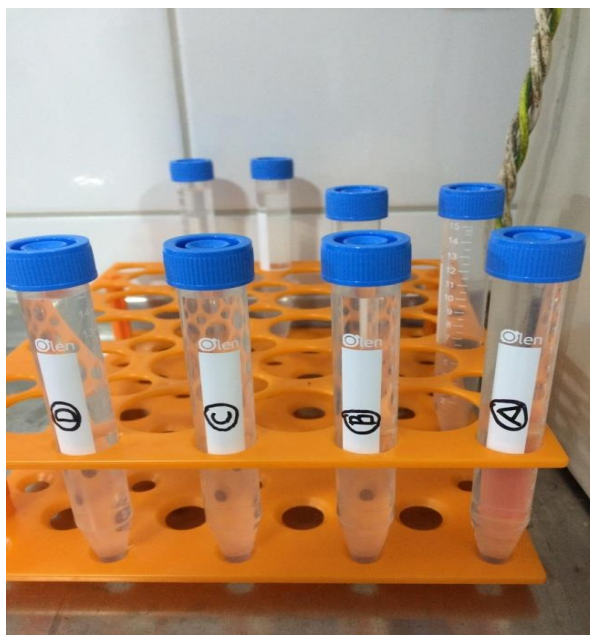


Figura 2 – Alíquotas das soluções-estoque acidificadas a 1% com H_2NO_3 para análise no equipamento Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente.

Análises químicas

Para a realização das determinações de Fe nas amostras, foi utilizado um Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), modelo Optima 7000DV, da Perkin Elmer.

Os gases utilizados foram: argônio em grau de pureza a 99,999%, para o gás do plasma; ar comprimido passado através de dois filtros de umidade para o gás auxiliar; nitrogênio pureza 99,999% para o gás do nebulizador.

A intensidade foi medida em modo de área. A linha utilizada para análise foi a Fe (II), com comprimento de onda de 238.204 nm, onde (II) indica uma linha iônica. As leituras foram feitas em triplicata, utilizando vista axial.

As condições instrumentais utilizadas nas análises por ICP-OES são apresentadas na Tabela 01.

Tabela 01 – Condições instrumentais das análises realizadas por ICP-OES.

Gerador de Rádio Frequência (MHz)	40
Potência de radio frequência (W)	1300
Fluxo gás de plasma (L min^{-1})	15
Fluxo gás de nebulização (L min^{-1})	0,8
Fluxo gás auxiliar (L min^{-1})	0,2
Taxa de aspiração da amostra (mL min^{-1})	1,0
Tempo de delay(s)	25
Tempo de limpeza (s)	20

As soluções para a calibração foram preparadas a partir de um padrão de Fe de 100 mg L⁻¹, sendo preparadas soluções em 5 concentrações: 0,0 mg L⁻¹; 0,2 mg L⁻¹; 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; e 5,0 mg L⁻¹. Os resultados obtidos para as análises das amostras, juntamente com os valores de desvio padrão, são apresentados na Tabela 1.

A curva analítica (intensidade vs. concentração) construída obteve a equação $y = 370400x + 5323,8$. O valor de R² foi de 0,999963, indicando excelente correlação entre os pontos. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir do desvio padrão de 10 leituras do branco de calibração. Os valores obtidos foram: LD = 0,00167 mg L⁻¹; LQ = 0,00558 mg L⁻¹.

Tabela 02 – Concentração de ferro presentes nas amostras.

Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)
Branco	< 0,00558
12,5%	0,0269 ± 0,0004
25%	0,1026 ± 0,0014
50%	0,1788 ± 0,0020
100%	0,4246 ± 0,0034

CULTIVO DOS ORGANISMOS TESTE

Um plantel de aproximadamente 200 indivíduos de *Nitokra* sp. foi cedido pela empresa Aplysia Soluções Ambientais® e divididos inicialmente em 04 *erlenmeyers* esterilizados contendo 700 mL de água destilada autoclavada salinizada com sal marinho (RedSea Salt Reef®) em concentração de 17 g kg⁻¹. Os organismos foram mantidos em uma câmara germinativa da marca Ethik Technology® modelo 415/*D, com fotoperíodo. O equipamento foi programado para a condição de fase clara de 14h e 10h de fase escura e temperatura constante de 24 ± 1°C seguindo a metodologia proposta por Lotufo e Abessa (2002) com modificações.

Para a alimentação, foi preparado um alimento a partir da diluição de 10g de ração em flocos da marca TetraMin® 0,5g de fermento biológico em 100mL de água destilada autoclavada. O meio foi submetido à agitação por 1 hora em agitador magnético. Após 45 minutos em repouso, foi retirado o sobrenadante para armazenar e utilizar na alimentação do cultivo. O líquido nutritivo ficou acondicionado em refrigerador com validade de uso de 30 dias (ABNT, 2004).

A alimentação foi oferecida duas vezes por semana, com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL. Os frascos eram levemente agitados em movimentos circulares bem brandos para mistura do alimento (Fig. 4).

A cada 15 dias o meio de cultivo de todo o sistema era parcialmente substituído por 50% de água salinizada a 17 gkg⁻¹. A retenção dos organismos durante a filtragem e drenagem do meio era feita utilizando uma rede de malha de 60 µM. A porção de água que permeava a malha era descartada e os indivíduos retidos eram devolvidos ao *erlenmeyer*, lavando-se a malha no

sentido inverso com o auxílio de uma pisseta contendo a água salinizada a 17 gKg^{-1} . O volume era aferido aos 700 mL e então alocado na incubadora.

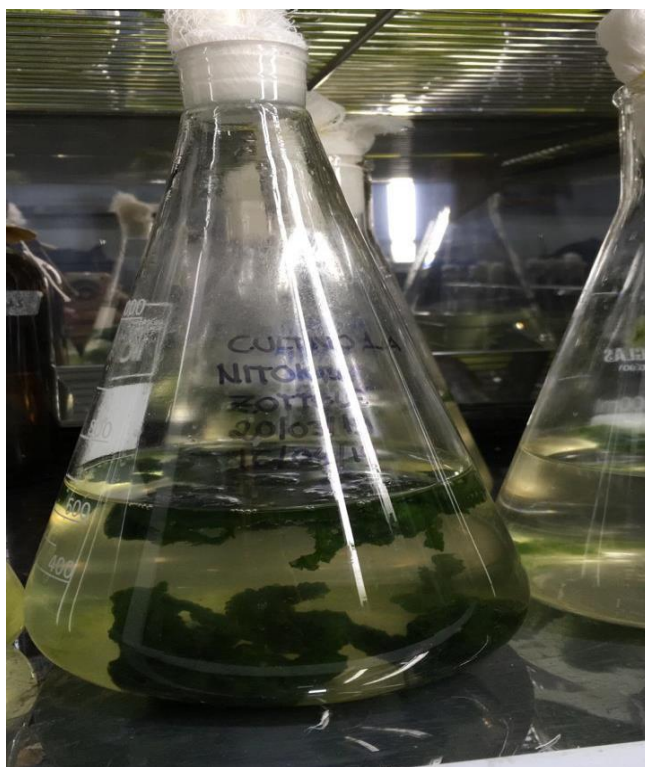


Figura 3 - Frascos de vidro do tipo *erlenmeyer* utilizados no cultivo em incubadora DBO.

O processo de troca completa ou total do sistema foi realizado a cada 30 dias. A metodologia envolveu o descarte completo do meio, retendo apenas os indivíduos na malha de $60 \mu\text{M}$. Invertendo a malha e lavando com a pisseta, transferiam-se os organismos retidos para outro frasco do tipo *erlenmeyer* previamente lavado, esterilizado e climatizado com água salinizada a 17 gKg^{-1} . O frasco anterior era então lavado, mergulhado em um vasilhame contendo ácido nítrico e então repetido o processo de lavagem e esterilização para a próxima troca total.

Aos 45 dias foi feita uma separação dos organismos através da malha de $120 \mu\text{M}$, a qual permitia a retenção dos adultos e a passagem dos juvenis (náuplios e copepoditos). Estes foram divididos em novos frascos para início de uma nova geração F (F1, F2, F3 e F4).

Condições iniciais de teste

Frascos transparentes estéreis de 20 mL em material polietileno foram preparados e quadruplicados para cada concentração, sendo Controle (CTR) + Diluições (A, B, C e D). Os recipientes foram identificados externamente com marcações que permitissem sua fácil identificação, sendo definidas as concentrações de $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em: $0,0005 \text{ mg L}^{-1}$; $0,026 \text{ mg L}^{-1}$; $0,102 \text{ mg L}^{-1}$; $0,178 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,424 \text{ mg L}^{-1}$ (Fig.5).

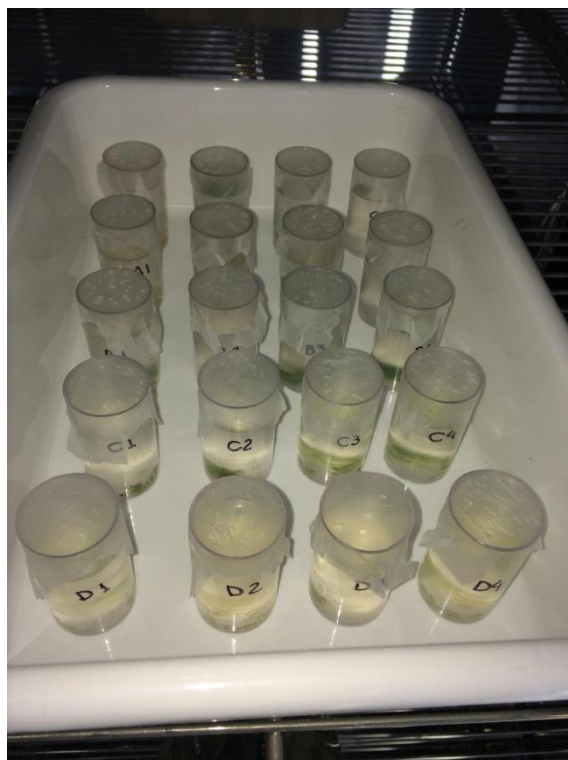


Figura 4 – Disposição das réplicas dos frascos de polietileno utilizados no teste crônico em incubadora do tipo DBO

Béqueres contendo 200 mL de cada solução-estoque preparada com o $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram colocados em um agitador magnético por três horas para solubilização do sal marinho. A quantidade necessária de sal foi pesada em uma balança analítica de precisão. Após a completa diluição do sal, as concentrações das soluções-estoque foram aferidas com um refratômetro. Quando necessário, foi feita a correção de soluto ou solvente mantendo a salinidade em 17 g kg^{-1} .

