



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

**USO DE *Mysidopsis juniae* NA ANÁLISE DA TOXICIDADE DOS METAIS ZINCO  
E NÍQUEL.**

**LÍVIA PITOMBEIRA DE FIGUEIRÊDO**

FORTALEZA

2013

**LÍVIA PITOMBEIRA DE FIGUEIRÊDO**

**USO DE *Mysidopsis juniae* NA ANÁLISE DA TOXICIDADE DOS METAIS ZINCO  
E NÍQUEL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Análise de Impactos Ambientais da Região Costeira.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa-Lotufo

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jeanylle Nilin

Fortaleza-CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Rui Simões de Menezes

---

F491u Figueiredo, Livia Pitombeira de.

Uso de *Mysidopsis juniae* na análise da toxicidade dos metais zinco e níquel / Livia Pitombeira de Figueiredo. – 2013.  
82 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2013.  
Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.  
Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Veras Costa-Lotufo.  
Co-Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jeanylle Nilin.

1. Níquel - Toxicologia. 2. Zinco - Toxicologia. 3. Crustáceo. I. Título.

---

CDD 571.954 3

**LÍVIA PITOMBEIRA DE FIGUEIRÊDO**

**USO DE *Mysidopsis juniae* NA ANÁLISE DA TOXICIDADE DOS METAIS ZINCO  
E NÍQUEL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Análise de Impactos Ambientais da Região Costeira.

Dissertação aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Veras Costa Lotufo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jeanylle Nilin  
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rozane Valente Marins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira  
Universidade Federal do São Paulo (UNIFESP)

Aos meus pais, Luzia Lopes Pitombeira de Figueirêdo e Antônio Irisvaldo de Figueirêdo, pelo amor incondicional de sempre. Amo vocês.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e pelas maravilhas realizadas dia a dia em minha vida, obrigada!

Aos meus pais, Luzia e Irisvaldo, pelo completo apoio de uma vida inteira que me ensinaram absolutamente tudo. Modelos de pais e pessoas, sem eles nada disso seria possível, obrigada!

A minha orientadora linda e magra, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Letícia Veras Costa-Lotufo, pelo seu incansável fôlego em nos tornar cientistas éticos e felizes, obrigada!

A minha amiga e co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jeamylyle Nilin por depois de tantos anos nunca desistir de mim e por ter me feito querer ser sempre melhor, obrigada!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rozane Valente por ter aceito o convite de participar da banca, obrigada!

Ao Prof. Dr. Camilo Dias por ter vindo de tão longe contribuir com esse trabalho, obrigada!

A Dra. Susana Loureiro, por sua paciência e dedicação, sem sua ajuda o capítulo dos mistérios das misturas jamais seria desvendado, obrigada!

Aos amigos, família que escolhi, ecotoxicólogos do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha da Universidade Federal do Ceará. Aqui, também estão incluídos os nem tão ecotoxicólogos assim, microbiologista, que vão descobrir ainda a cura do câncer, tenho certeza, e aqueles que um dia fizeram parte disso, mas não estão mais entre nós. Janisi Aragão, Paula Jimenez, Isabelle Arthaud, Marcionília Pimentel, Lucas Buruaem, Lígia Borges, Elthon Góis, Karine Pires, Marcela Davanso, Renan Daku, Larissa Guimarães, Bianca Del Bianco, Paula Abreu, Janaína Bernardo, Allyson Queiroz, Évila Damasceno, Andressa Pâmela, Karla Nayara, Luordes Larissa, Luana Araújo, Ivna Vasconcelos, Breno Teles e Rafael Vieira, cada um de vocês são essenciais para fazer esse laboratório ter essa mágica inexplicável de cativar e

apaixonar a todos fazendo ninguém querer ir embora. Amo cada um vocês! Vocês vão comigo aonde eu for, obrigada!

Aos vizinhos de laboratório, sintam-se todos citados, LECA e EQUAL, por uma convivência sempre harmoniosa e feliz por tantos anos, obrigada!

Aos meus colegas de mestrado, que mesmo pelo pouco convívio, estiveram junto de mim, obrigada!

Aos funcionários do LABOMAR, obrigada!

Aos meus queridos misidáceos, que por tantos anos foram fieis a mim e fizeram esse trabalho possível, suas mortes não foram em vão, obrigada!

A minha amiga Fabiann Lucena, por me escutar e nunca me deixar desistir, obrigada!

A minha família por ter tanto orgulho de mim. Em especial a minha tia Irismar Figueirêdo (*in memoriam*), que mesmo não estando aqui para viver tudo isso, sempre foi um exemplo de garra e determinação, obrigada!

As minhas amigas de infância, Isadora, Camila, Rebeca, Priscila , Carol, Daniele e Germana por me fazerem entender que uma andorinha só não faz verão, mas juntas..., obrigada!

Aos amigos que fiz durante essa caminhada, Socorro, Buda, Chagas, Terezuda, Cris, Gleire, Fred, Aurinice, dentre outros, obrigada!

Ao meu amor, companheiro, namorado e quiça filho, José André Cavalcante Siva, por estar sempre ao meu lado, para rir, para chorar, e principlamente para sonhar, obrigada!

E por fim a CAPES, pela bolsa de mestrado que sempre no quinto dia útil do mês fez minha alegria, obrigada!

## RESUMO

Ao longo do anos, os mais variados poluentes vem sendo lançados no meio ambiente, isoladamente ou em misturas, causando danos a biota. Dentre os poluentes mais comuns estão os metais, muitos destes com elevada toxicidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal determinar a toxicidade dos metais zinco e níquel, isolados e em misturas, utilizando o microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae* como modelo. Para isso, foram utilizados 3 protocolos distintos: um para avaliar a toxicidade aguda dos metais isolados e em misturas (organismos de 1-8 dias de vida, triplicata, 10 organismo/réplica, 96h de duração e análise da letalidade através do cálculo da concentração letal a 50% dos organismos ( $CL_{50}$ ); outro para avaliar a toxicidade crônica com base no crescimento (organismos <24 horas de vida, quadruplicata, 5 organismo/réplica, 7 dias de duração e análise do comprimento e peso seco) e, um terceiro, para avaliar a toxicidade crônica com base nos efeitos sobre a fecundidade (organismos 10 dias de vida, quadruplicata, 5 organismo/réplica, 7 dias de duração e análise do número de fêmeas com ovos). Os dados das misturas foram trabalhados segundo os modelos conceituais de Adição da Concentração (CA) e Ação Independente (IA). A  $CL_{50}$  para o zinco e o níquel, isoladamente, foi de  $0,24 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,18 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Para os experimentos de misturas foi observado efeito na letalidade dos organismos, com toxicidade aditiva para todas as concentrações testadas, sendo os dados melhores descritos pelo modelo CA. A letalidade, o comprimento e o peso seco de *M. juniae* foram afetados pela exposição crônica ao zinco, enquanto que para o níquel apenas o peso seco não variou significativamente. O comprimento mostrou-se mais sensível do que os outros parâmetros analisados aos metais testados. Os efeitos na reprodução não foram analisados, uma vez que a letalidade se sobrepõe a esse parâmetro. Sendo assim, os metais analisados mostraram um padrão de aditividade em *Mysidopsis juniae*, que apresentou-se bastante sensível aos metais zinco e níquel, principalmente quando avaliado no protocolo crônico de curta duração, proposto neste trabalho, viabilizando a utilização desses parâmetros e dessa espécie em estudos futuros.

**Palavras- chaves:** Letalidade; Comprimento; Peso Seco; Fecundidade; Misturas binárias.



## ABSTRACT

Over the years, a range of pollutants has been released into the environment, forming complex mixtures and causing damage to the biota. Metals are among the most common pollutants that have a high toxicity effect. The present study aims to assess nickel and zinc toxicity, isolated and in mixtures, using the marine microcrustacea *Mysidopsis juniae* as a model. Three different protocols were applied: first the acute toxicity tests of metals isolated and in mixtures (10 organisms per jar with 1-8 days of life, triplicate, 96h, lethality assessed by calculating the LC<sub>50</sub>); second chronic toxicity tests based on growth (5 organisms per jar with <24 hours of life, quadruplicate, 7 days, length and dry weight were the endpoints); and finally chronic toxicity tests based on fecundity effects (5 organisms per jar with 10 days of life, quadruplicate, 7 days, the number of females with eggs was the endpoint). The mixtures data were analysed according to the conceptual models of Concentration Addition (CA) and Independent Action (IA). The LC<sub>50</sub> for zinc and nickel was  $0,24 \pm 0,02 \text{ mg. L}^{-1}$  and  $0,18 \pm 0,04 \text{ mg. L}^{-1}$ , respectively. The mixtures assays presented acute effect, the additive toxicity to any concentration tested, and the data model best described by CA. The lethality, length and dry weight of *M. juniae* were affected by chronic exposure to zinc and nickel, exception was the dry weight of nickel exposure that showed no significant difference. The length was the most sensitive endpoint analyzed. On the other hand, the reproductive effects could not be analysed due to the lethality overlapped this parameter in tests. Thus, the metals analyzed presented an additivity pattern which proved to be very sensitive to zinc and nickel, especially when evaluated in the short chronic protocol proposed in this work, which enables the use of the parameters and the specie in future studies.

**Keywords:** lethality, length, dry weight, fertility, binary mixtures.

## LISTA DE ABREVIACOES

ABREVIACO	DESCRICÃO
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BF	Fator de bioacumulação
CA	Concentração de Adição
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média
CENO	Maior concentração nominal da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nas condioes de ensaio.
CEO	Menor concentração nominal da amostra que se observa efeito estatisticamente significativo nas condioes de ensaio.
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal a 50% dos organismos testados
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DNPM	Departamento Nacional de Produção Mineral
DSS	Dodecil Sulfato de Sódio
IA	Ação Independente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LPO	Peroxidação lipídica
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MoA	Modo de Ação
OD	Oxignio dissolvido
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
UT	Unidade tóxica

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-1.** Mapa das cidades com mais de 20 mil habitantes nos anos de 1970- esquerda e de 2010- direita, representando o crescimento da ocupação das zonas costeiras do Brasil. .... 16
- Figura 2-1.** *Mysidopsis juniae* imaturo. .... 26
- Figura 2-2.** Média da Concentração Letal a 50% dos organismos ( $CL_{50}$ ) dos experimentos realizados com os metais zinco e níquel frente ao *Mysidopsis juniae* após 96 horas de duração. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. .... 34
- Figura 2-3.** Análise do efeito da mistura binária de zinco e níquel na letalidade de *Mysidopsis juniae* usando o A- modelo concentração de adição (CA) e o B- modelo ação independente (IA). (Isoblograma 2D). .... 36
- Figura 3-1.** Caminhos das perturbações físicas e químicas pelos quais esses efeitos alcançam o nível ecossistema. .... 44
- Figura 3-2.** Comprimento total de *Mysidopsis juniae*. .... 49
- Figura 3-3.** Diferenciação sexual de *Mysidopsis juniae*, aumento de 10x. A- macho. B- Fêmea com ovos no marsúpio. C- Fêmea com ovo no oviduto. D- Fêmea imatura, com marsúpio em desenvolvimento. .... 51
- Figura 3-4.** Letalidade, em 96 horas e 7 dias, de 4 experimentos com *Mysidopsis juniae* para experimentos realizados com zinco- A e como níquel – B (média  $\pm$  desvio padrão). .... 54
- Figura 3-5.** Comprimento de *Mysidopsis juniae*, com idade inferior a 24h de vida, (média  $\pm$  desvio padrão) após 7 dias de exposição ao zinco- A e ao níquel- B (4 experimentos). \* diferença significativa do controle ( $p \leq 0,05$ ). .... 56
- Figura 3-6.** Peso seco de *Mysidopsis juniae*, com idade inferior a 24h de vida, (média  $\pm$  desvio padrão) após 7 dias de exposição ao zinco- A e ao níquel- B (4 experimentos). \* diferença significativa do controle ( $p \leq 0,05$ ). .... 58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2-1.</b> Interpretação dos parâmetros adicionais (a e b) que definem a função de desvio dos modelos conceituais de Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA).. .....	33
<b>Tabela 2-2.</b> Resumo dos efeitos da mistura binária dos metais níquel e do zinco na letalidade de <i>Mysidopsis juniae</i> .....	37
<b>Tabela 2-3.</b> Valores de CL <sub>50</sub> para o zinco em diferentes grupos de animais marinhos, calculadas em tempos de exposição distintos. ....	39
<b>Tabela 2-4.</b> Valores de CL <sub>50</sub> para o níquel em diferentes grupos de animais marinhos, calculadas em tempos de exposição distintos.....	40
<b>Tabela 3-1.</b> Média da Concentração Letal a 50% dos Organismos testados dos 4 experimentos realizados com zinco e níquel, após 7 dias de duração com <i>M. juniae</i> . * diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), através de teste <i>T</i> de Student.....	53
<b>Tabela 3-2.</b> Resumo da fecundidade das fêmeas dos três experimentos realizados com <i>M. juniae</i> , de dez dias de vida, expostas ao zinco durante sete dias. ....	59