Pipetas volumétricas automáticas foram utilizadas para transferência de 15 mL do volume de cada béquer para seus respectivos grupos de frascos e suas réplicas. Inicialmente, foi realizado em cada grupo o levantamento de dados com equipamento multi-parâmetro *Water Quality Meter 8603(WQM 8603)* para aferir os dados de temperatura, condutividade, pH e oxigênio dissolvido (mg L^{-1}).

Tabela 03 – Nomenclatura dos tratamentos toxicológicos e respectivas concentrações de $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO (mg L^{-1})
CTR	<0,0005
A	0,026
B	0,102
C	0,178
D	0,424

Parâmetros físico-químicos de ensaio

Com equipamento WQM-8603 foi feita a leitura dos valores de oxigênio dissolvido (OD), pH, condutividade (C), salinidade (S) e temperatura (T°C). Os dados foram levantados às 19h30 (+3GMT) do dia 17 de abril de 2019 em um frasco de cada grupo.

As aferições de OD, pH, T°C e C foram realizadas com a sonda multiparâmetro e os valores, das condições iniciais e finais estão descritos nas tabelas 3 e 4. O cálculo da salinidade absoluta (S) foi baseado na Equação Termodinâmica da Água do Mar (TEOS-10) em função da formulação da energia livre de Gibbs, onde todas as propriedades termodinâmicas da água do mar podem ser derivadas da condutividade com a temperatura e pressão (UNESCO, 2010).

Carta controle – Teste de Sensibilidade

Antes de iniciar o teste crônico, foi realizado um teste agudo utilizando indivíduos de *Nitokra* sp. do cultivo em solução padronizada de sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) para aferir a sensibilidade do lote dos organismos no teste de imobilidade e sucesso de eclosão.

As soluções foram preparadas utilizando água MilliQ® solubilizada a $17g\ kg^{-1}$ com sal marinho Red Sea Salt Coral Reef® e depois adicionada a solução padrão de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em concentrações específicas para o teste.

O teste teve duração de 96 horas e consistiu em adicionar 10 fêmeas ovadas a cada um dos tratamentos nas concentrações de $0,25\ mg\ L^{-1}$; $0,5\ mg\ L^{-1}$; $1,0\ mg\ L^{-1}$; $2,0\ mg\ L^{-1}$ e 5 fêmeas na concentração de $4,0\ mg\ L^{-1}$ de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em frascos de polietileno contendo 10 mL de solução. Cada tratamento continha 3 réplicas conforme orientação da ABNT (2004) e Lotufo e Abessa (2002) com modificações.

Ao término do teste objetivou-se identificar a concentração efetiva (CE_{50}) de imobilidade dos organismos. A CE_{50} foi calculada estatisticamente seguindo o método Trimmed Spearman-Kärber (TSK) descrito em Hamilton *et al.* (1977).

Separação dos organismos teste

Utilizando uma malha de $120\ \mu m$, filtrou-se o cultivo de *Nitokra* sp. separando os juvenis dos indivíduos adultos, os quais ficavam retidos. Os organismos retidos foram transferidos para um béquer contendo água salinizada a $17g\ kg^{-1}$, sendo que os que passaram pela malha foram devolvidos ao cultivo. Com uma pipeta de Pasteur pingou-se gotas do material retido numa placa de Petri formando ilhas. O material foi ao microscópio estereoscópico para individualmente separar as fêmeas com ovos e com movimentação ativa.

As fêmeas selecionadas foram adicionadas na proporção de 10 indivíduos por frasco de teste, em cada uma das concentrações deste ensaio, totalizando 200 indivíduos. Todo o conjunto foi vedado individualmente com película de parafina plástica, específica para procedimento em laboratório. A película foi perfurada com uma agulha esterilizada para acesso a alimentação, permitir a interação água-ar e redução da evaporação.

Os frascos-testes foram armazenados em uma incubadora do tipo DBO da marca Ethik Technology® com foto-período programado para 12h de fase escura e 12h de luz.

Tabela 04 – Resumo das condições do teste crônico empregados

TIPO DO TESTE	QUALITATIVO
Método	Semi-estático
Temperatura	23 ± 1
Fotoperíodo	12h claro e 12h escuro
Salinidade	17 ± 1
Frasco-teste	Polietileno 20 mL
Volume da solução teste	15 mL
Organismo teste	Nitokra sp.
Origem dos Organismos	Cultivo LabEcotox – Gen. F4
Idade dos Organismos	30 ± 3
N de Organismos / frasco	10 fêmeas ovadas
N Réplicas / tratamentos	4
Alimentação	0,1 mL de Solução Tetramin®
Água de Diluição	Água MiliQ® salinizada a 17
Duração dos Ensaios	45 dias
Parâmetros Avaliados	Fecundidade, Prole/Fêmea e N Ovos
Método de Validação Estatística	ANOVA e Kruskal-Wallis

Alimentação e manutenção do teste

O volume adicionado a cada provimento foi de 0,1mL, utilizando uma pipeta automática de 200 µL, com ponteira descartável para que pudesse acessar cada frasco nos furos de acesso já existentes. Depois de completada a alimentação, a ponteira era descartada e os frascos eram levemente agitados em movimentos circulares horário para distribuição e mistura da ração no meio de cultura (Fig. 6).

Este procedimento de alimentação foi repetido duas vezes na semana, especificamente as segundas e quintas-feiras, durante a fase clara da incubadora, compreendido entre as 08 e 20 horas. A oferta de alimento foi finalizada no dia anterior ao último dia do teste, completando exatamente os 45 dias propostos.

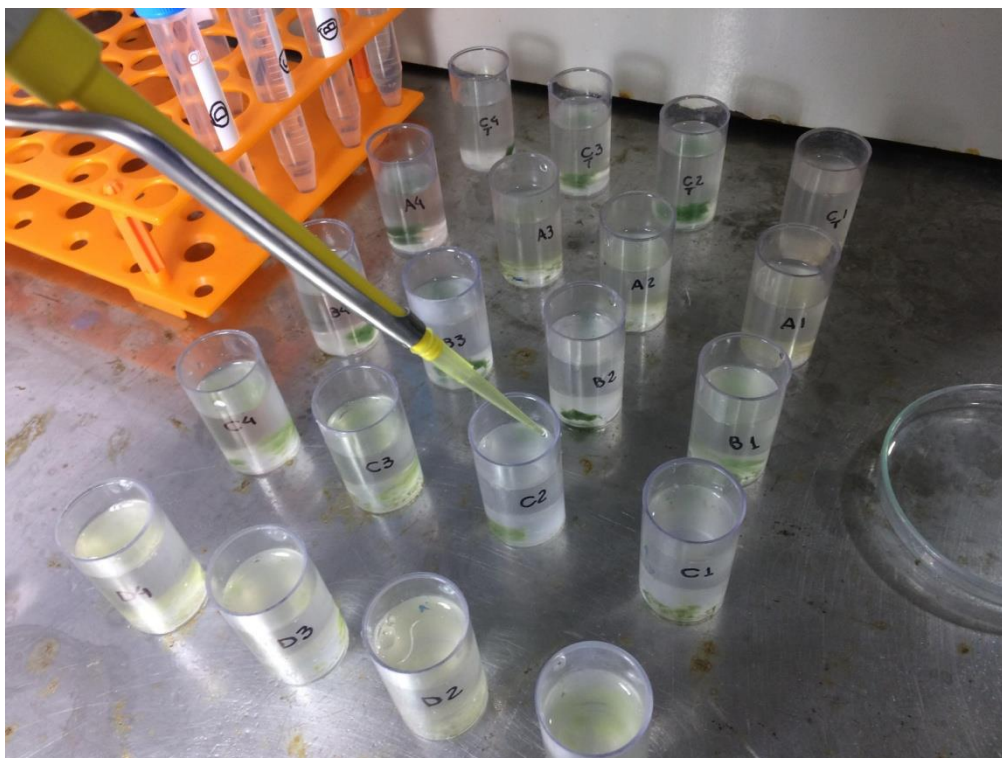


Figura 5 – Adição de 0,1 ml do alimento nutritivo preparado com solução de ração em flocos Tetramin®.

Aos 15 dias decorridos do teste foi realizada a troca parcial do meio de cultura. A substituição consistiu em retirar 50% do volume de cada frasco e repor o volume com a solução estoque referente à concentração do tratamento. O meio era filtrado em uma malha de 60 μM para retenção completa de todos os organismos. A água permeada era descartada, e a parte com os organismos retidos na malha foi devolvida ao frasco usando como veículo o líquido da solução estoque. A malha foi lavada com água destilada após cada procedimento, frasco por frasco e depois ambientada com água MilliQ® salinizada a 17g kg^{-1} .

O procedimento de transferência da água de cultura iniciou-se com o controle, seguido das concentrações mais baixas até por fim, a de maior concentração evitando o incremento da concentração e contaminação entre os meios. A malha foi substituída integralmente e lavada com água destilada antes de cada transferência. O copo de PVC foi lavado com sabão neutro e água destilada, antes de ser filtrado era ambientado com água salinizada a 17 g/kg estéril.

Com 30 dias de cultura, o meio de cada tratamento foi completamente filtrado, retendo os organismos e substituindo o meio por uma nova água de mesma concentração de $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ da solução estoque salinizada. Os organismos retidos na malha foram lavados de volta aos frascos de 20 mL utilizando uma pipeta de Pasteur esterilizada, com jatos fracos lançados no sentido contrário ao retido, diminuindo o estresse aos indivíduos.

Após a transferência parcial, imediatamente vedou-se os frascos com parafilme plástico. Foram feitos novos furos com uma agulha estéril e descartável para a interação com a atmosfera. Após completar o procedimento de furos, foi adicionado o alimento em todos os frascos. Agitados levemente e armazenados na incubadora.

O procedimento de transferência de organismos com a substituição total do meio repetiu o procedimento parcial. No entanto, os frascos de cultura não foram lavados com sabão. Todos os frascos antigos foram substituídos por frascos novos, previamente ambientados com água destilada e salinizada artificialmente. Completadas com a água salinizada na concentração definida e os organismos adicionados.

Ao término, os frascos foram selados um por um com o parafilme plástico. Realizou a perfuração da proteção para acesso de ração e interação com a atmosfera com uma agulha estéril descartável, após completar este procedimento, sendo oferecida de imediato a solução nutritiva. Ao término do arraçoamento os frascos foram agitados levemente e logo em seguida retornando a incubadora.

Em 45 dias, o teste foi encerrado e todos os tratamentos foram fixados um a um com solução de formol a 4% e corante Rosa de Bengala. Adicionou 1 mL desta solução em cada frasco e agitou levemente, em seguida ficou em repouso para triagem no dia seguinte.

CONTAGEM DE ORGANISMOS

Ao término do experimento foi acrescentado 1 mL da solução de formaldeído a 4% + corante Rosa de Bengala para fixação em cada uma das réplicas dos 5 tratamentos. Este procedimento consistiu em aguardar 48h para iniciar a triagem. Alíquotas de 1 a 1,5 mL de cada frasco foram distribuídas, gota após gota com uma pipeta de Pasteur em uma placa de Petri para análise em microscópio estereoscópico.

A identificação consistiu em contabilizar o número de fêmeas ovadas, indivíduos adultos (macho e fêmeas), copepoditos e náuplios em suas fases de desenvolvimento. Iniciaram-se as contagens pela réplica I do tratamento D, seguido pela réplica II, III e IV, sendo seguida pelo tratamento das réplicas em C, B, A e Controle.

O padrão utilizado na contagem consistiu em acrescentar uma gota maior na extremidade da placa, a partir dela em sentido horário, gota por gota até retornar ao início, em seguida avançou-se para o grupo de gotas ao centro da placa. A metodologia de contagem gota a gota foi substituída pela distribuição em linha (Fig. 7) por ser muito mais dinâmica, prática e eficiente. Esta consistia em ler uma linha de amostragem identificando os organismos e suas fases de desenvolvimento sem perder a continuidade de leitura ou repetir dados.



Figura 6 – Método de distribuição para contagem em placa de Petri utilizado.

Cada setor foi observado e, uma vez identificado o estágio do organismo, os valores eram imputados um a um com aparelho de contagem manual de células. Este aparelho comporta uma contagem máxima de 999 unidades (na casa das centenas) para cada grupo num total de 08. (Fig. 8)



Figura 7 – Contador manual de células utilizado na triagem dos organismos.

Cada casa do aparelho foi escolhida em ordem de interesse para contagem dos organismos, sendo a primeira, da esquerda para a direita: 1) Fêmeas ovadas, seguida por 2) Fêmeas adultas, 3) Machos adultos 4) Copépoditos, 5) Náuplios 6) Ovos fecundados e 7) Ovos produzidos.

Fêmeas adultas e com ovissacos presentes eram contabilizados em função do número de ovos fecundados e não fecundados. O Rosa de Bengala é um corante derivado do composto tetraclorado e tetraiodado da fluoresceína sódica ($C_2OH_2Cl_4I_4O_5$), corando em rosa através da permeabilização do tecido por atividade celular, células vivas, mortas ou degeneradas por diferença da intensidade de pigmentação (FEENSTRA; TSENG, 1992). Isto permitiu facilmente identificar os organismos e os ovos fecundados e não fecundados nitidamente (Fig.9).



Figura 8 – Ovissaco de *Nitokra* sp. com ovos fecundados (circulo preto) escurecidos e não fecundados em tonalidade mais transparente.

Após esgotar as contagens de uma alíquota, a placa foi lavada com água destilada e descartada em um béquer. O processo consistiu em enxaguar a placa de Petri e enxugar com papel toalha até ficar completamente seca. A presença de água na placa ao gotejar fez com que escorresse para as bordas da vidraria dificultando a contagem e reduzindo a eficiência de operação. Portanto, a placa completamente seca permitiu a correta distribuição de gotas sem espalhar para os contornos.

Cada um dos tratamentos foi contabilizado individualmente em seus respectivos grupos, iniciando pelo tratamento D, seguindo para o C, B, A e CTR. Sequencialmente, a contagem consistiu em identificar copepoditos e náuplios (Fig. 10), fêmeas ovadas (Fig. 11), fêmeas adultas, machos adultos, e ovos fecundados e não fecundados. A separação do ovissaco das

fêmeas ovadas para identificação e contagem foi realizada com um par de agulhas de dissecação.

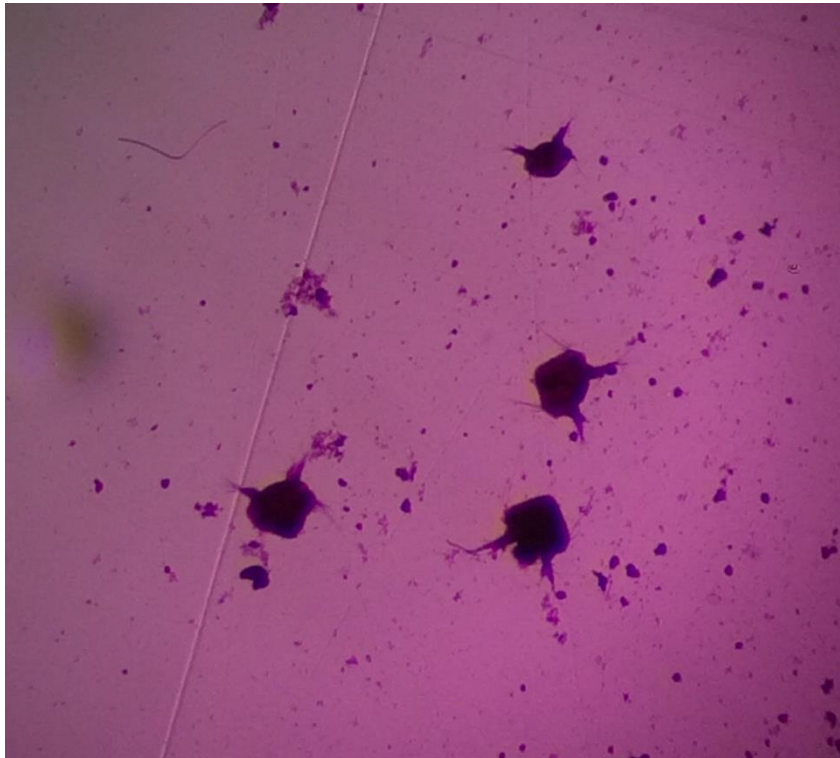


Figura 9 – Náuplios de *Nitokra* sp. no estágio 2 (três indivíduos maiores na parte inferior) e 1 náuplio no estágio 1 (indivíduo menor na parte superior da imagem).

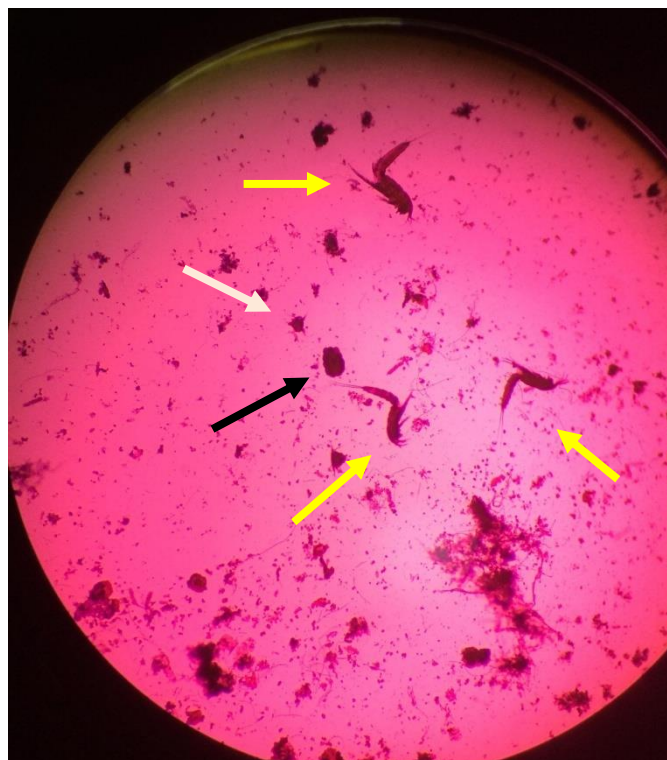


Figura 10 – Indivíduos adultos vistos em microscópio estereoscópico em contraste com o corante rosa de bengala (seta amarela), ovissaco fecundado (seta preta) e náuplio (seta branca).

RESULTADOS

Parâmetros físico-químicos

Os valores de todos os parâmetros estavam dentro das condições ideais para execução do teste $21 < T^{\circ}C < 23$; $17 < S < 21$; $7,5 < pH < 8,5$ e oxigênio $> 3 \text{ mg L}^{-1}$ (LOTUFO; ABESSA, 2002). A temperatura inicial em $23^{\circ}C \pm 0,6$ está relacionada com a temperatura ambiente do Laboratório de Ecotoxicologia (Tabela 05) e final com a incubadora onde manteve $22,8^{\circ}C$ (Tabela 06).

Tabela 05 – Condições iniciais do teste de ensaio crônico para *Nitokra* sp.

Grupo/Parâmetros	OD (mg L^{-1})	pH	T $^{\circ}C$	C (mS)	S (g kg^{-1})
CTR	8,3	8,15	22,5	27,8	18,05
A	8,3	8,17	23,1	31,2	20,01
B	8,8	8,13	22,8	29,1	18,85
C	8,5	7,98	22,8	32,6	21,37
D	8,5	8,11	22,9	30,7	19,95

Após 45 dias, as condições físico-químicas do teste são apresentadas na tabela 06 para fins de comparação com os parâmetros no início do ensaio (Tabela 06).

Os resultados de temperatura de todos os tratamentos permaneceram estabilizados em $22,8^{\circ}C$. O valor calibrado na Incubadora DBO ficou mantido sem perda ou alteração devido ao *backup* energético de um gerador utilizado durante as falhas da rede elétrica. As condições físico-químicas do tratamento estiveram mantidas nos padrões de qualidade por toda duração do teste conforme orientação em Lotufo e Abessa (2008).

Tabela 06 – Condições finais do teste de ensaio crônico para *Nitokra* sp.