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 2-1.</b> Resumo das condições de cultivo de <i>M. juniae</i> .....	28
<b>Quadro 2-2.</b> Resumo das condições para o teste de toxicidade aguda com <i>M. juniae</i> .....	29
<b>Quadro 2-3.</b> Combinações binárias, unidades tóxicas (UT) e concentrações (mg.L <sup>-1</sup> ) de zinco e níquel que foram testadas utilizando <i>M. juniae</i> .....	31
<b>Quadro 3-1.</b> Resumo das condições para o teste de toxicidade crônica de curta duração com <i>M. juniae</i> .....	50
<b>Quadro 3-2.</b> Normas para testes ecotoxicológicos formuladas por instituições brasileiras.....	61

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DOS METAIS ZINCO E NÍQUEL, ISOLADOS E EM MISTURAS, EM <i>MYSIDOPSIS JUNIAE</i></b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Fundamentação teórica</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>24</b>
2.2.1	Objetivo Geral.....	24
2.2.2	Objetivos Específicos .....	24
<b>2.3</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>26</b>
2.3.1	Reagentes .....	26
2.3.2	Organismo Teste .....	26
2.3.3	Manutenção e cultivo dos organismos-teste .....	27
2.3.4	Procedimento para o Teste de Toxicidade Aguda dos Metais Isolados. ...	28
2.3.5	Procedimento para o Teste de Toxicidade da Mistura Binária dos Metais Zinco e Níquel. ....	29
2.3.6	Aceitabilidade para o Teste de Toxicidade da Mistura Binária dos Metais Zinco e Níquel .....	30
2.3.7	Parâmetros Físico-Químicos.....	30
2.3.8	Análise Estatística .....	31
<b>2.4</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>34</b>
2.4.1	Parâmetros físico-químicos .....	34
2.4.2	Exposição aos Metais Isolados .....	34
2.4.3	Exposição à Mistura Binária dos Metais .....	35
<b>2.5</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>38</b>
<b>2.6</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>BIOENSAIO CRÔNICO COM <i>MYSIDOPSIS JUNIAE</i>: ANÁLISE DA LETALIDADE, COMPRIMENTO, PESO SECO E FECUNDIDADE FRENTE AOS METAIS ZINCO E NÍQUEL</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Fundamentação teórica</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>46</b>
3.2.1	Objetivo Geral.....	46
3.2.2	Objetivos específicos.....	46
<b>3.3</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>47</b>
3.3.1	Organismo teste .....	47
3.3.2	Manutenção e cultivo dos organismos-teste .....	47
3.3.3	Solução-Estoque .....	47

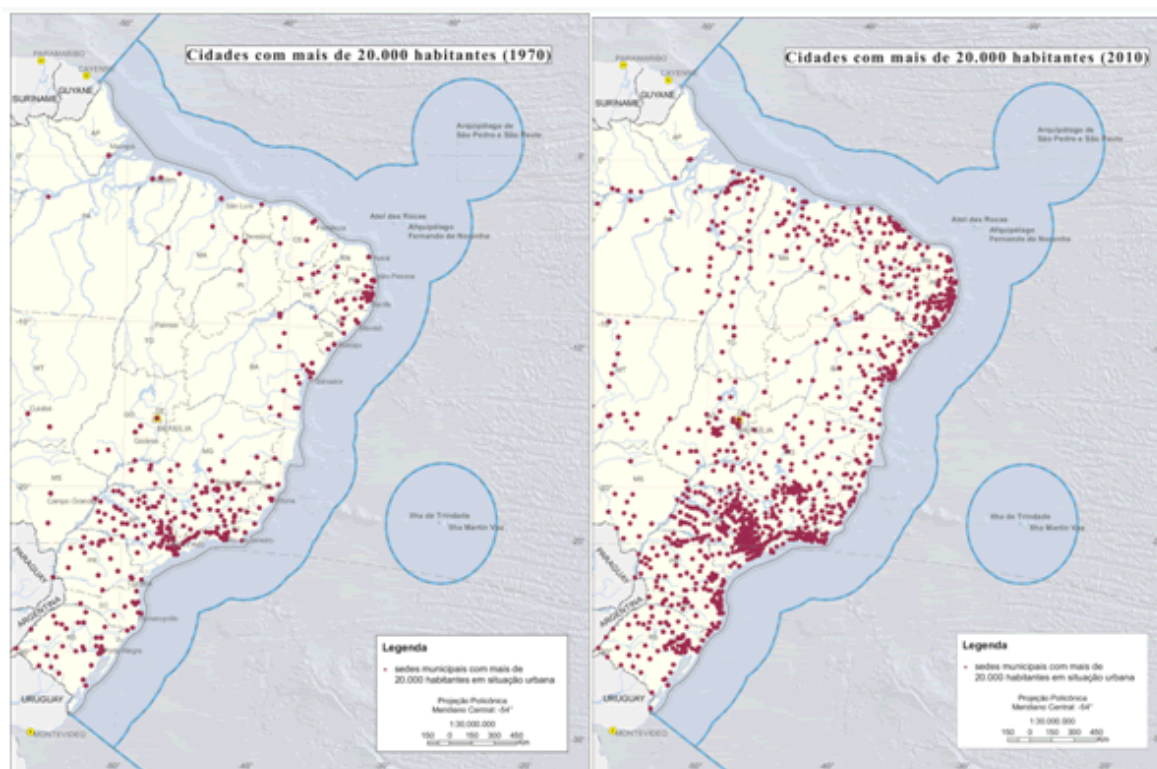
3.3.4	Procedimento do teste.....	47
3.3.4.1	Parâmetros Físico-Químicos.....	47
3.3.4.2	Letalidade, Comprimento e Peso Seco.....	48
3.3.4.3	Fecundidade .....	50
3.3.4.4	Critérios de Aceitabilidade para o Teste Crônico de Curta Duração com <i>M. juniae</i> . .....	52
3.3.5	Análise Estatística .....	52
<b>3.4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>53</b>
3.4.1	Parâmetros físico-químicos .....	53
3.4.2	Letalidade.....	53
3.4.3	Comprimento.....	54
3.4.4	Peso seco.....	57
3.4.5	Fecundidade.....	59
<b>3.5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>3.6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>66</b>
<b>4.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXO(S).....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo dos séculos, os mais variados poluentes vem sendo despejados, seja na atmosfera, nos mares, nos rios e nos solos, e muitos desses mostram-se tóxicos aos organismos, sendo que a maioria desses compostos tem o mar como seu reservatório.

Dentre os ecossistemas afetados o ambiente aquático, sobretudo os localizados nas zonas costeiras, vem sofrendo um considerável processo de degradação que se agrava pela falta de gerenciamento ambiental dessas áreas bem como pelo crescimento industrial e populacional desordenado. Segundo o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2010 (BRASIL, 2011), o Brasil, nesse mesmo ano, apresentou 463 municípios na zona costeira, possuindo 26,6% da população brasileira, o que equivalente a 50,7 milhões de habitantes.

Figura 1-1. Mapa das cidades com mais de 20 mil habitantes nos anos de 1970- esquerda e de 2010- direita, representando o crescimento da ocupação das zonas costeiras do Brasil. (Fonte: IBGE, 2011)



Em 2010, o Ministério do Meio Ambiente listou os principais impactos sofridos pelos nossos ambientes costeiros, sendo eles: sedimentação em zonas costeiras



causada pelo carreamento de sedimentos provenientes da agricultura, principalmente em virtude do desmatamento da mata ciliar; falta de sedimentos, provocado pelo barramento excessivo dos rios; disseminação de espécies invasoras por introdução acidental ou deliberada, colocando em perigo a abundância e sobrevivência de espécies nativas; contaminação das águas continentais por agrotóxicos e fertilizantes usados na agricultura, por resíduos tóxicos industriais e por dejetos humanos sem tratamento ou parcialmente tratados e a sobreexploração, isto é, captura de recursos pesqueiros (peixes, moluscos, crustáceos e algas) (BRASIL, 2010).

Os metais podem ser introduzidos no ambiente tanto por fontes naturais, como através do intemperismo das rochas, ou ainda através de fontes antrópicas, como por exemplo através dos efluentes de indústrias do setor mineral e metal-mecânico como afirma Lemos et al. (2008) e Yabe e Oliveira (1998). Para Volesky (2001), os metais que representam um risco ambiental que merece destaque são, em ordem de prioridade: cádmio, chumbo, mercúrio, cromo, cobalto, cobre, níquel, zinco e alumínio.

A principal característica que diferencia os metais dos outros poluentes é que eles não são biodegradáveis, o que permite que a maioria deles se acumule na cadeia trófica (NIENCHESKI, MILANI; MILANI, 2008). Nos ambientes aquáticos os metais podem se encontrados em solução, na forma de íons hidratados livres ou ainda complexados por ligantes orgânicos e inorgânicos, ou ainda podem ser encontrados associados ao sedimento ou ao material particulado em suspensão (STUMM, 1996).

A contaminação ambiental por metais merece destaque uma vez que esses compostos são persistente e possuem uma elevada toxicidade. Alguns deles, como mercúrio, cádmio e chumbo não possuem função biológica, enquanto que zinco, cobre, níquel e cromo são essenciais às plantas, animais e microorganismos, sendo necessários apenas em pequenas quantidades (SIQUEIRA et al., 1994). Entretanto, mesmo esses metais que são essenciais, quando em altas concentrações, podem ser tornar potencialmente tóxicos causando desnaturação de proteínas, inativação de grupos-SH e bloqueios de sítios de ligação nas enzimas (MACÊDO; MORRIL, 2008).

O zinco é encontrado em todo o meio ambiente (ar, água e solo) podendo ocorrer na forma de sulfetos, associado ao chumbo, cobre, prata e ferro (galena, calcopirita,

argentita e pirita, dentre outros). As reservas brasileiras de minério de zinco são da ordem 102 milhões de toneladas (ano-base 2000), segundo o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). É dos metais mais utilizados na atualidade, devido a sua alta resistência à corrosão, o que permite que seja usado como protetor de aços estruturais, folhas, chapas, tubos e fios. Outra característica peculiar desse metal é a sua grande facilidade de combinação com outros metais o que permite o uso na fabricação de ligas. Além disso, está presente na borracha, óleos aditivos e pigmentos de tintas. Ainda segundo o mesmo órgão, as principais utilizações desse metal são na construção civil, na indústria automobilística e de eletrodomésticos, podendo também ser utilizado em indústrias de material bélico ou ainda em produtos químicos e farmacêuticos, cosméticos, borrachas, explosivos, tintas e papel (BRASIL, 2001).

No ambiente biológico, o zinco pode ser considerado um importante elemento essencial a vida, uma vez que regula a atividade de diversas enzimas. Estima-se que, mais de 300 enzimas no corpo humano necessitam deste metal para o seu correto metabolismo (SARABIA *et al.*, 2008).

Outro metal também utilizado, porém menos estudado, principalmente em relação sua toxicidade, é o níquel. Ele também é utilizado na proteção de peças metálicas, uma vez que oferece grande resistência a oxidação. Suas principais aplicações são no setor industrial, em material militar, em moedas, em transporte/aeronaves, em aplicações voltadas para a construção civil e em diversos tipos de aços especiais. As reservas brasileiras de níquel medidas pelo DNPM totalizam 301.016.980t de minério, concentradas nos Estados de Goiás (75,9%), Pará (14,5%), Piauí (6,7%) e Minas Gerais (3,0%) (BRASIL, 2001).

O níquel é encontrado naturalmente no ambiente, como relatados por Eisler (1998), que encontram valores entre 1 e 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Em pequenas quantidades o níquel é considerado um metal essencial ao crescimento e reprodução de algumas espécies de animais (FRANCO *et al.*, 2006), entretanto, em altas concentrações, como o já encontrado em Sudbury (Ontario, Canadá) valores próximos a 183.000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , torna-se extremamente tóxico, sendo seus compostos, principalmente o óxido de níquel, neurotóxicos, hepatotóxicos, imunotóxicos e (MISRA; RODRIGUEZ; KASPRZAK, 1990) (SPRY; WOOD, 1984; RAINBOW, 2002; VIJAYAVEL *et al.*, 2009).

No Brasil, foram encontrados valores para os metais estudados tanto em água como em sedimento, as concentrações variam para o níquel entre 4,86 a 24,7  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de metal por peso seco de sedimento em diferentes regiões portuárias enquanto que para o zinco os valores foram de 5,0 a 1077,33  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para essas mesmas regiões portuárias e para um importante rio da capital cearense (BURUAEM et al., 2012; NILIN, 2008). Enquanto que na água foram relatados concentrações 0,0003  $\text{mg.L}^{-1}$  para o zinco e de concentrações que variaram de 0,0171 a 0,0174  $\text{mg.L}^{-1}$  para o níquel (BAGGIO, 2008).

Foi exatamente para avaliar o impacto de diversas substâncias químicas aos mais diferentes organismos que surge na década de 1970, pela primeira vez, o conceito de Ecotoxicologia que é definida por Thruhaut (1977) como “a ciência que relaciona os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre os organismos vivos, especialmente em populações e comunidades dentro de um ecossistema definido”. Já Moraes, Sznelwar, Fernicola (1991), a define como a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo.

A partir de então foram desenvolvidas pesquisas que visaram escolher organismos e metodologias, principalmente para cultivo em laboratório, que pudessem ser utilizados em testes de toxicidade, de forma prática, confiável e reprodutível. Nesse período, foi dada maior importância aos testes que buscavam uma maior qualidade e proteção dos corpos d'água.

Segundo Rand e Petrocelli (1985) os testes de toxicidade devem ser realizados com espécies conhecidamente sensíveis e ecologicamente representativas do ambiente, sendo o mais realístico possível, e também com resultados facilmente quantificáveis através da análise estatística. Em suma, é importante que os bioensaios possam prever com maior exatidão os efeitos ambientais de determinado poluente, sendo útil, portanto, para a avaliação de risco.

Entretanto, foi somente nos anos de 1970 e 1980, a partir da conscientização governamental, que houve um aumento, tanto das pesquisas como da criação de laboratórios especializados, em estudar a poluição dos corpos d'água.

No Brasil, a preocupação em relação a toxicidade dos poluentes, principalmente efluentes, sobre a biota aquática e marinha só teve início do final da década de 1980. Em relação a legislação brasileira, a Ecotoxicologia está inserida em três resoluções ambientais produzidas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente –

CONAMA (BRASIL, 2004; 2005; 2011). A primeira delas do ano de 2004, a resolução 344 estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, já a resolução nº 357/2005, dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais, estabelecendo condições e padrões para lançamento de efluentes em meio aquático, enquanto que a resolução nº 430/2011 modifica parcialmente a resolução 357 e complementa com requerimentos específicos para esgotos sanitários, além de incluir mais detalhes sobre requisitos para determinação de toxicidade, como concentração de efeito não observada (CENO), concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) ou concentração efetiva mediana (CE<sub>50</sub>). Contudo, nenhuma das resoluções indicam quais os testes que devem ser executados para cada tipo de corpo d'água ou mesmo qual deve ser a matriz pesquisada, ficando ambas as decisões a critério do órgão fiscalizador local.

Muitos organismos aquáticos podem ser utilizados em testes de toxicidade dentre eles muitos crustáceos, devido a sua fácil obtenção, ciclo de vida rápido e boa reprodutibilidade dos testes. Dentre os crustáceos, os animais da ordem Mysidacea vêm sendo utilizados em bioensaios desde 1970, devido à sua sensibilidade a muitas substâncias tóxicas em baixas concentrações.

Foram descritas cerca de 780 espécies de misidáceos, sendo a maioria espécies marinhas. Existem cerca de 42 espécies de água doce, incluindo as que vive em águas profundas, como a *Mysis relicta* que vive em lagos gelados do norte dos Estados Unidos, Europa e Canadá (RUPPERTS; BARNES, 1993). Algumas espécies como *Mysidopsis bahia* e *Holmesismysis costata*, que são organismos nativos do hemisfério norte, já possuem vários trabalhos publicados com essas espécies, que vão desde descrição, passando pela biologia até a sensibilidade desses animais frente aos mais diversos químicos. Entretanto, quando nos referimos a espécies nativa do Brasil, como o *Mysidopsis juniae*, ainda há muitas lacunas a serem preenchidas, sobre informações básicas, como a biologia e o comportamento, e principalmente no tocante a toxicidade e a sensibilidade a diversas substâncias.

A maioria dos misidáceos são onívoros, capazes de capturar pequenas partículas retiradas do corpo ou ainda de se alimentar de matéria em decomposição. Esses animais estão distribuídos entre as latitudes 80°N a 80°S (TARTTERSALL; TARTTERSALL, 1951; MAUCLINE; MURANO, 1977; MAUCLINE, 1980). Eles

geralmente são encontrados em cardumes com alta densidade de animais (O'BRIEN, 1989).

Segundo Mees, Abdulkerim e Amerlynck (1994), os misidáceos são importantes membros da cadeia alimentar sendo alimento para algumas espécies de peixes e também são predadores de pequenos organismos. Isso faz com que esses animais sejam importantes elos na transferência de energia para os níveis tróficos mais altos na cadeia alimentar.

Essa classe de animais tem sido cultivada em laboratórios e utilizada em teste de toxicidade desde meados da década de 70 devido características como: estar disponível ao longo do ano, são fáceis de coletar e de cultivar no laboratório, possuem um ciclo de vida curto e além do mais como suas fêmeas são marsupiais permitindo estudar os diversos aspectos de sua reprodução (ROAST et al., 1998). Essas apresentam uma bolsa ventral ou marsúpio onde incubam os ovos, a maioria tem de 2 a 30mm de comprimento, mas algumas espécies, como a *Gnathophausai*, podem atingir até 35cm (RUPPERTS; BARNES, 1993).

Então, diante do exposto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a toxicidade dos metais zinco e níquel em *Mysidopsis juniae*, padronizando um protocolo para análise da toxicidade crônica desses metais, bem como estudar o comportamento da misturas desses dois metais através de um modelo matemático. O trabalho foi dividido em dois capítulos, I. Análise da toxicidade aguda dos metais zinco e níquel, isolados e em misturas, em *Mysidopsis juniae* e II. Bioensaio crônico também com *Mysidopsis juniae*: análise da letalidade, comprimento, peso seco e fecundidade frente aos metais zinco e níquel.

## **2 ANÁLISE DA TOXICIDADE AGUDA DOS METAIS ZINCO E NÍQUEL, ISOLADOS E EM MISTURAS, EM *Mysidopsis juniae*.**

### **2.1 Fundamentação teórica**

Com o crescimento industrial e o desenvolvimento das sociedades, vários produtos químicos vêm sendo produzidos e lançados nos diferentes compartimentos ambientais (ar, água e solo), com isso, os seres vivos, de um modo geral, estão expostos constantemente a uma série de misturas de multi-componentes, que possuem diferentes origens e aplicações. Um exemplo básico dessas misturas dos quais estamos expostos vão desde, por exemplo, pesticidas, rações, medicamentos, corantes, ligas e até tintas de impressão, que podem conter mistura de até 60 compostos diferentes (CORNELIS *et al.*, 2011)

A maioria dos estudos ecotoxicológicos, bem como os métodos de regulação para gestão de substâncias tóxicas, entretanto, concentram-se na exposição e nos efeitos de compostos individuais (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008). Na tentativa de prever os efeitos das misturas, alguns modelos teóricos foram desenvolvidos visando estudar o comportamento das misturas. Esses modelos baseiam-se em dois modelos de referência, concentração de adição (CA) proposto por Bliss (1939), e ação independente (IA) proposto por Loewe e Muischenek (1926), que levam em consideração o modo de ação (MoA) das substâncias químicas isoladas.

Para o modelo de concentração de adição (CA) assume-se que os elementos químicos possuem o mesmo modo de ação, e, portanto o mesmo alvo no organismo (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008), onde a toxicidade da mistura é igual à toxicidade somada das substâncias analisadas isoladamente (LOEWE; MUISCHENEK, 1926). Já para o modelo de ação independente as substâncias químicas possuem modos de ação distintos (OLMSTEAD; LEBLANC, 2005), sendo, portanto, os efeitos independentes um do outro e o efeito da mistura é resultado da multiplicação das respostas (BLISS, 1939). Entretanto, outro caso é bastante comum no estudo de misturas, o desconhecimento do modo de ação das substâncias

analisadas. Para essa circunstância os dois modelos, CA e IA, devem ser testados na tentativa de prever os efeitos dessas misturas (LOUREIRO et al., 2010).

Misturas menos complexas, como misturas binárias, normalmente sofrem desvios dos modelos padrões (PAVLAKI et al., 2010). Esses desvios são sinérgicos ou antagônicos, quando os efeitos da mistura são mais ou menos tóxicos, respectivamente, do que a toxicidade das substâncias isoladas (CORNELIS et al., 2011); dependentes das doses isoladamente (do inglês DOSE LEVEL DEPENDENCY), quando a toxicidade da mistura depende das concentrações de cada químico na mistura; e, ainda, dependente da razão das doses (do inglês DOSE RATIO DEPENDENCY), quando a toxicidade da mistura depende dos químicos da mistura (LOUREIRO et al., 2010).

E foi exatamente para avaliar esses desvios que Jonker et al. (2005) desenvolveram o modelo MIXTOX que tem como finalidade avaliar como os dados desviam-se dos modelos de referência e também descrever esses dados de forma significativa através de um conjunto de funções matemáticas.

Estudos pioneiros como os de Könemann (1980), Könemann (1981) e Hermens et al. (1984), a respeito dos efeitos das misturas de vários compostos orgânicos industriais sobre os peixes e dáfnias impulsionaram os trabalhos nessa área e permitiram o desenvolvimento de análises desse tipo.

Trabalhos que analisaram o efeito das misturas de metais em várias espécies de animais, como os de Negilski, Ahsanullah e Mobley (1981) e Kraak, Stuijzand e Admiraal (1994), dentre outros, permitiram concluir que as respostas dessas misturas variam de acordo com a composição dos metais analisados bem como de suas concentrações e dos organismos testados (PHILLIPS et al., 2003).

Isso corrobora com o exposto por Norwood et al. (2003) que ao avaliar o efeito da mistura de metais em mais de 77 espécies diferentes de organismos, como algas, bactérias, crustáceos até peixes, em diversas fases da vida (ovo, embrião, larva e adulto), analisando diversos parâmetros, como mortalidade, crescimento, reprodução, dentre outros, também não encontraram um padrão para o comportamento das misturas.

Esses mesmos autores ao avaliarem 191 testes realizados com misturas de metais, encontraram que 156 desses testes foram realizados com misturas binárias, enquanto que apenas 18 testes foram com três metais e todas as outras combinações não chegaram a 17 experimentos. Na maioria desses trabalhos

realizados com metais a resposta encontrada foi de antagonismo perfazendo um total de 43% dos misturas analisadas.

Outros trabalhos realizados com peixes e gastrópodes também encontraram esse tipo de resposta (PARROTT; SPRAGUE, 1993) (OTITOLOJU, 2002). Entretanto, Verriopoulos e Dimas (1988) assim como Phillips et al. (2003) encontraram padrões de sinergismos entre metais em testes com *Tisbe holothuria* e *Strongylocentrotus purpuratus*.

Com relação aos metais zinco e níquel, existem vários trabalhos a cerca da toxicidade individual destes compostos (BRIX et al., 2006) (BIELMYER; GROSELL; BRIX, 2006) (BAUDOUIN; SCOPPA, 1974) (EISLER; HENNEKEY, 1977) (BADARÓ-PEDROSO et al., 2002), incluindo a toxicidade do zinco em *Mysidopsis juniae* (NIPPER et al., 1993). Porém, não há relatos na literatura da toxicidade do níquel para esta espécie. Os estudos a cerca da toxicidade da mistura binária destes metais são escassos (PHILLIPS et al., 2003), e ausentes para *M. juniae*. Assim, diante do exposto esse trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade aguda desses metais no microcrustáceo *M. juniae*.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade dos metais zinco e níquel, isolados e em misturas, através do teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*

### 2.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a letalidade do metais zinco e níquel quando expostos isoladamente ou em misturas binárias de diferentes proporções.
- ✓ Prever o comportamento dos metais estudados em mistura através dos modelos conceituais de Ação Independente (IA) e de Concentração de Adição (CA).



- ✓ Determinar qual modelo matemático descreve melhor os dados da toxicidade da mistura dos metais estudados.

## 2.3 Materiais e Métodos

### 2.3.1 Reagentes

O sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (CAS 7446-20-0) e o cloreto de níquel hexahidratado ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (CAS 7791-20-0) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

A solução estoque de ambos os metais ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi preparada a partir de água ultrapura com ácido nítrico a 1%. O total dos metais analisados na solução-estoque foi confirmado por absorção atômica por chama de acetileno segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21<sup>st</sup> Edição (APHA, 2005).

### 2.3.2 Organismo Teste

Os espécimes de *Mysidopsis juniae* (Figura 2-1) utilizados neste trabalho foram oriundos do cultivo do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Figura 2-1. *Mysidopsis juniae* imaturo. Fonte: Acervo do autor



Os misidáceos, de uma forma geral, possuem um tórax recoberto por uma carapaça que não se une aos últimos quatro segmentos torácicos. Essa carapaça se entende como um rostro, por baixo no qual são projetados os olhos compostos. Algumas vezes o segundo par de apêndices modificam em maxilípedes, já o restantes desses apêndices são muito semelhantes e os exópodes são filamentosos e podendo existir cerdas natatórias (RUPPERTS; BARNES, 1993).

A reprodução desses organismos é do tipo sexuada e com cópula ocorrendo à noite. Os óvulos são fertilizados imediatamente após a expulsão dos ovidutos e introdução no marsúpio (MAUCHILINE, 1980).