Grupo/Parâmetros	OD (mg L^{-1})	Ph	T $^{\circ}C$	C (mS)	S (g kg^{-1})
CTR	7,7	8,11	22,8	29,4	19,97
A	7,9	8,16	22,8	28,8	19,52
B	6,9	8,27	22,8	30,1	20,49
C	7,5	8,26	22,8	30,6	20,86
D	6,3	8,27	22,8	31,3	21,39

CONTAGEM DE ORGANISMOS

FÊMEAS OVADAS

Para as 04 réplicas do controle foram contabilizadas 116 fêmeas ovadas (EF) e para as 04 réplicas do tratamento A, um total de 100 EF. Esses dois primeiros correspondem à concentração de Fe $< 0,0005$ e $0,026 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente. Para o tratamento B de $0,102 \text{ mg L}^{-1}$, foram computadas 66 EF. Os tratamentos de concentração superiores a $0,178 \text{ mg L}^{-1}$, valor onde ocorre diminuição da população, o tratamento C totalizou 57 EF e o tratamento D com concentração de $0,424 \text{ mg L}^{-1}$ com apenas 38 EF (Fig. 3).

Os testes de toxicidade crônica apresentaram diminuição da população nos tratamentos B, C e D em função da presença do ferro em concentrações superiores a 0,102 mg L⁻¹ (Figura 12).

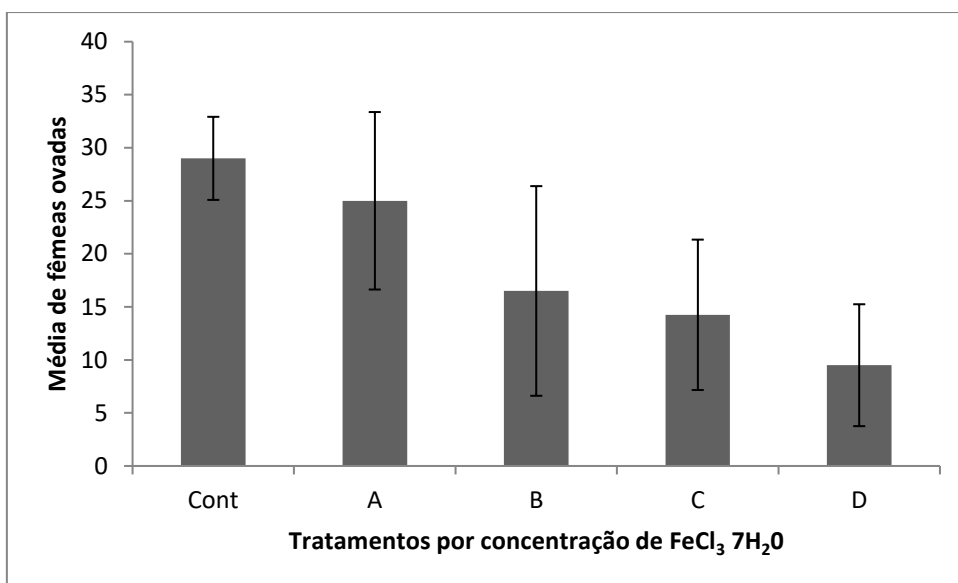


Figura 11 – Quantidade média e desvio padrão do número de fêmeas adultas ovadas por tratamento em função da concentração de FeCl₃ 7H₂O.

Com relação à análise dos dados do Controle com os demais tratamentos através da análise estatística *Post-Hoc*, os tratamentos B, C e D apresentaram valores diferentes ($p < 0,05$) em relação ao tratamento Controle (CTR) (Tabela 5).

Tabela 7 - Análise estatística *Post-Hoc* da média das fêmeas ovadas dos tratamentos CTR, A, B, C e D.

<i>Pos-hoc</i>				
Groups	t	P(perm)	perms	P(MC)
D, C	0,92401	0,435	18	0,416
D, B	1,3297	0,235	25	0,23
D, A	3,242	0,036	25	0,014
D, Cont	4,8633	0,023	25	0,007
C, B	0,37213	0,743	25	0,716
C, A	1,8924	0,082	25	0,103
C, Cont	2,9326	0,031	25	0,031
B, A	1,4605	0,186	35	0,194
B, Cont	2,4246	0,102	35	0,049
A, Cont	0,96674	0,348	35	0,375

Comparando estatisticamente o Controle com os tratamentos A, B, C e D, o valor da concentração em A e B não são significativos estatisticamente a ponto de causar redução da população de fêmeas com potencial reprodutivo. No entanto, os resultados apresentaram efeitos significativos nos tratamentos C e D na redução de organismos frente à exposição do

contaminante. Foi observado uma diminuição da população em função do aumento da concentração de Ferro nos testes a partir de 0,178 mg L⁻¹.

PROLE

A produção média no Controle soma um total de 221 ± 43 indivíduos. A partir dos tratamentos com adição do contaminante, este valor caiu para 170 ± 45 indivíduos em A, diminuindo para 91 ± 38 indivíduos em B. No tratamento a seguir, com concentração de FeCl₃ 7H₂O de 0,178 mg L⁻¹ em C, atinge o valor de 110 ± 24 indivíduos. Este valor corresponde à metade do encontrado no Controle. Para o tratamento D de 0,424 mg L⁻¹, o número foi de 135 ± 42 indivíduos (Fig. 13).

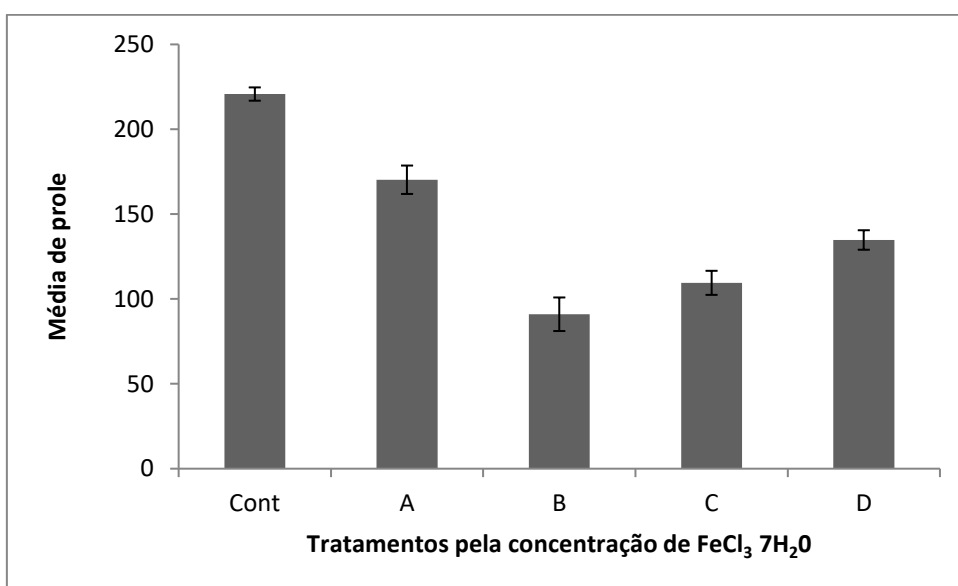


Figura 12 – Quantidade média de prole e desvio padrão (náuplios e copepoditos) em função da concentração de FeCl₃ 7H₂O.

Os resultados da estatística são significativos para os tratamentos B, C e D quando comparados tanto com o Controle como com o tratamento A (Tabela 8).

Tabela 8 – Tabela do Tratamento Estatístico Post-Hoc da média da prole dos tratamentos CTR, A, B, C e D.

<i>Pos-hoc</i>				
Groups	t	P(perm)	perms	P(MC)
D, C	0,99453	0,331	35	0,336
D, B	1,5921	0,138	35	0,175
D, A	1,1188	0,267	25	0,307
D, Cont	2,7766	0,045	35	0,026
C, B	0,93488	0,346	35	0,418
C, A	2,3662	0,091	25	0,046
C, Cont	4,6977	0,034	35	0,004
B, A	2,7198	0,057	25	0,038
B, Cont	4,5178	0,021	35	0,007
A, Cont	1,5692	0,219	25	0,168

OVOS PRODUZIDOS E FECUNDADOS

A produção média de ovos por tratamento resultou em 390 ovos para o Controle, 308 para o tratamento A, 238 para o B, 191 para o tratamento C e 135 para o D. A diferença do controle para o tratamento com a mais alta concentração possui um declínio populacional de 3 vezes.

A média de ovos fecundados encontrados no Controle foi de 197, sendo que este número começa a reduzir para 157 no tratamento A. No tratamento B a média é de 103, e nos tratamentos seguintes os resultados aparentemente ficam constantes, C com 93 e D 86 ovos fecundados. Estes valores produzidos acompanham uma redução linear na quantidade de ovos produzidos de 390 no CTR para 135 no tratamento de maior concentração (Fig. 14).

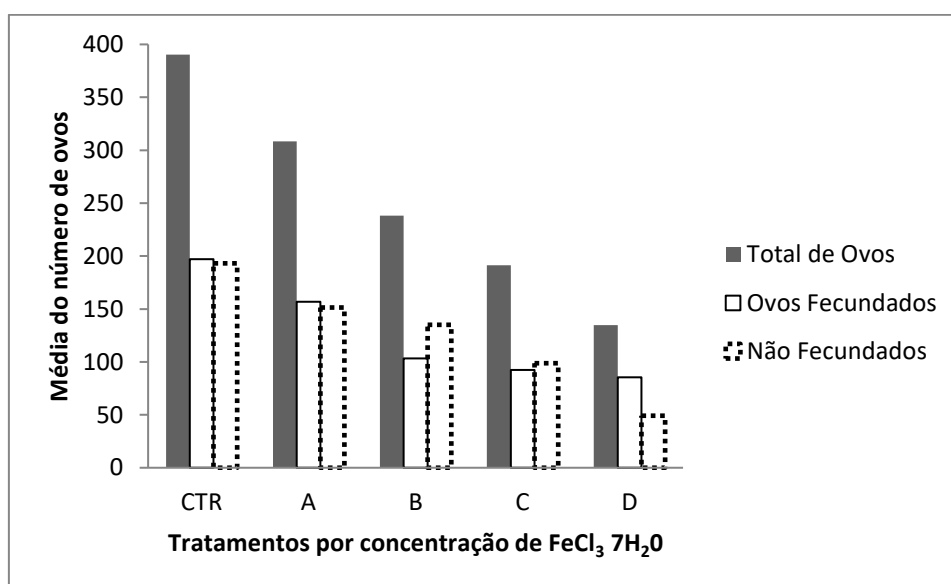


Figura 13 – Média de ovos produzidos (sólido), ovos fecundados (linha contínua) e ovos não fecundados (linha pontilhada) em função da concentração de FeCl₃ 7H₂O.