A espécie estudada foi inicialmente descrita por Silva (1979), no qual tem como característica principal do grupo é a presença de estatocisto (MAUCHILINE, 1980), distinguindo-se das outras espécies pela presença de um tubérculo no ápice do télson, bem como pelo formato dessa última estrutura. Outra característica que o diferencia dos outros organismos do grupo é o número de cerdas do sexto segmento do exopodito do quarto pleópodo dos indivíduos machos (RUPPERTS; BARNES, 1993).

Prósperi (1998) encontrou que a maturação sexual dessa espécie ocorre aproximadamente no 15º dia, apresentando marsúpio com ovos entre 18 e 20 dias e nascimento da prole ocorrendo por volta do 22º dia. O número de filhotes varia em torno de oito filhotes por fêmeas (ABNT, 2005).

### 2.3.3 Manutenção e cultivo dos organismos-teste

Os misidáceos foram cultivados em aquários com capacidade de 10 litros, a água do mar filtrada em membrana de micro fibra de vidro 0,8 µm, na bomba de vácuo TECNAL modelo TE-058 corrigida a uma salinidade de 35, através da adição de água destilada e verificada através do refratômetro portátil BIOBRIX modelo 211. Semanalmente, 25% da água dos aquários foi trocada e mensalmente renovou-se por completo. Também, uma vez por mês, foi realizada a contagem dos misidáceos de cada aquário com taxa de estocagem média de três fêmeas para cada macho. A limpeza dos aquários foi feita diariamente através do sifonamento do fundo, seguindo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) através da norma NBR 15.308/2005 para cultivo dessa espécie (Quadro 2-1).

Quadro 2-1. Resumo das condições de cultivo de *M. juniae*.

<b>Recipiente de cultivo</b>	Aquários de 10 litros
<b>Água de diluição</b>	Água do mar filtrada (0,8 µm)
<b>Troca de água</b>	Semanalmente: 25% Mensalmente: 100%
<b>Proporção de animais por aquário</b>	3 fêmeas : 1 macho
<b>Salinidade</b>	35
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12 h luz : 12 h escuro
<b>Luz</b>	Lâmpadas fluorescentes
<b>Aeração</b>	Suave
<b>Alimentação</b>	Náuplios de <i>Artemia</i> sp.
<b>Controles diários</b>	Aeração, limpeza dos aquários, quantidade de alimento.

#### 2.3.4 Procedimento para o Teste de Toxicidade Aguda dos Metais Isolados.

Para esses experimentos, foi seguido à norma já padronizada para essa espécie, NBR 15.308 da ABNT de 2005 (ABNT, 2005), nos quais juvenis de *M. juniae* (com idade entre 1-8 dias de vida) foram expostos a cinco concentrações (variando entre 0,0375-0,60 mg.L<sup>-1</sup> de cada um metal, durante 96h, sem renovação ou aeração. Dez animais foram adicionados em béqueres de vidro perfazendo um volume final de 300 mL de solução de teste, em triplicata. Três testes foram realizados para cada metal. A cada 24 horas, os animais vivos foram contados e alimentados *ad libitum* diariamente com náuplios de *Artemia* sp. (48h) e o excesso de comida foi removido. Os ensaios realizados foram mantidos sob as mesmas condições controladas do cultivo, já citadas anteriormente (Quadro 2-2).

Parâmetros físico-químicos, pH, oxigênio dissolvido (OD) e salinidade foram medidos no início e no final dos ensaios, ou quando foi observada a morte de todos os animais de uma concentração. Após, as 96 horas de teste foi calculada a Concentração Letal a 50 % dos organismos testados (CL<sub>50</sub>).

Quadro 2-2. Resumo das condições para o teste de toxicidade aguda com *M. juniae*.

<b>Tipo de teste</b>	Agudo; Estático; Sem Renovação.
<b>Salinidade</b>	35 ± 1
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12 h luz: 12 h escuro
<b>Recipiente para teste</b>	Béqueres 400 ml
<b>Volume da solução teste</b>	300 mL
<b>Idade dos organismos para o teste</b>	1-8 dias
<b>Nº de organismos por réplica</b>	10
<b>Nº de réplicas por concentração</b>	3
<b>Nº de organismo por concentração</b>	30
<b>Alimentação</b>	Diariamente com náuplios de <i>Artêmia</i> sp.
<b>Aeração</b>	Nenhuma
<b>Água de diluição</b>	Água do mar filtrada a 0,8 µm
<b>Duração do teste</b>	96 horas
<b>Parâmetros avaliados</b>	Letalidade
<b>Critérios de aceitabilidade</b>	80% de sobrevivência no controle

### 2.3.5 Procedimento para o Teste de Toxicidade da Mistura Binária dos Metais Zinco e Níquel.

Foram realizados quatro experimentos, para verificar se o padrão de respostas da mistura mantinha-se, entretanto, apenas um dos testes foi executado simultaneamente com os experimentos dos metais isolados, como determina o

método e sendo esse resultado exposto nesse trabalho. Os dados dos demais experimentos estão mostrados nos anexos C, D e E.

A escolha das concentrações utilizadas no experimento foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jonker et al. (2005), baseando-se no cálculo das Unidades Tóxicas (UT), onde 1 UT é igual a  $1/CL_{50}$  de cada substância química isolada. O somatório das UTs ( $\Sigma UT$ ) nunca deve exceder dois para evitar uma mortalidade excessiva dos organismos (VAN GESTEL; HENSBERGEN, 1997). Vinte e três combinações binárias de zinco e níquel foram testadas utilizando os misidáceos (Quadro 3-3). Os testes da mistura foram realizados utilizando os mesmos procedimentos aplicados para testes individuais descritos anteriormente.

#### 2.3.6 Aceitabilidade para o Teste de Toxicidade da Mistura Binária dos Metais Zinco e Níquel

A aceitabilidade do teste com misturas binárias segue as recomendações para o bioensaio agudo já padronizado com *M. juniae* (BADARÓ-PEDROSO et al., 2002), no qual a sobrevivência no controle deverá ser de no mínimo 80%. Para a verificação da sensibilidade dos organismos-teste, a  $CL_{50}$  (96h), para o sulfato de zinco, deverá estar no intervalo de 0,25 a 0,45 mg Zn.L<sup>-1</sup> (NIPPER et al., 1993).

#### 2.3.7 Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físicos-químicos dos ensaios realizados, tanto com os metais isolados, como os em misturas, devem permanecer dentro do esperado para aceitabilidade do teste, OD > 3,5 mg.L<sup>-1</sup>, pH variando entre 7,1 a 8,3 e salinidade 33,5 podendo variar até 1,5 seguindo as recomendações da norma NBR 15.308/2005 para a espécie estudada.

Quadro 2-3. Combinações binárias, unidades tóxicas (UT) e concentrações (mg.L<sup>-1</sup>) de zinco e níquel que foram testadas utilizando *M. juniae*.

Unidade Tóxica (UT)		Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	
Zn	Ni	Zn	Ni
1	1	0,24	0,18
1	0,75	0,24	0,14
0,5	1	0,12	0,18
1	0,5	0,24	0,09
0,75	1	0,18	0,18
0,75	0,25	0,18	0,05
0,5	0,50	0,12	0,09
0,375	0,625	0,09	0,11
0,25	0,75	0,06	0,14
0,125	0,875	0,03	0,16
0,875	0,125	0,21	0,02
0,625	0,375	0,15	0,07
0,75	0,75	0,18	0,14
0,5	0,25	0,12	0,05
0,375	0,375	0,09	0,07
0,25	0,5	0,06	0,09
0,125	0,625	0,03	0,11
0,625	0,125	0,15	0,02
0,375	0,125	0,09	0,02
0,25	0,25	0,06	0,05
0,125	0,375	0,03	0,07
0,25	0,125	0,06	0,02
0,125	0,25	0,03	0,05
0	0	0	0

### 2.3.8 Análise Estatística

Os dados de toxicidade foram expressos como CL<sub>50</sub> com o seu respectivo intervalo de confiança (95%), que foi calculado utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

Os dados do ensaio de toxicidade da mistura foram modelados através dos modelos conceituais de adição de Concentração (CA) (LOEWE; MUISCHNEK, 1926)

e de ação independente (IA) (BLISS, 1939). Após esta modelagem, utilizando os dois modelos de referência, foi verificada se houve desvio significativo da resposta desses modelos, produzindo um padrão de antagonismo ou sinergismo, ou respostas dose-dependentes ou ainda uma resposta dependente da razão de doses, como proposto por Jonker et al. (2005). Qualquer desvio dos modelos de referência foram obtidos com a adição de dois parâmetros, a e b. O parâmetro de desvio no modelo de sinergismo/antagonismo pode ser negativo ou positivo para CA e IA, respectivamente. Para a dependência das doses, um segundo parâmetro  $b_{DL}$  foi incluído. O valor de  $b_{DL}$  indica em que nível de dose as alterações do desvio ocorrem. Para descrever os desvios relativos a razão de doses, um novo parâmetro  $b_{DR}$  foi incluído para saber se a toxicidade vai depender da composição da mistura. Para maiores detalhes sobre a derivação destas funções de desvio consulte Jonker et al. (2005). Depois que os dados foram ajustados para ambos os modelos conceituais ou de seus desvios o melhor ajuste foi escolhido pela comparação da máxima verossimilhança (Tabela 2-1).



Tabela 2-1. Interpretação dos parâmetros adicionais (a e b) que definem a função de desvio dos modelos conceituais de Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA). Adaptado de Jonker et al. (2005).

Desvio do padrão	Parâmetro a (CA e IA)	Parameter b (CA)	Parameter b (IA)
Sinergismo/antagonismo (S/A)	a>0: antagonismo a<0: sinergismo		
Razão de doses (DR)	a>0: antagonismo exceto para as misturas no qual valores de b negativo indica sinergismo. a<0: sinergismo exceto para as misturas nos qual valores de b positivo indica antagonismo.	b <sub>i</sub> >0: antagonismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico i. b <sub>i</sub> <0: sinergismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico i.	
Dose-dependência (DL)	a>0: antagonismo em doses baixa e sinergismo em doses mais altas. a>0: sinergismo em doses baixa e antagonismo em doses mais altas	b <sub>DL</sub> >1: desvios em concentrações inferiores a CL <sub>50</sub> b <sub>DL</sub> =1: desvios em concentrações semelhantes a CL <sub>50</sub> 0< b <sub>DL</sub> <1: desvios em concentrações superiores a CL <sub>50</sub> b <sub>DL</sub> < 1: não há desvio dessa natureza, mas a magnitude do S/A dependente da dose	b <sub>DL</sub> >2: desvios em concentrações inferiores a CL <sub>50</sub> b <sub>DL</sub> =2: desvios em concentrações semelhantes a CL <sub>50</sub> 1< b <sub>DL</sub> <2: desvios em concentrações superiores a CL <sub>50</sub> b <sub>DL</sub> <1: não há desvio dessa natureza, mas a magnitude do S/A dependente da dose

## 2.4 Resultados

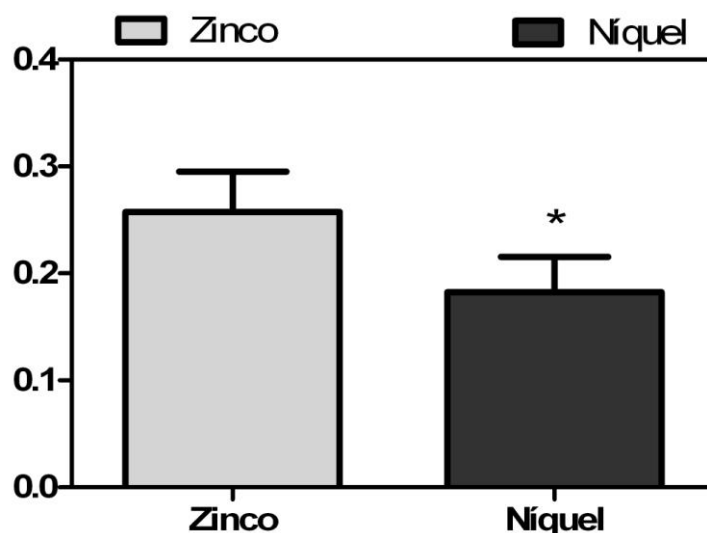
### 2.4.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físicos-químicos dos ensaios realizados para ambos os metais mantiveram-se dentro do esperado para aceitabilidade do teste, apenas algumas variações, principalmente na salinidade, variaram acima do recomendado. As médias dos valores encontrados para os experimentos realizados para dos dois metais estudados, tanto isolados como em misturas, encontram-se nos Anexos deste trabalho (ANEXOS A e B).

### 2.4.2 Exposição aos Metais Isolados

Ambos os metais mostraram-se tóxicos aos organismos testes (*M. juniae*), com valores de  $CL_{50}$  de  $0,26 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,18 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$  para o zinco e o níquel respectivamente (Figura 3-2). Foi detectada diferença significativa entre esses valores quando realizado o teste *T* de student ( $p < 0,05$ ).