Do Controle para o tratamento D a proporção é de 1/3 do total, já para os tratamentos B, C e D a diferença de um para o outro são de aproximadamente 10 a cada aumento de concentração. As análises estatísticas entre as diferentes concentrações não apresentam valores significativos de $P > 0,05$. O mesmo ocorre para a quantidade de ovos fecundados produzidos.

Os ensaios evidenciam que a presença do Fe, em concentrações superiores a $0,102 \text{ mg L}^{-1}$, é suficiente para causar efeitos estressantes como a redução da produtividade dos organismos testados. Há relação da concentração de $0,102 \text{ mg L}^{-1}$ ser potencialmente tóxica para os organismos.

As análises estatísticas demonstraram não haver relação entre a produtividade dos ovos fecundados e a concentração do contaminante. Os resultados seguem a lógica de queda populacional em função do aumento da concentração de Fe nos tratamentos. Os valores encontrados em B mostram concentração de $0,178 \text{ mg L}^{-1}$ suficientemente tóxica para afetar o desenvolvimento reprodutivo do organismo testado.

O resultado do tratamento estatístico não apresenta significância entre a quantidade de ovos fecundados e a relação com o contaminante. Os valores identificados seguem o mesmo

comportamento da taxa de ovos produzidos variando apenas em função da população de fêmeas ovadas. Por outro lado, número de ovos produzidos reduziu de acordo com o aumento da concentração, no entanto, a quantidade de ovos fecundados aparenta continuar equilibrado em B, C e D.

PROPORÇÃO SEXUAL

O total de indivíduos adultos nas 4 réplicas do tratamento A foi de 18 indivíduos machos e de 181 fêmeas numa relação de 1 macho para cada 10 fêmeas. As réplicas do tratamento B expressam a contagem de 29 machos e 296 fêmeas em uma relação de 1 para 10. Semelhantes ao tratamento A e o Controle. Nas réplicas do tratamento C, o total de indivíduos resultou em 45 machos e 266 fêmeas, em uma relação de 1 macho para cada 6 fêmeas. Para o tratamento D o número de machos foi de 84 e 251 fêmeas, esta relação ficou na proporção de 1 macho para cada 3 fêmeas. (Figura 14).

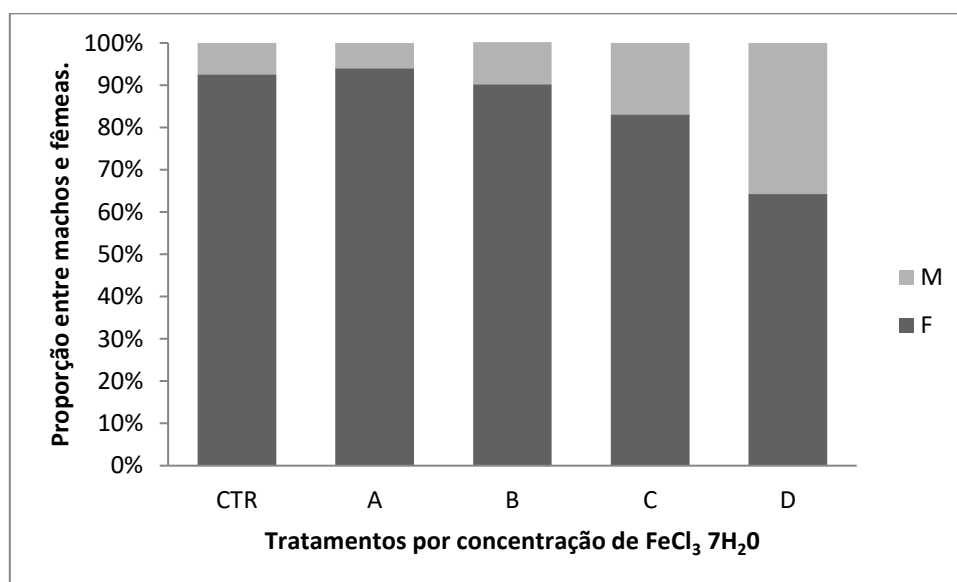


Figura 14 – Distribuição proporcional dos indivíduos machos (M) e fêmeas (F) adultos por tratamento em concentrações de $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Com o aumento da concentração do contaminante, observou uma mudança gradual na relação entre o número de indivíduos machos e fêmeas. A relação do número de macho por fêmeas é máxima no Controle de 1/10 e mínima em D com 1/3. Esta mudança ocorre a partir da concentração de $0,178 \text{ mg L}^{-1}$ no tratamento C na proporção de 1/6.

O resultado da análise estatística apresenta um gráfico (Figura 15a) com distinção entre as réplicas I, II, III e IV para os tratamentos em 3 grupos distintos. Sendo o mais afastado e diferente significativamente dos demais, o tratamento D. O grupo C, está afastado, porém apresenta uma aproximação para os grupos de B. E o conjunto formado pelos grupos A, B e o Controle apresentam uma similaridade (Fig. 15b) entre os resultados de proporção sexual.

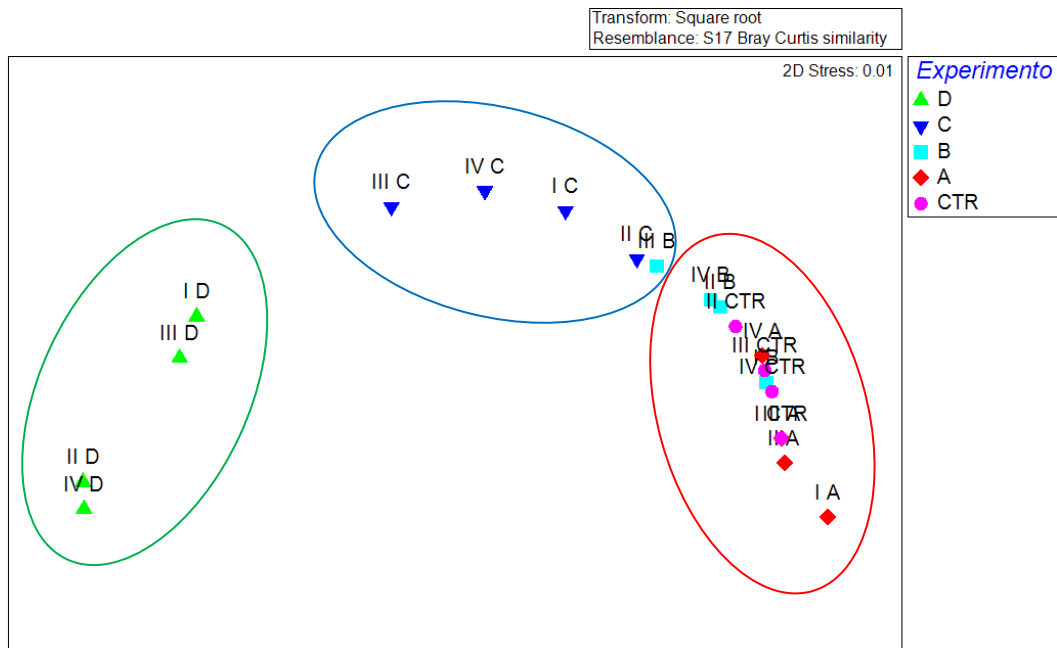


Figura 15a - Gráfico de dispersão MDS para os grupos (D – Elipse verde), (C – Elipse azul) e (CTR, A e B – Elipse vermelha) distintos significativamente.

Global Test
Sample statistic (Global R): 0.651
Significance level of sample statistic: 0.01%
Number of permutations: 9999 (Random sample from a large number)
Number of permuted statistics greater than or equal to Global R: 0

Pairwise Tests		R	Significance	Possible	Actual	Number >=
Groups	Statistic		Level %	Permutations	Permutations	Observed
D, C	0.979	1	2.9	35	35	1
D, B	1	1	2.9	35	35	1
D, A	1	1	2.9	35	35	1
D, CTR	1	1	2.9	35	35	1
C, B	0.625	1	2.9	35	35	1
C, A	0.938	1	2.9	35	35	1
C, CTR	0.896	1	2.9	35	35	1
B, A	0.458	1	5.7	35	35	2
B, CTR	0.219	1	14.3	35	35	5
A, CTR	0.01	1	42.9	35	35	15

Figura 15b - Análise estatística de similaridade MDS através da ANOVA One-Way e permutação.

DISCUSSÃO

O CONAMA 357 generaliza os parâmetros referenciais para o lançamento de efluentes em águas tipo doce, salobra e salgada e suas classes em função do uso por todo território brasileiro, em contraponto, o EPA (1989) difere ao estipular os valores em função das características locais de cada região dos Estados Unidos. Os parâmetros são fundamentados a partir do efeito biológico no ecossistema local, tratando como caso particular àquela região de estudo. O que é completamente plausível, sendo desacertado esperar e assumir que um determinado elemento presente em um rio tenha o mesmo comportamento ao atingir o ambiente marinho (BURGESS *et al.*, 1995) ou uma região com massas de água mais fria responda igual ao de águas mais quentes.

Foi observado nos resultados uma queda populacional de *Nitokra* sp. frente ao contaminante em concentrações superiores a 0,102 mg L⁻¹. A legislação do CONAMA 357 estipula valores máximos de lançamento de determinados elementos, sendo definido como referência para o Ferro Dissolvido a concentração 0,3 mg L⁻¹, garantida como segura para a biota aquática em águas tipo I, II e III.

Este trabalho desenvolveu o experimento em 45 dias possibilitando um entendimento dos efeitos em análise geracional de copépodes, diferente dos demais trabalhos encontrados na literatura com duração de 96 horas conforme o padrão Internacional 14669 (ISO, 1999). Trabalhos realizados na região de estuários de São Paulo como em Giancesella (2008) e Argentino-Santos (2006) apresentam ensaios crônicos de 96h para, Bertioga e Guarujá utilizando amostras de sedimento dos canais de dragagem, onde há compostos químicos complexados. Todos apresentam efeitos de redução da população de *Nitokra* sp. em seus testes.