Figura 2-2. Média da Concentração Letal a 50% dos organismos ( $CL_{50}$ ) dos experimentos realizados com os metais zinco e níquel frente ao *Mysidopsis juniae* após 96 horas de duração. Os valores correspondem a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. Para cada experimento o valor da  $CL_{50}$  foi obtido por regressão através do método de Trimmed Spearman- Karber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).



### 2.4.3 Exposição à Mistura Binária dos Metais

Para prever a toxicidade da mistura para os misidáceos ambos os modelos (CA e IA) foram testados para avaliar qual deles prediz melhor os efeitos e os seus desvios.

Comparando os efeitos do zinco e níquel sobre a mortalidade de *M. Juniae*, o modelo de ação independente (IA) produziu um resíduo (SS) de 8,82 (com  $p < 0,05$ ), explicando 75,2% dos nossos dados (Tabela 3-2). Quando foram incluídos os parâmetros  $a$ ,  $b_i$  e  $b_{DL}$  para verificação de desvios do modelo, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), o que sugere que o melhor ajuste é observado no modelo de referência (Figura 3-3).

Quando os dados são introduzidos no modelo de CA (Tabela 3-2), o ajuste permaneceu inalterado, como o modelo explicando 75,4% de dados ( $SS = 8,73$   $p < 0,05$ ). Neste caso, também o melhor ajuste foi observado para o modelo referência (Figura 3-2). Dessa forma podemos dizer que os dados podem ser explicados tanto pelo modelo de CA como pelo IA, não sendo possível, portanto, afirmar se os metais possuem modo de ação igual ou diferente. Portanto, não há interação entre os metais estudados sendo suas respostas em mistura binária uma adição de suas respostas isoladas.

Figura 2-3. Análise do efeito da mistura binária de zinco e níquel na letalidade de *Mysidopsis juniae* usando o A- modelo concentração de adição (CA) e o B- modelo ação independente (IA). (Isoblograma 2D).

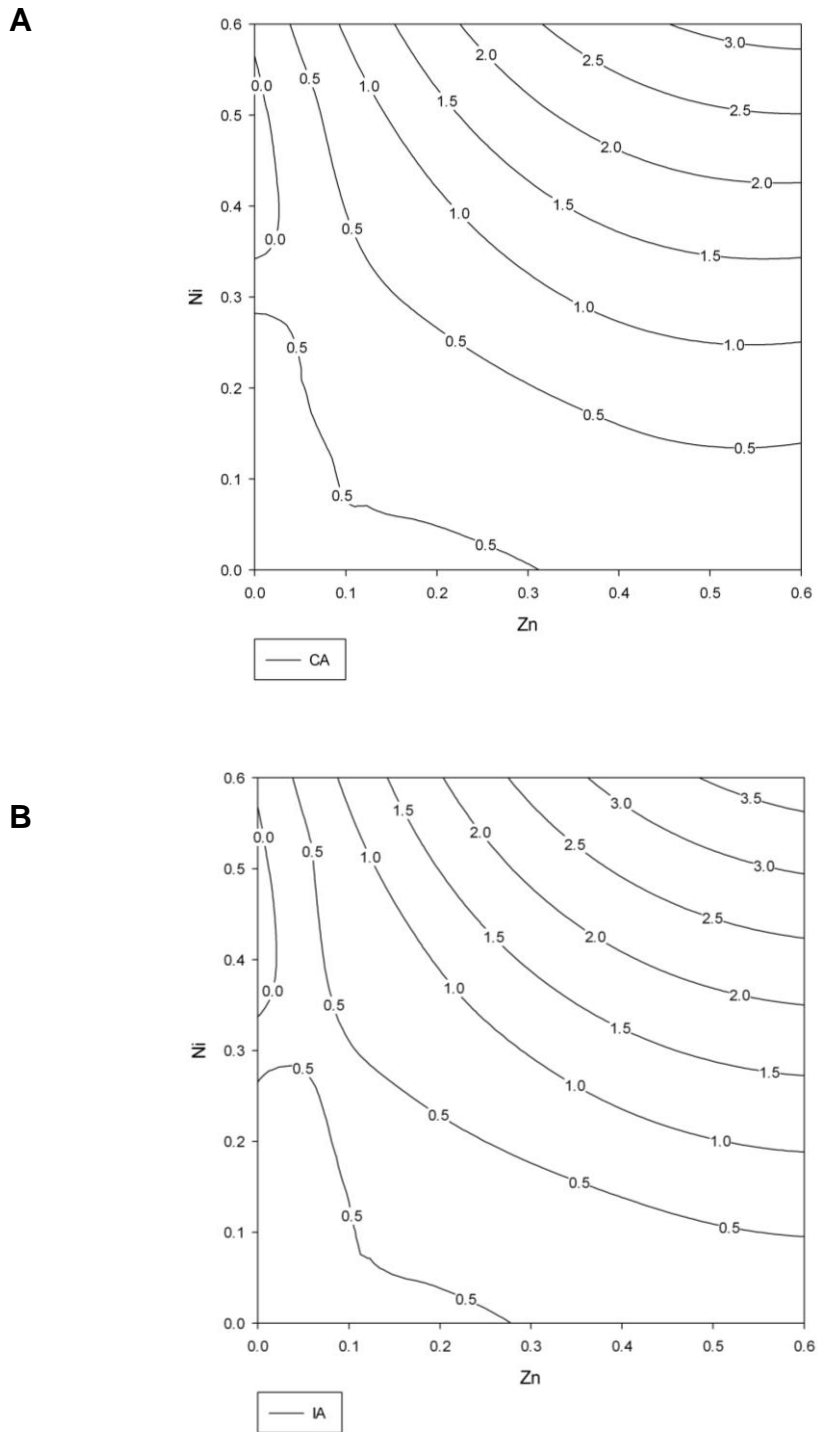


Tabela 2-2. Resumo dos efeitos da mistura binária dos metais níquel e do zinco na letalidade de *Mysidopsis juniae*.

	Ação Independente				Concentração de Adição			
	Referência	S/A	DR	DL	Referência	S/A	DR	DL
<b>Max</b>	0.9716254	0.970223	0.971561	0.971642	0.968650031	0.967364	0.967327205	0.968353
<b>beta (Ni)</b>	3.721872	4.117683	6.023275	4.17396	5.002324226	4.98123	5.741081905	5.246134
<b>beta (Zn)</b>	2.162882	2.40416	2.331298	2.519403	2.243700331	2.293966	2.268150987	2.424941
<b>EC<sub>50</sub> (Ni)</b>	0.2712324	0.285849	0.301622	0.286406	0.313542587	0.294892	0.303596865	0.295798
<b>EC<sub>50</sub> (Zn)</b>	0.1859071	0.20263	0.187779	0.200508	0.224694362	0.201429	0.19036959	0.201206
<b>A</b>	-	-1.39229	3.40106	-2.03937	-	0.753824	2.549433077	-0.02008
<b>b<sub>Ni</sub></b>	-	-	-11.1764	-	-	-	-3.54521906	-
<b>b<sub>Zn</sub></b>	-	-	-	0.881584	-	-	-	32.19841
<b>SS</b>	8.8184121	8.539044	7.858118	8.504538	8.734822689	8.340339	8.019764435	8.299464
<b>R<sup>2</sup></b>	0.7516657	0.759533	0.778708	0.760505	0.754019629	0.765129	0.774156305	0.76628
<b>X<sup>2</sup></b>	-	0.279368	0.960294	0.313874	-	0.394483	0.715058254	0.435359
<b>Df</b>	-	1	2	2	-	1	2	2
<b>p(x<sup>2</sup>)</b>	<b>2.294E-05</b>	0.597116	0.618692	0.854758	<b>2.2069E-05</b>	0.529952	0.699402327	0.804383

## 2.5 Discussão

Os metais são poluentes frequentemente introduzidos no ambiente e com reconhecida toxicidade aos organismos aquáticos (EISLER; HENNEKEY, 1977) (ENSERINK; MAAS-DIEPEVEEN; VAN LEEUWEN, 1991) (CALABRESE et al., 1973). De um modo geral, seu efeito depende da espécie química do metal, mas também da espécie alvo (RAINBOW, 2002). Sendo assim, muitos estudos já foram realizados com diferentes metais em diferentes bioensaios que avaliam parâmetros variados que envolvem desde a toxicidade aguda até, por exemplo, a neurotoxicidade crônica observada após a exposição ao mercúrio (DOREA; BARBOSA, 2005).

A respeito da toxicidade do níquel ainda há poucas informações em organismos aquáticos, autores como Prophete et al. (2006), Gopal et al. (2009) e Vijayavel et al. (2009) afirmam que esse metal pode gerar espécies reativas de oxigênio que podem causar: o aumento da peroxidação lipídica (LPO) (PTASHYNSKI et al., 2001; PTASHYNSKI et al., 2002) e a perda da integridade da membrana celular (PTASHYNSKI et al., 2002). Isso foi constatado após esses autores analisarem a dieta de *Coregonus clupeaformis* contendo concentrações de 0, 10, 100 e 1.000  $\mu\text{g Ni}$  por g do animal e dietas contendo 0, 1.000 e 10.000  $\mu\text{g Ni/g}$  preparadas com camarão de água salgada. Também foram verificadas alterações nas defesas antioxidantes das células, como demonstrado por Gopal et al. (2009), após estudarem a exposição de *Cirrhinus mrigala* (peixe de água doce) a concentrações de 35  $\text{mg.L}^{-1}$  de níquel.

Já o zinco é um dos metais essenciais para a manutenção da vida dos organismos, uma vez que faz parte do grupo de metaloenzimas, como descrito por Sarabia et al. (2008), especialmente para crustáceos, pois está envolvido no crescimento desses animais (WEIS, 1980). Além disso, o zinco é um cofator para a regulação da atividade de determinadas enzimas dependentes de zinco, como a anidrase carbônica, por exemplo (VITALE et al., 1999). Entretanto, esse metal pode comportar-se como um fator de estresse para os organismos aquáticos, causando a inibição da regulação do íon Ca (HERSHFINKEL et al., 2001) e na regulação do balanço ácido-base (SPRY; WOOD, 1984).

Ambos os metais mostram-se tóxicos aos organismos teste utilizados nesse trabalho (*M. juniae*), com valores de  $\text{CL}_{50}$ , para 96 horas de exposição, igual a  $0,26 \pm$

0,04 mg.L<sup>-1</sup> para o zinco e 0,18 ± 0,03 mg.L<sup>-1</sup>, para níquel, com diferenças estatisticamente significativas entre a toxicidade dos metais (p < 0,05).

Valores próximos a esses, para o zinco, também foram demonstrados por diferentes autores (NIPPER et al., 1993) (ZAMBONI et al., 1996) (RESGALLA; LAITANO, 2002). No Brasil, Resgalla e Laitano (2002) ao estudar a sensibilidade de diversos organismos marinhos estudados na ecotoxicologia verificaram valores de CE<sub>50</sub> (testes crônicos) variando de 0,023 mg.L<sup>-1</sup> para o ouriço *Lytechinus variegatus* até 0,64 mg.L<sup>-1</sup> para o copépoda *Acartia lilljeborgi* e valores de CL<sub>50</sub> variando de 0,05 mg.L<sup>-1</sup> para *Lytechnus variegatus* a 44,47 mg.L<sup>-1</sup> para o peixe *Poecilia vivipara*. Quando considerados apenas os testes agudos em espécies de misidáceos, observa-se valores de CL<sub>50</sub> iguais a 0,20 mg.L<sup>-1</sup> para *Metamysidopsis elongata atlântica* (ZAMBONI et al., 1996), de 0,50 mg.L<sup>-1</sup> para *Mysidopsis bahia* (NIPPER et al., 1993) e de 0,33 mg.L<sup>-1</sup> para *Mysidopsis juniae* (NIPPER et al., 1993) (Tabela 2-3). Desde modo, o presente trabalho mostra valores de CL<sub>50</sub> compatíveis com aqueles já descritos na literatura, ressaltando a sensibilidade desta espécie preconizado pela norma brasileira (ABNT, 2005).

Tabela 2-3. Valores de CL<sub>50</sub> para o zinco em diferentes grupos de animais marinhos, calculadas em tempos de exposição distintos.

<b>Grupo Taxonômico</b>	<b>Espécie</b>	<b>Elemento Químico Testado</b>	<b>CL<sub>50</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fonte</b>
Crustáceo	<i>Mysidopsis juniae</i>	Zinco	0,33	(NIPPER et al., 1993)
Crustáceo	<i>M. bahia</i>	Zinco	0,50	(NIPPER et al., 1993)
Crustáceo	<i>Metamysidopsis elongata atlântica</i>	Zinco	0,20	(ZAMBONI et al., 1996)
Equinoderma	<i>Lytechinus variegatus</i>	Zinco	0,05	(RESGALLA; LAITANO, 2002)
Peixe	<i>Poecilia vivipara</i>	Zinco	44,47	(RESGALLA; LAITANO, 2002)

Comparando com os dados da literatura é possível constatar que os valores de  $CL_{50}$  para o níquel variam bastante de acordo com a espécie estudada, como de  $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$  para o *M. bahia* (LUSSIER et al., 1985) e  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$  para *M. intii* (HUNT et al., 2002), para o crustáceo *Eudiatomus padanus* a  $CL_{50}$  é igual a  $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$  (BAUDOUIN; SCOPPA, 1974), enquanto que para estrela-do-mar (*Asterias forbesi*) a  $CL_{50}$  chega a  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  e para o peixe *Fundulus heteroclitus* esse valor se aproxima a  $350 \text{ mg.L}^{-1}$  (EISLER; HENNEKEY, 1977). O que nos permite afirmar que o *M. juniae* é tão sensível quantos outros organismos, bem conhecidos e do mesmo gênero e bem mais sensível que outros organismos como a estrela do mar e algumas espécies de peixes (Tabela 2-4).

Tabela 2-4. Valores de  $CL_{50}$  para o níquel em diferentes grupos de animais marinhos, calculadas em tempos de exposição distintos.

Grupo Taxonômico	Espécie	Elemento Químico Testado	$CL_{50}$ ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Fonte
Crustáceo	<i>Mysidopsis intii</i>	Níquel	0,15	(HUNT et al., 2002)
Crustáceo	<i>M. bahia</i>	Níquel	0,5	(LUSSIER; GENTILE; WALKER, 1985)
Crustáceo	<i>Eudiatomus padanus</i>	Níquel	3,6	(BAUDOUIN; SCOPPA, 1974)
Equinoderma	<i>Asterias forbesi</i>	Níquel	150	(EISLER; HENNEKEY, 1977)
Peixe	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Níquel	350	(EISLER; HENNEKEY, 1977)

Quando comparamos a sensibilidade dos organismos entre os dois metais estudados encontramos resultados diferentes aos deste trabalho, onde os metais foram semelhantes em relação a sua toxicidade. Trabalhos como de Eisler e Hennekey (1977) relataram que a toxicidade aguda do zinco foi maior do que a toxicidade aguda do níquel para seis espécies de organismos aquáticos (*Mya*



*arenaria*, *Asterias forbesi*, *Pagurus longicarpus*, *Nereis virens*, *Nassarius obsoletus*, *Fundulus heteroclitus*) onde a  $CL_{50}$  (96h) para o zinco foi sempre menor do que para o níquel, como para o peixe (*Fundulus heteroclitus*) que a  $CL_{50}$  para o zinco foi de 60  $mg.L^{-1}$  enquanto que para o níquel foi de 350  $mg.L^{-1}$ . Já para o crustáceo (*Pagurus longicarpus*) a  $CL_{50}$  (96h) foi de 0,4  $mg.L^{-1}$  e 150  $mg.L^{-1}$ , para o zinco e níquel respectivamente.

Os trabalhos que visam proteger a qualidade dos corpos d'água, na maioria das vezes, levam em consideração apenas a toxicidade das substâncias isoladas, mas sabe-se que no meio ambiente, principalmente no meio aquático, os compostos estão sob a forma de misturas, que muitas vezes são misturas bastante complexas, que alteram a toxicidade desses compostos (CALAMARI; VIGHI, 1992).

Para estudar a interação de compostos em misturas foi que alguns autores desenvolveram modelos teóricos, como CA (LOEWE; MUISCHNEK, 1926), IA (BLISS, 1939) e fator de bioconcentração (BF) (XU et al., 2011), na tentativa de prever a toxicidade dessas misturas.

Muitos trabalhos relatam que modelo CA é uma boa ferramenta para prever os efeitos de misturas nos quais as substâncias químicas possuem mesmo modo de ação, mas em alguns casos desvios podem ocorrer desse modelo (GOMEZ-EYLES et al., 2009) (JONKER et al., 2005). Autores como Drescher e Boedeker (1995) afirmam que CA é melhor modelo para analisar o efeito de misturas binárias quando comparado com IA.

Deste modo, neste trabalho foi avaliada a toxicidade dos metais zinco e níquel em diferentes misturas binárias, mostrando, que o comportamento das misturas destes metais foram descritos tanto pelo modelo de CA como pelo modelo de IA.

Verriopoulos e Dimas (1988) estudando a toxicidade aguda de seis metais (Cu, Cd, Zn, Pb, Ni e Cr) em uma espécie de copépodo marinho, *Tisbe holothuria*, encontraram diferentes relações entre os metais analisados. Para o zinco e o níquel foi identificado sinergismo entre eles, assim como para a mistura de Cd- Zn e Ni-Cu. Essa informação corrobora com Phillips et al. (2003) que ao estudar a interação dos metais cádmio, cobre, níquel e zinco em larvas de ouriços do mar roxo (*Strongylocentrotus purpuratus*) encontraram sinergismos nas misturas de Cd+Cu, Cu+ Ni e Ni+Zn, assim como para Cu+Ni+Zn.

Autores como Enserink, Maas-Diepeveen e Van Leeuwen (1991) afirmam que misturas que envolvem um grande número de metais, normalmente possuem efeito

aditivo, mas aquelas misturas que envolvem apenas dois ou três metais são imprevisíveis, isso também foi exposto por outros autores como Negilski, Ahsanullah e Mobley (1981) e Kraak Stuitfand e Admiraal (1994). Já outros trabalhos com peixes, como *Pimephales promelas* (PARROTT; SPRAGUE, 1993), e com gastrópodes, *Tympanotonus fuscatus* (OTITOLOJU, 2002), encontraram relações de antagonismos entre os metais zinco e cobre.

Com isso, podemos afirmar que o comportamento das misturas é complexo, difícil de prever e dependente tanto dos metais que a compõe como dos organismos utilizados durante os ensaios (LUSSIER; GENTILE; WALKER, 1985).

## **2.6 Conclusões**

Diante do analisado neste trabalho, pode-se concluir que os metais não apresentaram diferença na toxicidade aguda para o *M. juniae* quando considerado 96 horas de exposição e que os dados referentes à mistura dos metais zinco e níquel foram igualmente descritos pelo modelo de Concentração de Adição (CA) e pelo modelo de Ação Independente (IA), não apresentando desvios dos modelos padrões, não sendo, portanto, possível concluir que os metais possuem o mesmo modo de ação ou modo de ação diferente. Portanto, estes metais estudados agem de forma aditiva quando em mistura binárias em água do mar com salinidade 35.

### **3 BIOENSAIO CRÔNICO COM *Mysidopsis juniae*: ANÁLISE DA LETALIDADE, COMPRIMENTO, PESO SECO E FECUNDIDADE FRENTE AOS METAIS ZINCO E NÍQUEL.**

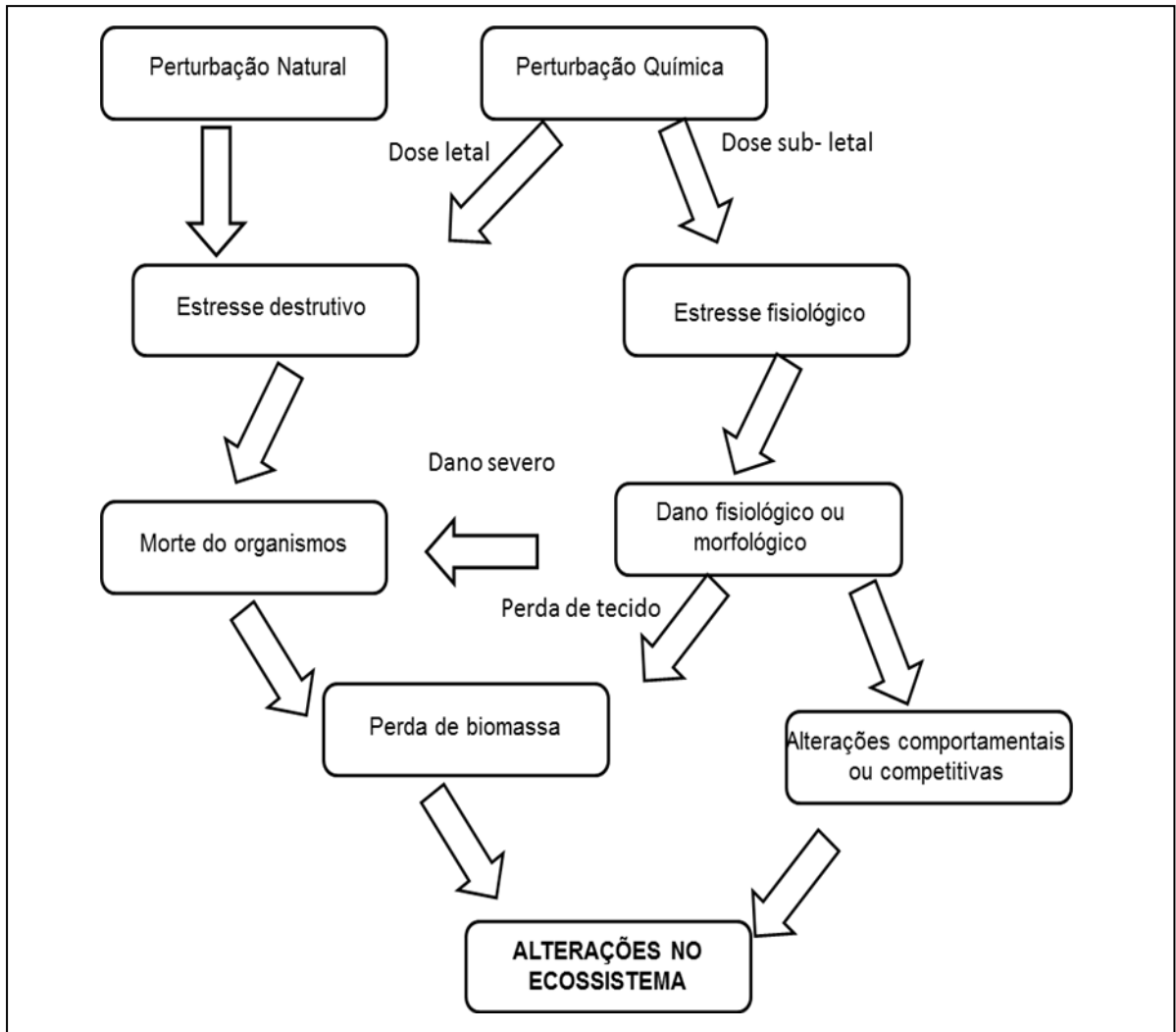
#### **3.1 Fundamentação teórica**

Os testes de toxicidade mais comumente utilizados são aqueles chamados de testes agudos, onde se normalmente analisa a mortalidade dos organismos teste (WEINSTEIN; BIRK, 2002). Segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008) esses testes são mais rápido, simples, baratos e fáceis de desenvolver, podendo ser utilizados para avaliar a resposta de um determinado organismo a uma substância química específica permitindo estipular concentrações seguras dos poluentes nos ambientes, visando a preservação destes.

Em geral, os bioensaios agudos são os primeiros a serem realizados, principalmente quando não se possui informações a respeito da toxicidade daquela substância. É a partir desses experimentos que é possível obter informações primárias, como a Concentração Letal a 50% dos organismos (DEZOTTI, 2008).

Ainda segundo Magalhães e Ferrão Filho (2008), esse tipo de ensaio oferece algumas limitações, principalmente aquelas relacionadas ao tempo de exposição dos organismos a substância química estudada. Devido ao pouco tempo de exposição, isso quando comparado ao ciclo de vida dos organismos, é difícil inferirmos se a mortalidade aumentaria de forma contínua com o aumento do tempo, já que alguns elementos químicos podem ter um período de latência antes de começar a agir sobre os organismos. Outra limitação é que esses testes são realizados com apenas uma fase da vida do indivíduo analisado, entretanto a resposta a substância pode variar entre as diversas fases da vida do organismo, sendo as fases iniciais normalmente mais sensíveis. E adicional a isso, mesmo que não haja a mortalidade, os organismos expostos a esses elementos químicos podem estar sofrendo perturbações não letais que prejudicam o sucesso da espécie, como aborto, má formação, alterações metabólicas, dentre outras, e que não são detectáveis em testes agudos (Figura 3-1).

Figura 3-1. Caminhos das perturbações físicas e químicas pelos quais esses efeitos alcançam o nível ecossistema (fonte: WEINSTEIN; BIRK, 1989).



Já os testes de toxicidade crônica são mais longos, durando em média de 1/10 até o ciclo completo de vida do organismo, onde são avaliados parâmetros sub-letais, como reprodução (número da prole), fecundidade (presença de fêmeas com ovos), crescimento, expressão de enzimas, comportamento, dentre outros (RAND e PETROCELLI, 1985).

No ambiente aquático devido aos fatores de diluição, os organismos estão expostos a concentrações subletais dos poluentes, podendo, portanto, causar distúrbios fisiológicos ou comportamentais em longo prazo, sendo esses efeitos na maioria das vezes não detectáveis em testes de toxicidade aguda, sendo necessário o uso de testes crônicos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Como afirma ainda Araújo e Aragão (2006) foi a partir de 1960 que os testes de toxicidade crônica tiveram seu crescimento mais expressivo, uma vez que

detectou-se que os critérios de qualidade de água baseados em testes de toxicidade aguda não estavam sendo eficientes para a proteção da biota aquática, sendo necessário avaliar o potencial tóxico das substâncias a longo prazo.