Nos tratamentos com concentração superior a 0,102 mg L⁻¹ ocorre uma presença maior de indivíduos machos conforme aumenta a concentração do elemento toxicante utilizado. Existem evidências na literatura de que os poluentes interferem na função hormonal de animais, causando efeitos relacionados à diferenciação, crescimento e desenvolvimento sexual (JOBILING; SUMPTER, 1993; PURDOM *et al.*, 1994).

Estratégias reprodutivas da maioria dos copépodes bentônicos são adaptadas para potencializar o número de prole e assim aproveitar eficientemente os recursos disponíveis do meio em razão das condições ambientais (VIDAL, 1980; WHITE; ROMAN, 1992). A reprodução sexuada é predominante para crustáceos e copépodes, e é razoável supor que este seja o método mais eficiente, sob condições favoráveis. Já em condições de interferência, a mudança pode influenciar o desenvolvimento de alternativas de sobrevivência, como potencializar a reprodução sexuada (DAHMS, 1986) e com isso gerando mais indivíduos machos.

Do tratamento B ao D é observado que a quantidade de ovos fecundados se manteve sem mudanças abruptas, enquanto o número de ovos totais produzidos reduziu. Sob condições de estresse e ambiente desfavorável o organismo muito provavelmente deve economizar energia, reduzindo a quantidade de indivíduos de modo a investir na qualidade da prole determinando a taxa de recrutamento (SHIN *et al.*, 2003).

A produção e recrutamento dos copépodes são dependentes diretos das condições de temperatura (MCLAREN 1965, HEINLE 1969, PAFFENHOFER; HARRIS 1976), da oferta e qualidade de alimento (HUNTLEY; BOYD 1984) e das condições do ambiente (CHECKLEY 1980a, b). Portanto, quando estas condições são estabilizadas no teste, a redução da produção de ovos e mortalidade decorre da presença de um estressante químico, neste caso, o ferro.

A produção de ovos e a taxa de fêmeas adultas são indicadores diretos e determinantes da produção e do recrutamento dos copépodes (SHIN *et al.*, 2003). Subsequentemente à produção de ovos, a taxa de sobrevivência de náuplios e copepoditos é dada ao desenvolvimento populacional, compondo a taxa de produtividade do grupo (MILIONE; ZENG, 2007; SANTHANAM, 2013).

No ambiente natural, estes contaminantes podem ser amplificados frente às mudanças climáticas (NICKELS; OHMAN, 2018), degradação do meio e da oferta de alimento (SEDLACEK; MARCUS, 2005). A literatura aponta que testes toxicológicos envolvendo análises individuais de elementos apresentam melhores resultados se comparada aos testes envolvendo compostos (FAUST *et al.*, 2003). Portanto, a análise realizada com o ferro demonstrou haver relação da presença do metal com a diminuição do número de ovos produzidos, prole e proporção sexual.

Em condições reais onde há o acúmulo deste contaminante, como no ambiente estuarino, os efeitos podem ser amplificados para os demais níveis tróficos, se complexando em misturas com o mercúrio, chumbo, cádmio, alumínio e arsênio, elementos altamente tóxicos (BRYAN *et al.*, 1992; FUKUNAGA *et al.*, 2011). A *Nitokra* sp. é base alimentar para muitas larvas de peixes tropicais estuarinos (MCKINNON *et al.*, 2003; SAMPEY *et al.*, 2007), desencadeando a possibilidade de transferência para outros níveis tróficos superiores por biomagnificação.

Resultados como o de Gomes *et al.*, (2017) evidenciam concentrações de ferro ultrapassando os 1000 mg Kg⁻¹ na região estuarina do rio Piraquê Açu, no Espírito Santo. Esses valores são 10.000 vezes maiores que os testados neste estudo. Evento que levanta um questionamento sobre, a possibilidade de concentrações mais altas atuarem modificando, a proporção de indivíduos machos e fêmeas podendo comprometer a sobrevivência da espécie.

CONCLUSÃO

A concentração de ferro partir de 0,102 mg L⁻¹ causa a diminuição da produtividade da *Nitokra* sp. e em concentrações acima de 0,178 mg L⁻¹ ocorre a mudança na proporção sexual, aumentando o número de machos. Estes valores contrariam a concentração de 0,30 mg L⁻¹ de ferro, determinado como parâmetro pela resolução CONAMA n° 357. Portanto, é sugerida uma reavaliação dos parâmetros pré-estabelecidos pela legislação para este elemento.

BIBLIOGRAFIA

A.S. ANDERSON, J.W. HUNT, B.M. PHILLIPS, B. THOMPSON, S. LOWE, K. TABERSKI, R. S., CARR. Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Bay Estuary Environ. Res., 105 (2007), pp. 145-155

ABESSA, D.M.S; CARR, R.S.; SOUSA, E.C.P.M.; RACHID, B.R.F.; ZARONI, L.P.; GASPARRO, M.R.; PINTO, Y.A.; BÍCEGO, M.C.; HORTELLANI, M.A.; SARKIS, J.E.S; MUNIZ, P. Integrative ecotoxicological assessment of contaminated sediments in a complex tropical estuarine system. In: HOFER, T.N. (Ed.) Marine Pollution: New Research. Nova Science Publishers, Inc, 2008.

ABRAHAM, S., AND GOPALAN, U. K. (1975). Growth of an estuarine harpacticoid copepod *Nitocra spinipes* Boeck cultured in the laboratory. Bull. Dep. Mar. Sci. Univ. Cochin 7,309-3 18.

ALISON L. GREEN, LEANNE FERNANDES, GLENN ALMANY, RENE ABESAMIS, ELIZABETH MCLEOD, PORFIRIO M. ALIÑO, ALAN T. WHITE, ROD SALM, JOHN TANZER & ROBERT L. PRESSEY (2014) Designing Marine Reserves for Fisheries Management, Biodiversity

Conservation, and Climate Change Adaptation, Coastal Management, 42:2, 143-159, DOI: 10.1080/08920753.2014.877763

ARGENTINO-SANTOS, R.C., Avaliação ecotoxicológica do sedimento do local de disposição do material dragado do porto de Santos e da área de influência direta. 2006. 124f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2010. 18p.

BATISTA, M. I., HENRIQUES, S., PAIS, M. P., CABRAL, H. N., 2014. Assessment of cumulative human pressures on a coastal area: integrating information for MPA planning and management. Ocean Coast. Manag. 102, 248–257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.09.020>.

BATISTA, M. I., HENRIQUES, S., PAIS, M.P., CABRAL, H.N., 2014. Assessment of cumulative human pressures on a coastal area: integrating information for MPA planning and management. Ocean Coast. Manag. 102, 248–257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.09.020>.

BENGTSSON, B. E. 1978. Use of Harpacticoid copepod in toxicity test. Marine Pollution Bulletin 9. 238-241.

BENGTSSON, B.E., (1981). The harpacticoid *Nitocra spinipes* (Crustacea) as a test organism in brackish water toxicological bioassays. INSERM 106,42 1-430.

BENGTSSON, B.E., 1987. Flowthrough Fecundity Test with *Nitocra spinipes* (Harpacticoidea Crustacea) for Aquatic Toxicity. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 14,260-268 .

BENGTSSON, B.-E., AND BERGSTROM, B. (1982). Toxicity test with *Nitocra spinipes* (Crustacea) and some metals released from a smelter industry. In Coastal Research in the Gulf of Bothnia (K. Muller, Ed.), pp. 439-444. Junk, The Hague.

BOYD, P.W.; ELLWOOD, M.J. The biogeochemical cycle of iron in the ocean. Nature Geoscience, 3, pp. 675 – 682, 2010.

BRASIL, IBAMA, Relatório Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. Novembro de 2015. 38 pag.

BRASIL, Resolução CONAMA nº357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U. 18/03/2005

BRASIL, Resolução CONAMA nº430, de 13 de maio de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, Edição nº 92 de 16/05/2011.

BRYAN, G.W., LANGSTON W.J., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries – a review. Environ. Pollut. 76. 89-131.

BURT, J., AKINS, P., LATHAM, E., BECK, M., SALOMAN, A., BAN, N., 2014. Marine Protected Area Network Design Features that Support Resilient Human–Ocean Systems. pp. 1–159 (Retrieved from <http://www.sfu.ca/coastal/research-series/listing/marineprotected-area-network-design-features-that-support-resi.html>).

CAMARGO, J.B.D.A., CRUZ, A.C.F., CAMPOS, B.G., ARAUJO, G.S., FONSECA, T.G., ABESSA, D.M.S., 2015. Use, development and improvements in the protocol of whole-sediment toxicity identification evaluation using benthic copepods. *Marine Pollution Bulletin*. 91, 511-517

CETESB – Norma Técnica L5.251: Água do Mar, teste de toxicidade aguda com *Mysidopsisjuniae* Silva, 1979 (crustácea: mysidacea) Método de ensaio. 19 pag. 1992.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo. 1997.

CHAPMAN, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the eco into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 7-15.

CHECKLEY, D. M. JR (1980a). The egg production of a marine planktonic copepod in relation to its food supply: laboratory studies. *Limnol. Oceanogr.* 25: 430-446

CHECKLEY, D. M. JR (1980b). Food limitation of egg production by a marine, planktonic copepod in the sea off southern California. *Limnol. Oceanogr.* 25: 991-998

COLES, J.; MCMAHON, G.; BELL, A.; BROWN, L.; FITZPATRICK, F.; EIKENBERRY, B.; WOODSIDE, M.; CUFFNEY, T.; BRYANT, W.; CAPPIELLA, K. Effects of urban development on stream ecosystems in nine metropolitan study areas across the United States. US Geological Survey Circular, p-1373, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>

CRAIN, C.M., HALPERN, B.S., BECK, M.W., KAPPEL, C.V., 2009. Understanding and managing human threats to the coastal marine environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1162, 39–62. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04496.x>.

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.

DAHMS, H. U., 1986. Zur Biologie Von *Paramphiascella fulvofasciata* (copepoda, harpacticoida). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 40. 267-277.

DAVENPORT, J., DAVENPORT, J.L., 2006. The impact of tourism and personal leisure transport on coastal environments: a review. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 67, 280–292. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2005.11.026>.

DOMINGUES, D.F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos Aquáticos. Cap. 7, p: 153 – 184. 2006. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

EDGAR, G.J., STUART-SMITH, R.D., WILLIS, T.J., KININMONTH, S., BAKER, S.C., BANKS, S., THOMSON, R.J., 2014. Global conservation outcomes depend on marine protected areas with five key features. *Nature* 506 (7487), 216–220. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13022>.

EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4.ed. Washington, D.C.: (EPA - 600/4 - 90/027). 1991.

EVANS, U.R. (1979) *An Introduction to Metallic Corrosion*, Arnold, London, pp. 153.

FALKOWSKI, P.G., BARBER, R.T., and SMETACEK, V.V. 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 281(5374): 200–206. doi:10.1126/science.281.5374.200

FEENSTRA RP, TSENG SC. What is actually stained by rose bengala. *Arch. Ophthalmol.* 1992; 110:984–993. <https://doi:10.1001/archopht.1992.01080190090035>

FONSECA, A.L., A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestris* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. 1991.

FUKUNAGA, A. ANDERSON M.J., WEBSTER-BROWN J.G., 2011. Assessing the nature of the combined effects of copper and zinco n estuarine infaunal communities. *Environ. Pollut.* 159, 116-124.

GIANESELLA S. M. F.; SALADANHA–CORREA, F. M. P.; SOUSA, E. C. P. M.; GASPARRO, M. R. Ecological status of the Santos estuary water column. IN: *Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America*. Neves, R. Baretta, J. W.; Matheus, M. IST Press, Lisboa. 604p. 2008

GOMES, L.E.DE O., CORREA, L.B., SA, F., NETO, R.R., BERNARDINO, A.F., 2017. The impacts of the Samarco mine tailings spill on the Rio Doce estuary, Eastern, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 120, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.056>.

GUERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A.; RAMOS, M.L.L.C. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo. CETESB. 1990.

HALPERN, B.S., WALBRIDGE, S., SELKOE, K.A., KAPPEL, C.V., MICHELI, F., D'AGROSA, C., BRUNO, J.F., CASEY, K.S., EBERT, C., FOX, H.E., FUJITA, R., HEINEMANN, D., LENIHAN, H.S., MADIN, E.M., PERRY, M.T., SELIG, E.R., SPALDING, M., STENECK, R., WATSON, R., 2008. global map of human impact on marine ecosystems. *Science* 319, 948e952.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, Easton, v.11, n.7, p.714-719.

HATJE, V., PEDREIRA, R.M.A., DE REZENDE, C.E. et al. The environmental impacts of one of the largest tailing dam failures worldwide. *Sci Rep* 7, 10706 (2017) doi:10.1038/s41598-017-11143-x

HUGHES, T.P., CARPENTER, S., ROCKSTRÖM, J., SCHEFFER, M., WALKER, B., 2013. Multiscale regime shifts and planetary boundaries. *Trends Ecol. Evol.* 28 (7), 389–395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.019>.

HUNTLEY, M., BOYD, C. (1984). Food-limited growth of marine zooplankton. *Am. Ndt.* 124: 455-478

HUYS, R., GEE, J.M.; MOORE, C.G. & HAMOND, R. 1996. Marine and brackish water harpacticoid copepods part 1. FSC Publications, Shrewsbury.

INGERSOLL C.G. , 2003 Sediment test G.M. Rand (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, Taylor & Francis, New York, NY (2003), pp. 231-255

ISO, Water quality—determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO 14469. 1999. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.

JOBLING, S. & SUMPTER, J. P. (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372

JOYEUX J-C, CAMPANHA FILHO EA, JESUS HC. Trace metal contamination in estuarine fish from Vitoria Bay, ES, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 765-774.2004

KRULL M., ABESSA D. M.S., HATJE V., BARROS F., Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 106, 2014, Pages 195-203, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.038>.

LANG, K. (1948). *Monographie der Harpacticiden*, Vols. I, II. Ohlsson, Lund.

LE CORNU, E., KITTINGER, J.N., KOEHN, J.Z., FINKBEINER, E.M., CROWDER, L.B., 2014. Current practice and future prospects for social data in coastal and ocean planning. *Conservation biology*. *J. Soc. Conserv. Biol.* 28 (4), 902–911. <http://dx.doi.org/10.1111/cobi.12310>.

LOTUFO G.R., ABESSA D.M.S., Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos, in: I.A. Nascimento, E.C.P.M. Souza, M.G. Nipper (Eds.), *Métodos De Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*, Artes Gráficas e Indústria Ltda, São Paulo, 2000, pp.151–162.

LOTUFO, G. R.; ABESSA, D.M. S. 2002. 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, p. 151-162.

LOTUFO, G.R. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. *Aquatic Toxicology*. 44 (1-2): 17-30. 1998.

M. WENHOLZ, R. CRUNKILTON, 1995 Use of toxicity identification evaluation procedures in the assessment of sediment pore water toxicity from an urban stormwater retention pond in Madison, Wisconsin Bull. Environ. Contam. Toxicol., 54 (1995), pp. 676-682

MAGALHÃES, D. P.; Ferrão Filho, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brás.*, 355-381, 2008.

MAGRIS, R.A., PRESSEY, R.L., WEEKS, R., BAN, N.C., 2014. Integrating connectivity and climate change into marine conservation planning. *Biol. Conserv.* 170, 207–221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.032>.

MARISA I. BATISTA, SOFIA HENRIQUES, MIGUEL P. PAIS, HENRIQUE N. CABRAL. Assessment of cumulative human pressures on a coastal area: Integrating information for MPA planning and management, *Ocean & Coastal Management*, Volume 102, Part A, 2014, Pages 248-257, ISSN 0964-5691, <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.09.020>.

MARTIN, J. H.; W.W. BROENKOW. 1989. VERTEX: Phytoplankton/iron studies in the Gulf of Alaska. *Deep-Sea Res.* 36: 649-680.

MAUCLINE, J. The biology of calanoid copepods. *Advances in marine biology* 33:1-710. 1998.

MAUCLINE, J. The biology of mysids and euphausiids. In: BLAXTER, J.; RUSSEL, F.; YOUNGE, M. *Advances in Marine Biology*. London: Academic Press. v. 18, p. 68, 1980.

MAUCLINE, J.; MURANO, M. World list of Mysidacea, Crustacea. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*. v. 64, p. 39-88, 1977.

MCLAREN. I. A. (1965). Some relationships between temperature and egg size, body size, development rate, and fecundity of the copepod *Pseudocalanus*. *Lunnol. Oceanogr.* 10: 528-538

MESKHIDZE, N.; HURLEY, D.; ROYALTY, T.M.; JOHNSON, M.S. Potential effect of atmospheric dissolved organic carbon on the iron solubility in seawater *Marine Chemistry*, 194, pp. 124-132, 2017.

MIRANDA, L. S. & MARQUES, A., 2016 Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna - An example from the staurozoans (Cnidaria). *Biota Neotropica*. 16. doi: 10.1590/1676-0611-BN-2016-0169.

MOFFETT, J. W., AND R. G. ZIKA. 1987. Reaction kinetics of hydrogen peroxide with copper and iron in seawater. *Environ. Sci. Technol.* 21: 804-810.

MORAES, E. C. F.; SZNELWAR, R. B.; FERNICOLA, N. A. G. Manual de Toxicologia Analítica. São Paulo: Livraria Roca, 229 p. 1991.

MOREL, F.M.M., and PRICE, N.M. 2003. The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science*, 300(5621): 944–947. doi:10.1126/science.1083545.

MOREL, F.M.M., HUDSON, R.J., and PRICE, N.M. 1991. Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 36(8): 1742–1755. doi:10.4319/lo. 1991.36.8.1742

NICKELS, C. F., OHMAN, M. D., CCEIII: Persistent functional relationships between copepod egg production rates and food concentration through anomalously warm conditions in the California Current Ecosystem, Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, Volume 140, Pages 26-35, 2018, ISSN 0967-0637, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2018.07.001>.

NILIN, J., MOREIRA, L.B., AGUIAR, J.E., MARINS, R., ABESSA, D.M. DE S., LOTUFO, T.M. DA C., COSTA-LOTUFO, L.V., 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: the case of Ceara River, Northeastern Brazil. *Mar. Environ. Res.* 91, 89 - 96.

NIPPER, M.; CARR, R.S.; BIEDENBACH, J.M.; HOOTEN, R.L.; MILLER, K. Fate and effects of picric acid and 2,6-DNT in marine environments: Toxicity of degradation products. *Marine Pollution Bulletin.* 50: 1205-1217. 2005.

NORWOOD, W. P., et al. Effects of metal mixtures on aquatic biota: A Review of observations and methods. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, v. 9, n. 4, p. 795-811, 2003.

NOWELL, L.; MORAN, P.; GILLIOM, R.; CALHOUN, D.; INGERSOLL, C.; KEMBLE, N.; KUIVILA, K.; PHILLIPS, P. Contaminants in stream sediments from seven United States metropolitan areas: part I: distribution in relation to urbanization. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v.64, n.1, pp.32-51, 2013.

PAFFENHOFER, G.-A., HARRIS, R. P. (1976). Feeding, growth and reproduction of the marine planktonic copepod *Pseudocalanus elongatus* Boeck. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 56: 327-344

PEREIRA R.C., SOARES-GOMES, A., *Biologia Marinha*. Editora Interciência, Rio de Janeiro, RJ (2002), p. 382

POTTS T., BURDON D., JACKSON E., ATKINS J., SAUNDERS J., HASTINGS E., LANGMEAD O., Do marine protected areas deliver flows of ecosystem services to support human welfare?, *Marine Policy*, Volume 44, 2014, Pages 139-148, ISSN 0308-597X, <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2013.08.011>.

POTTS, T., BURDON, D., JACKSON, E., ATKINS, J., SAUNDERS, J., HASTINGS, E., LANGMEAD, O., 2014. Do marine protected areas deliver flows of ecosystem services to support human welfare? *Mar. Policy* 44, 139–148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpol.2013.08.011>.

POWER, E.; CHAPMAN, P. Assessing sediment quality. IN: BURTON JR, G. A. (Ed.). *Sediment Toxicity Assessment*. Chelsea, Lewis Publishers, Inc., 1-18. 1995.

- PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R. & SUMPTER, J. P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatments works. *Chemistry and Ecology*, 8:275-285.
- RAISWELL, R., CANFIELD, D.E. 2012. The Iron Cycle: Biogeochemistry and Mineralogy. In *Geochemical Perspectives. The Iron Biogeochemical Cycle Past and Present*. European Association of Geochemistry, v.1, n.1, pp. 12-18.
- RAMÍREZ, L.; MARTINEZ, M. T.; ZAPARETO, J.; HERRANZ, M.C. Incidência sanitária y evaluación toxicológica de alumínio (Al), Mercúrio (Hg), Plomo (Pb) y Arsênico (As). *Alimentária*, v. 186 (out), p. 67-70, 1987
- RAND, G. M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. 2ed., Taylor & Francis, Washington.DC, p.1125, 1995.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, SR . *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. Washington USA, Hemisphere Publishing. 1985.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Washington. 665 p., 1985.
- RAVELO-PÉREZ, L.M.; RODRÍGUEZ, S.; GALINDO, L.; GARCÍA, M.I.; ALASTUEY, A.; LOPEZ-SOLANO, J. Soluble iron dust export in the high altitude Saharan Air Layer. *Atmospheric Environment*, 133, pp. 49-59, 2016.
- RODRIGUES, A. S., DE, L., MALAFAIA, G., COSTA, A. T. & NALINI, H. A. JR. Evaluation of the mineral exploration influence on sediment composition in the Gualaxo do Norte River Basin (MG-Brazil) based on geochemical and stratigraphic data. *Environ. Earth Sci.* 68, 965–972 (2013).
- RODRIGUES, S.K., ABESSA, D.M.S., MACHADO, E.C., 2013. Geochemical and ecotoxicological assessment for estuarine surface sediments from Southern Brazil. *Mar. Environ. Res.* 91, 68-79.
- RUPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- SAINT-HILAIRE, AUGUSTE. 1830. *Voyage dans les provinces de Rio de Janeiro et de Minas Gerais*. Paris, Grimbert et Dorez, 2 vols.
- SCHAUER, C.K. and SHRIVER, D.F. (1987) Synthesis and structure of $[(PPh_3)_2N][Fe_3Mn(CO)_4]^{12}$ (μ_4-O): A butterfly oxo-cluster. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 26, 255-256.
- SCHUBAUER-BERIGAN MK, DIERKES JR, MONSON PD, ANKLEY GT (1993) pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca*, and *Lumbriculus variegatus*. *Environ Toxicol Chem* 12:1261–1266
- SCHWARZENBACH R. P., et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313(5790):1072–1077. 2006
- SEDLACEK, C., MARCUS, N. H., Egg production of the copepod *Acartia tonsa*: The influence of hypoxia and food concentration, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 318, Issue 2, , Pages 183-190, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.012>.

SERIANI R., SILVEIRA F.L., ROMANO P., PINNA F.V., ABESSA D.M.S., Toxicidade de água e sedimentos e comunidade bentônica do estuário do rio Itanhaém, SP, Brasil: bases para a educação ambiental *O Mundo da Saúde*, 30 (2006), pp. 628-633

SHAILAJA M. S., D'SILVA C., Evaluation of impact of PAH on tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53: 835-841. 2003
DOI: [10.1016/s0045-6535\(03\)00667-2](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(03)00667-2)

SILVA, V. M. A. P da. *Mysidopsisjuniae*, nova espécie de Crustacea-Mysidacea. Departamento de Zoolgia, avulso nº30. Instituto de Biologia do Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1979.

SILVER, J. 1993. Introduction to iron chemistry. In *Chemistry of iron*. 1st ed. Springer, Dordrecht, Netherlands. 315p. doi:10.1007/978-94-011-2140-8

TARKPEA, M., HANSSON, M., SAMUELSSON, A., 1986. Comparison of the microtox test with the 96-hr LC50 test for the harpacticoid *Nitocra spinipes*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 11, 127–143.

UNESCO. IOC, SCOR and IAPSO, 2010: The international thermodynamic equation of seawater – 2010: Calculation and use of thermodynamic properties. Intergovernmental Oceanographic Commission, Manuals and Guides No. 56, 196 pp.

VIDAL, J., 1980. Physioecology of zooplankton: I. Effects of phytoplankton concentration, temperature, and body size on the growth rate of *Calanus pacificus* and *Pseudocalanus* sp. *Mar. Biol.* 56, 111 – 134.

VIDAL, J.: Physioecology of zooplankton. I. Effects of phytoplankton concentration, temperature, and body size on the growth rate of *Calanus pacificus* and *Pseudocalanus* sp. *Mar. Biol.*, 56, 111–134 (1980a)

VILLASANTE, S., MACHO, G., ANTELO, M., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, D., KAISER, M.J., 2013. Resilience and challenges of marine social-ecological systems under complex and interconnected drivers. *Ambio* 42 (8), 905–909. <http://dx.doi.org/10.1007/s13280-013-0450-2>.

VOIETTA, F. & MOLEDO, DENIS & ABESSA, DENIS & CAMILO, SÃO & SERIANI, ROBSON & SILVEIRA, FABIANA & ROMANO, PRISCILLA. (2006). Toxicidade de água e sedimentos e comunidade bentônica do estuário do rio Itanhaém, SP, Brasil: bases para a educação ambiental.

WEINBERG, E. D. 1989. Cellular regulation of iron assimilation, *Q. Rev. Biol.* 64: 261-290.

WERNERSSON, A., DAVE, G., NILSSON, E., 1999. Combining sediment quality criteria and sediment bioassays with photo activation for assessing sediment quality along the Swedish West Coast. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 2 ,379–389.

WHITE, J.R., and ROMAN, M.R., (1992) Egg production by the calanoid copepod *Arcatia tonsa* in the mesohaline Chesapeake Bay, the importance of food resources and temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86, 239-249.

WHITE, J.R., ROMAN, M.R., 1992. Egg-production by the calanoid copepod *Acartia tonsa* in the mesohaline Chesapeake Bay—the importance of food resources and temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 86 (3), 239–249.

WOOD CM, FARRELL T, BRAUNER C. 2011. *Fish Physiology: Homeostasis and toxicology of Essential Metals*, 1st Edition. Academic Press, New York, USA.

WORM, B., BARBIER, E.B., BEAUMONT, N., DUFFY, J.E., FOLKE, C., HALPERN, B.S., WATSON, R., 2006. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314 (5800), 787–790. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1132294> (New York, N.Y.).

WULFF, F. 1972. Experimental studies on physiological and behavioural response mechanism of *Nitocra Spnipes* (Crustacea: Harparticoidea) from brackish-water rockpools. *Marine Biology* 13, 325-329.

YANG, J.; CHEN, L.; LIU, L.Z; SHI, W.L; MENG, X.Z. Comprehensive risk assessment of heavy metals in lake sediment from public parks in Shanghai. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 102, p.129-135, 2014.

ZAGATTO P.; BERTOLETTI E. *Ecotoxicologia Aquatica: Princípios e Aplicações*. Ed RiMa, São Carlos. 2006

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI E. (EE) *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. 3.ed. Rima, 2014. p. 472.

ZAKREWSKI, S. F. *Principles of environmental Toxicology*. American Chemical Society, 1991. 270 p.

ZARONI, L.P. *Avaliação da qualidade dos sedimentos marinhos e estuarinos no município de Bertioga – SP*. São Paulo. 2006. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. (tese de doutorado). 211p.

ANEXOS

DADOS CONTABILIZADOS AO FIM DO TESTE

TESTE - D	I	II	III	IV	TOTAL
Fêmea Ovada	11	5	17	5	38
Macho	8	19	14	24	65
Fêmea	10	23	18	29	80
Copepodito 6 M	4	5	7	3	19
Copepodito 6 F	7	9	11	6	33
Copepodito 2-5	46	56	68	37	207
Nauplio	51	65	86	30	232
Macho Morto	1	2	3	2	8
Fêmea Morta	7	11	9	10	37
Juvenil Morto	12	15	12	9	48

TESTE - C	I	II	III	IV	TOTAL
Fêmea Ovada	15	19	4	19	57
Macho	5	3	6	21	35
Fêmea	19	11	25	84	139
Copepodito 6 M	2	2	3	3	10
Copepodito 6 F	6	6	5	8	25
Copepodito 2-5	37	33	32	50	152
Nauplio	86	63	27	20	196
Macho Morto	1	1	1	2	5
Fêmea Morta	7	6	10	16	39
Juvenil Morto	10	10	20	15	55

TESTE - B	I	II	III	IV	TOTAL
Fêmea Ovada	14	31	12	9	66
Macho	3	6	8	5	22
Fêmea	25	37	56	37	155
Copepodito 6 M	1	3	2	1	7
Copepodito 6 F	12	17	9	8	46
Copepodito 2-5	47	62	33	31	173
Nauplio	12	51	26	13	102
Macho Morto	1	0	0	0	1
Fêmea Morta	5	17	8	15	45
Juvenil Morto	5	14	8	9	36

TESTE - A	I	II	III	IV	TOTAL
Fêmea Ovada	18	24	37	21	100
Macho	1	3	4	4	12
Fêmea	46	32	29	40	147
Copepodito 6 M	2	1	1	2	6
Copepodito 6 F	4	12	11	8	35
Copepodito 2-5	36	54	62	45	197
Nauplio	56	96	121	139	412
Macho Morto	0	1	1	0	2
Fêmea Morta	8	14	11	9	42
Juvenil Morto	9	7	7	8	31

CONTROLE	I	II	III	IV	TOTAL
Fêmea Ovada	27	25	30	34	116
Macho	2	3	6	7	18
Fêmea	31	32	72	90	225
Copepodito 6 M	2	3	3	3	11
Copepodito 6 F	4	5	7	6	22
Copepodito 2-5	33	99	106	71	309
Nauplio	125	145	140	126	536
Macho Morto	9	5	7	7	28
Fêmea Morta	17	10	13	14	54
Juvenil Morto	2	2	1	0	5

TOTAL	CTR	A	B	C	D
FÊMEAS	116	90	66	54	38
OVOS Prod.	1561	1233	953	765	539
OVOS Fec.	788	627	413	370	342
Ovos N Fec	773	606	540	395	197

MÉDIA	CTR	A	B	C	D
Total de Ovos	390	308	238	191	135
Ovos Fecundados	197	157	103	93	86
Não Fecundados	193	152	135	99	49