Os primeiros testes desenvolvidos foram realizados com peixes e invertebrados e baseavam-se no ciclo de vida completo do organismo teste (COONEY, 1995). Entretanto, esse tipo de bioensaio, devido ao seu tempo de duração, mesmo fornecendo informações mais completas a respeito da toxicidade dos compostos, era muito oneroso, o que levou os pesquisadores a desenvolver testes de toxicidade crônica de curta duração utilizando apenas parte do ciclo de vida ou apenas as fases mais sensíveis, as fases iniciais do desenvolvimento, dos organismos teste. Com isso, esses testes seriam mais rápidos e, portanto, mais baratos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Pensando em todos esses fatores, pesquisadores da entidade norte americana de proteção ambiental (USEPA) desenvolveram protocolos mais rápidos (de até 9 dias) para avaliar a toxicidade crônica de efluentes, com cinco espécies diferentes, para substituir aqueles tradicionais testes de toxicidade crônica mais longos. As espécies utilizadas foram: *Cyprinodon variegatus* (peixe), *Menidia beryllina* (peixe), *Mysidopsis bahia* (misidáceo), *Arbacia punctulata* (ouriço do mar) e *Champia parvula* (alga) (USEPA, 2002).

Fazendo uma comparação a cerca da duração dos testes de toxicidade crônica com ciclo de vida completo e o testes crônico de curta duração podemos evidenciar algumas diferenças, como; por exemplo, o teste com ciclo de vida completo inicia-se com ovos e estendem-se até a reprodução dos animais, podendo até ser feito com várias gerações, se necessário, enquanto que os testes de curta duração podem ser realizados apenas com uma fase de vida do organismos, o que permite que seja mais rápido (COONEY, 1995).

Autores como Taraldsen e Norberg-King (1990) apontam ainda outras vantagens para os testes de curta duração, como o fato de alguns compostos como os pesticidas estarem presentes em altas concentrações apenas em um curto período de tempo, de um a quatro dias, logo após esse período suas concentrações diminuem consideravelmente o que sugere que os ensaios de curta duração podem fornecer uma estimativa a respeito da toxicidade sub-letal confiável tanto quanto os testes de ciclo de vida completo. Ainda segundo o mesmo autor, os testes mais longos são dificilmente repetidos com as mesmas substâncias sob as mesmas

condições o que dificulta sua precisão e repetibilidade, características fundamentais na Ecotoxicologia.

## 3.2 Objetivos

### 3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade crônica dos metais zinco e níquel, utilizando para isso as variáveis letalidade, comprimento, peso seco e a fecundidade de *Mysidopsis juniae*.

### 3.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar como a letalidade, o comprimento e o peso seco de *Mysidopsis juniae* pode ser afetado pelo zinco e o níquel, isoladamente.
- ✓ Verificar se a fecundidade de *Mysidopsis juniae* pode ser afetada pelo zinco.
- ✓ Determinar a Concentração Letal a 50% dos Organismos (CL<sub>50</sub>) em 96 horas e sete dias de exposição.
- ✓ Avaliar qual variável estudada respondeu melhor ao ensaio crônico de *M. juniae* com metais.
- ✓ Desenvolver um protocolo de análise da toxicidade crônica de curta duração para *M. juniae*.

### 3.3 Materiais e Métodos

#### 3.3.1 Organismo teste

Conforme descrito no item 2.3.2

#### 3.3.2 Manutenção e cultivo dos organismos-teste

Conforme descrito no item 2.3.3

#### 3.3.3 Solução-Estoque

O ensaio crônico de curta duração com *M. juniae* foi realizado com os metais zinco e níquel, isoladamente.

A solução estoque foi preparada a partir água destilada, sulfato de zinco heptahidratado (CAS 7446-20-0, SIGMA-ALDRICH®) e cloreto de níquel II hexahidratado (CAS 7791-20-0, SIGMA-ALDRICH®) na concentração de 100mg L<sup>-1</sup>, para ambos os metais, para cada experimento foi preparada uma solução estoque. A partir dessa solução foram realizadas as diluições em água do mar para obtenção das concentrações nominais 0,0375; 0,075; 0,15; 0,30; 0,60 mg.L<sup>-1</sup> de zinco e 0,0075; 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,15 e 0,30 mg L<sup>-1</sup> de níquel.

#### 3.3.4 Procedimento do teste

Foram realizados quatro experimentos para cada metal, de acordo com o padronizado pela agência de proteção ambiental americana (USEPA, 2002), para *Mysidopsis bahia* (ANEXO H), todavia algumas modificações foram realizadas para adaptação da espécie brasileira.

##### 3.3.4.1 Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físicos-químicos dos ensaios realizados devem permanecer dentro do esperado para aceitabilidade do teste, OD>3,5 mg.L<sup>-1</sup>, pH variando entre

7,1 a 8,3 e salinidade 33,5 podendo variar até 1,5 seguindo a recomendações da norma NBR 15.308/2005 para a espécie estudada.

#### 3.3.4.2 Letalidade, Comprimento e Peso Seco

A metodologia consistiu na exposição de jovens de *M. juniae* com idade igual ou inferior a 24 horas de nascidos a várias concentrações dos metais (zinco e níquel) por sete dias em béqueres de vidros com capacidade de 400 mL. As concentrações foram testadas em água do mar que passou pelo mesmo procedimento da utilizada no cultivo do organismo teste, em quadruplicatas, com 250 mL de solução e cinco organismos em cada frasco. Para esse bioensaio foram avaliados: a letalidade, o comprimento e o peso seco (Quadro 3-1).

O teste foi do tipo estático, sem renovação e aeração, com a avaliação dos parâmetros físico-químicos: pH (pHmetro Micronal D474), oxigênio dissolvido –OD (oxímetro Digimed DM- 4P) e salinidade (refratômetro portátil BIOBRIX modelo 211), no início, no fim do experimento ou quando houve a morte de todos os organismos da concentração.

Os béqueres do experimento foram mantidos em uma sala com temperatura controlada,  $25 \pm 2$  °C, 12 h luz: 12 h escuro, onde os organismos - teste foram alimentados com náuplios de artêmia (eclosão após 48 horas) na proporção de 20 náuplios por misidáceo até 48 horas de experimento e após esse período essa proporção foi para 40 náuplios/organismo. A cada de 24 horas de teste, os béqueres foram observados para a retirada dos mortos, do excesso de alimentação e para contagem dos organismos vivos. Após 96 horas de duração do teste, foi contabilizado o total de mortos em todas as concentrações para que fosse realizado o cálculo da  $CL_{50}$ .

Após finalizar a exposição de sete dias, os organismos sobreviventes foram lavados em água destilada e agrupados por concentração para a avaliação do peso seco. Foram colocados em papelotes de alumínio e secos em estufa MARCONI (modelo MA-033/5) a 60 °C durante 24 horas. Após a secagem, os papelotes foram pesados em balança de precisão BIOPRECISA (modelo FA2104N).

Para a medição do comprimento dos organismos, foi medido o tamanho da cabeça a extremidade final do último segmento dos animais de cada réplica em



microscópio estereoscópico WILD HEERBRUGG (modelo K-400 Drawing Tube) com aumento de 25 vezes, também após lavagem em água destilada após o término do experimento (7 dias) (Figura 3-2).

Figura 3-2. Comprimento total de *Mysidopsis juniae*.



Quadro 3-1. Resumo das condições para o teste de toxicidade crônica de curta duração com *M. juniae*.

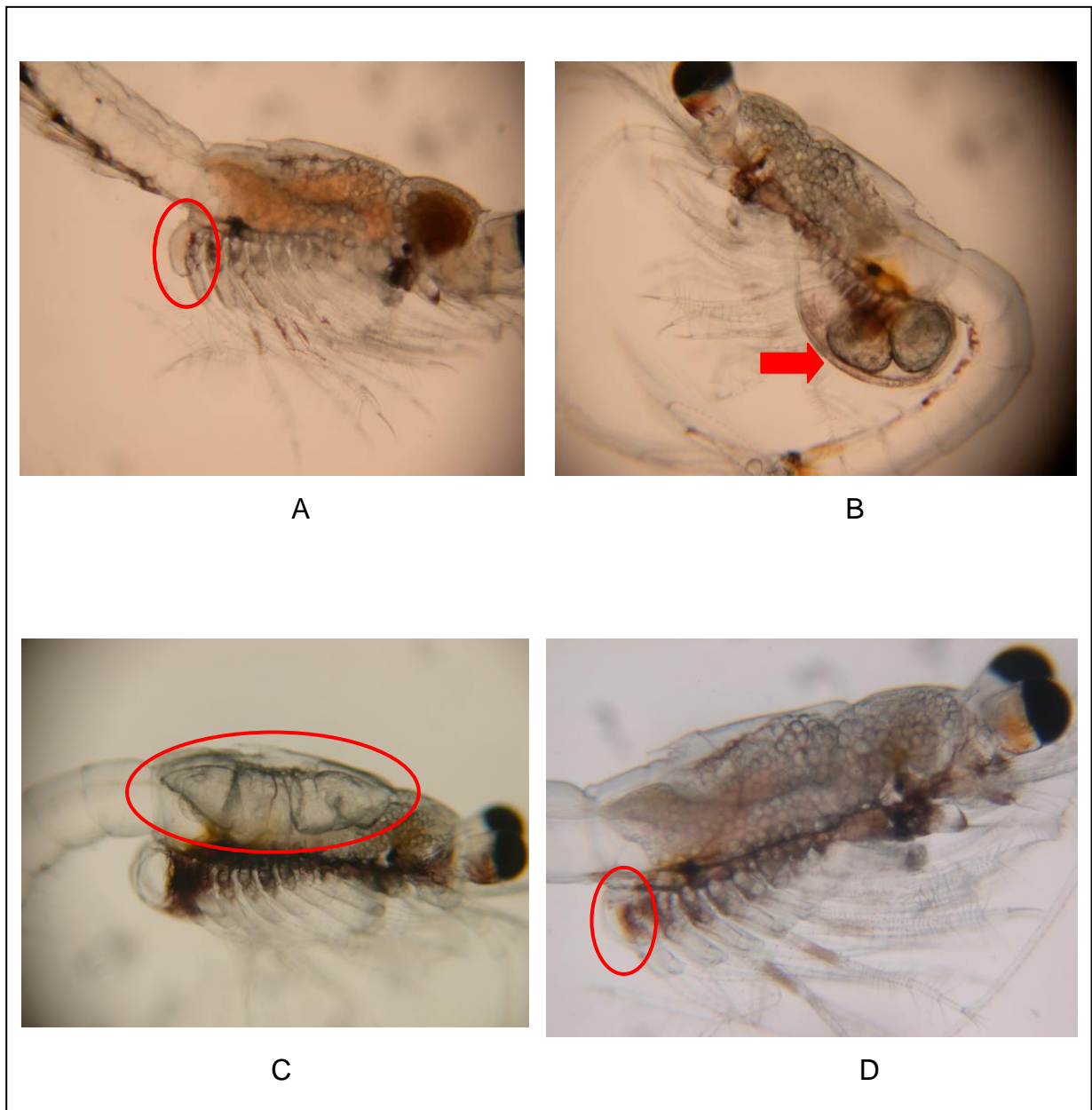
<b>Tipo de teste</b>	Crônico; Estático; Sem Renovação.
<b>Salinidade</b>	35 ± 1
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12 h luz: 12 h escuro
<b>Recipiente para teste</b>	Béqueres 400 ml
<b>Volume da solução teste</b>	250 mL
<b>Idade dos organismos para o teste</b>	< 24 horas
<b>Nº de organismos por réplica</b>	5
<b>Nº de réplicas por concentração</b>	4
<b>Nº de organismo por concentração</b>	20
<b>Alimentação</b>	Diariamente com náuplios de <i>Artêmia</i> sp.
<b>Aeração</b>	Nenhuma
<b>Água de diluição</b>	Água do mar filtrada a 0,8 µm
<b>Duração do teste</b>	7 dias
<b>Parâmetros avaliados</b>	Letalidade; Comprimento; Peso Seco
<b>Critérios de aceitabilidade</b>	80% de sobrevivência no controle

#### 3.3.4.3 Fecundidade

Para avaliação da fecundidade das fêmeas de *M. juniae*, foram realizados outros três experimentos, mas apenas para o zinco, no qual o protocolo sofreu algumas alterações, que foram: o teste iniciou-se com organismos de 10 dias de vida, que foram retirados do cultivo com idade inferior a 24 horas de vida e resguardados em aquário, durante 10 dias até o início do teste, com a mesma densidade da praticada no experimento, alimentados com artêmia sem óleo, sendo 60 náuplios para cada misidáceo. As concentrações testadas foram: 0,019; 0,038; 0,075; 0,15 e 0,30 mg.L<sup>-1</sup>. Todas as outras condições foram idênticas aquelas dos experimentos que avaliaram letalidade, comprimento e peso seco.

Após sete dias de exposição, os organismos foram avaliados quanto ao sexo e a maturidade sexual. Verificou-se, ainda, a presença ou ausência de ovos no oviduto e no marsúpio das fêmeas com o auxílio do microscópio MOTIC (modelo BA-200). As fêmeas que apresentam o marsúpio ainda em estágio de desenvolvimento inicial foram consideradas como imaturas (Figura 3-3).

Figura 3-3. Diferenciação sexual de *Mysidopsis juniae*, aumento de 10x. A- macho. B- Fêmea com ovos no marsúpio. C- Fêmea com ovo no oviduto. D- Fêmea imatura, com marsúpio em desenvolvimento (Fonte: acervo do autor).



#### 3.3.4.4 Critérios de Aceitabilidade para o Teste Crônico de Curta Duração com *M. juniae*.

Os critérios de aceitabilidade do teste crônico de curta duração com *M. juniae* baseiam-se nos critérios estabelecidos pela USEPA (2002) para *M. bahia*. Inicialmente, a sobrevivência no controle deverá ser de no mínimo 80% e a fecundidade só poderá ser usada como critério de avaliação se 50% ou mais de fêmeas no controle tiverem ovos no oviduto ou no marsúpio. Para o comprimento e o peso seco ainda não há valores de referência estabelecidos para essa espécie, uma vez que esse trabalho é pioneiro na área.

#### 3.3.5 Análise Estatística

Ao final do teste foi efetuado o cálculo da  $CL_{50}$ , em 96 horas e sete dias, por meio do método Trimmed Spearman- Karber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977), assim como o seu intervalo de confiança (IC 95%). Os valores da  $CL_{50}$  foram comparados através do teste  $T$  de Student. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos do comprimento e peso seco utilizou-se a análise de variância seguida do teste de Dunnett (comparações múltiplas com o controle) com nível de significância de 5% através do programa GraphPad Prism versão 3.00 (GraphPad Software, Inc.).

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físicos-químicos dos ensaios realizados para ambos os metais mantiveram-se dentro do esperado para aceitabilidade do teste, apenas algumas variações, principalmente na salinidade, variaram acima do recomendado. As médias dos valores encontrados para os experimentos realizados para dos dois metais estudados encontram-se nos Anexos deste trabalho (ANEXOS C e D).

#### 3.4.2 Letalidade

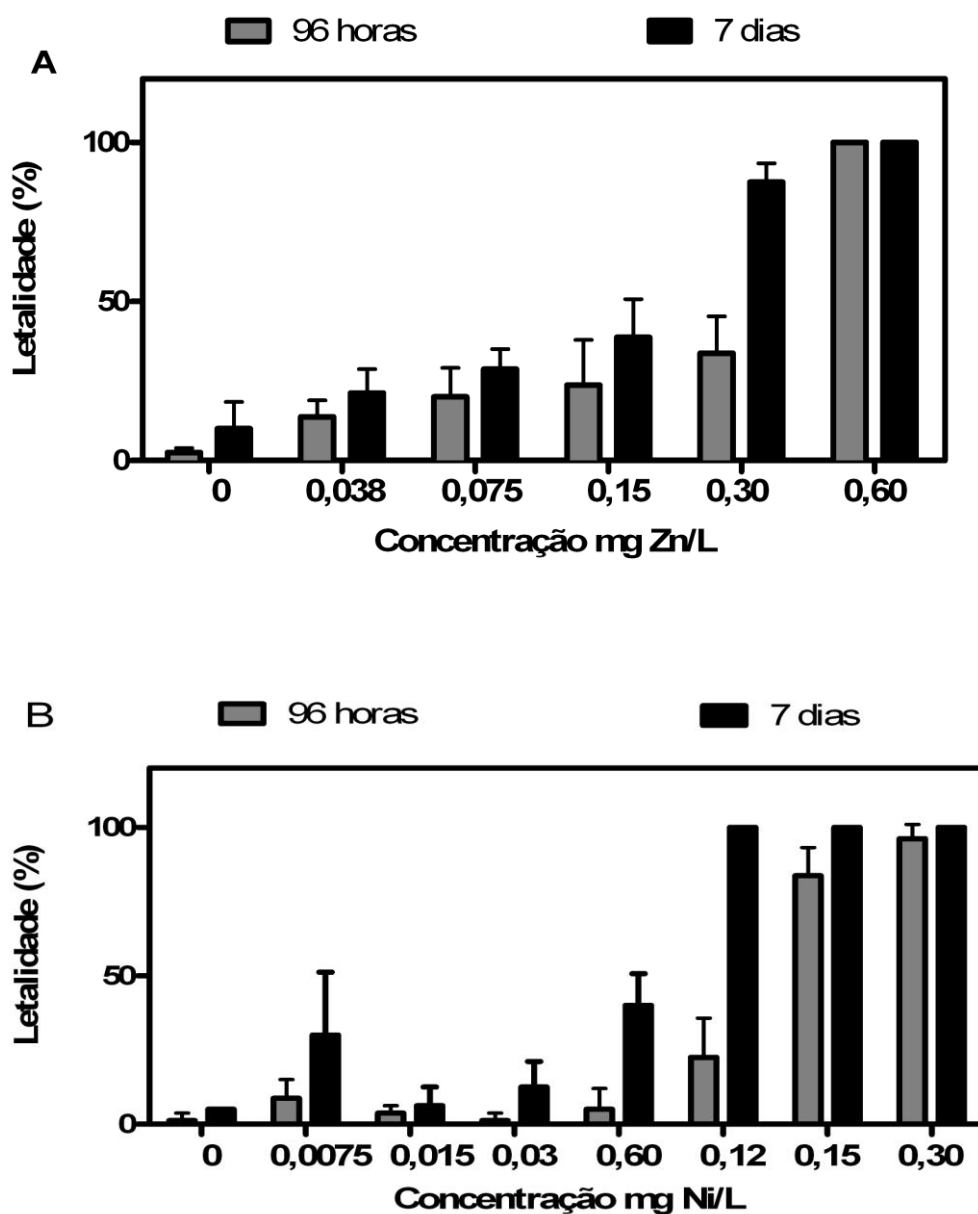
Quando consideramos 96 horas de exposição, período já padronizado para testes agudos com essa espécie (norma NBR 15.308/2005), a  $CL_{50}$  média dos quatro experimentos realizados para o zinco foi de  $0,27 \pm 0,01$  mg. L<sup>-1</sup> (n=4; coeficiente de variação de 40,35%) enquanto que para o níquel, a  $CL_{50}$  média de  $0,10 \pm 0,04$  mg. L<sup>-1</sup> (n=4; coeficiente de variação de 40,49%). Quando consideramos a duração completa do teste crônico de curta duração, sete dias, o valor da  $CL_{50}$  foi de  $0,17 \pm 0,07$  mg. L<sup>-1</sup> para o zinco, enquanto que para o níquel este valor foi para  $0,06 \pm 0,01$  mg. L<sup>-1</sup> (Tabela 3-1) (Figura 3-4).

Tabela 3-1. Média da Concentração Letal a 50% dos Organismos testados dos 4 experimentos realizados com zinco e níquel, após 7 dias de duração com *M. juniae*.

\* diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), através de teste *T* de Student.

	96 horas		7 dias	
	Zn	Ni	Zn	Ni
<b>Média das <math>CL_{50}</math></b>	0,27	0,10*	0,17	0,06*
<b>Desvio Padrão</b>	0,11	0,04	0,07	0,01

Figura 3-4. Letalidade, em 96 horas e 7 dias, de 4 experimentos com *Mysidopsis juniae* para experimentos realizados com zinco- A e com o níquel – B (média  $\pm$  desvio padrão).



### 3.4.3 Comprimento

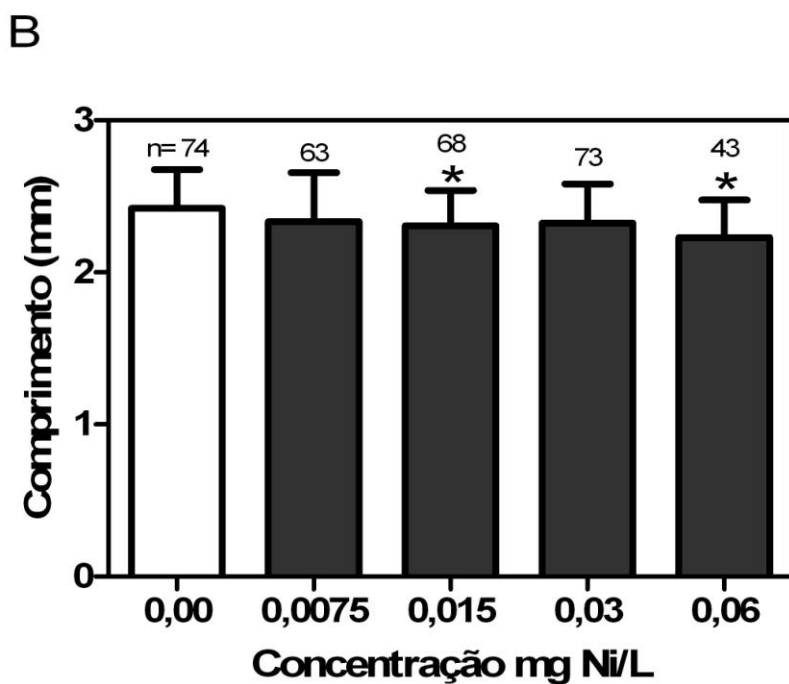
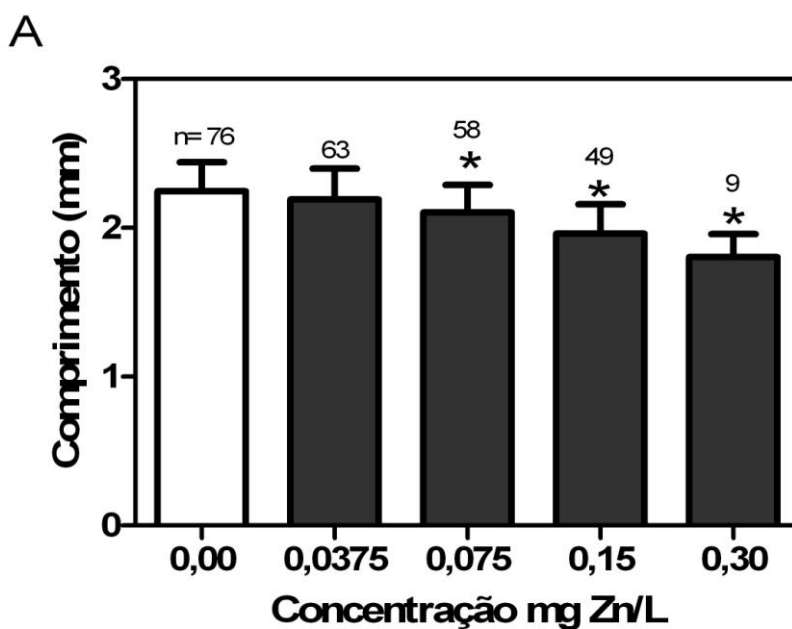
Considerando todos os experimentos realizados, a título de padronização, pode-se dizer que o comprimento médio dos misidáceos ao final dos testes no controle foi de  $2,33 \pm 0,24$  mm,  $n = 151$ , com coeficiente de variabilidade de 10,43%, sendo o valor mínimo de 1,79 mm e o máximo de 3,26 mm. O parâmetro comprimento de *M.*

*juniae*, assim como a letalidade, foi afetado pela exposição aos metais estudados, como pode ser observado pela Figura 3-5 que representa a média dos 4 experimentos realizados para ambos os metais.

No caso do zinco, houve uma redução no tamanho dos misidáceos em todas as concentrações de zinco, exceto para a menor concentração testada ( $0,038 \text{ mg.L}^{-1}$ ). A redução foi dose dependente com valor mínimo observado na concentração de  $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $1,80 \pm 0,16 \text{ mm}$ ). Há que se ressaltar que na maior concentração testada ( $0,60 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ocorreu 100% de letalidade. Sendo assim, o valor de CENO para esse parâmetro foi de  $0,038 \text{ mgZn.L}^{-1}$  e o valor de CEO foi de  $0,075 \text{ mgZn.L}^{-1}$ .

No caso do níquel, houve redução do comprimento em relação ao controle para as concentrações de  $0,015$  e  $0,060 \text{ mg.L}^{-1}$ , portanto a relação de dose-dependência não foi clara. Ainda assim, os valores de CENO e CEO foram calculado com base na menor concentração que apresentou efeito significativo, sendo o valor de CENO foi de  $0,007 \text{ mg Ni/L}$  e o valor de CEO foi de  $0,015 \text{ mg Ni.L}^{-1}$ . O comprimento mínimo observado foi de  $2,23 \pm 0,25 \text{ mm}$  na concentração de  $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Figura 3-5. Comprimento de *Mysidopsis juniae*, com idade inferior a 24h de vida, (média  $\pm$  desvio padrão) após 7 dias de exposição ao zinco- A e ao níquel- B (4 experimentos). \* diferença significativa do controle ( $p \leq 0,05$ ).



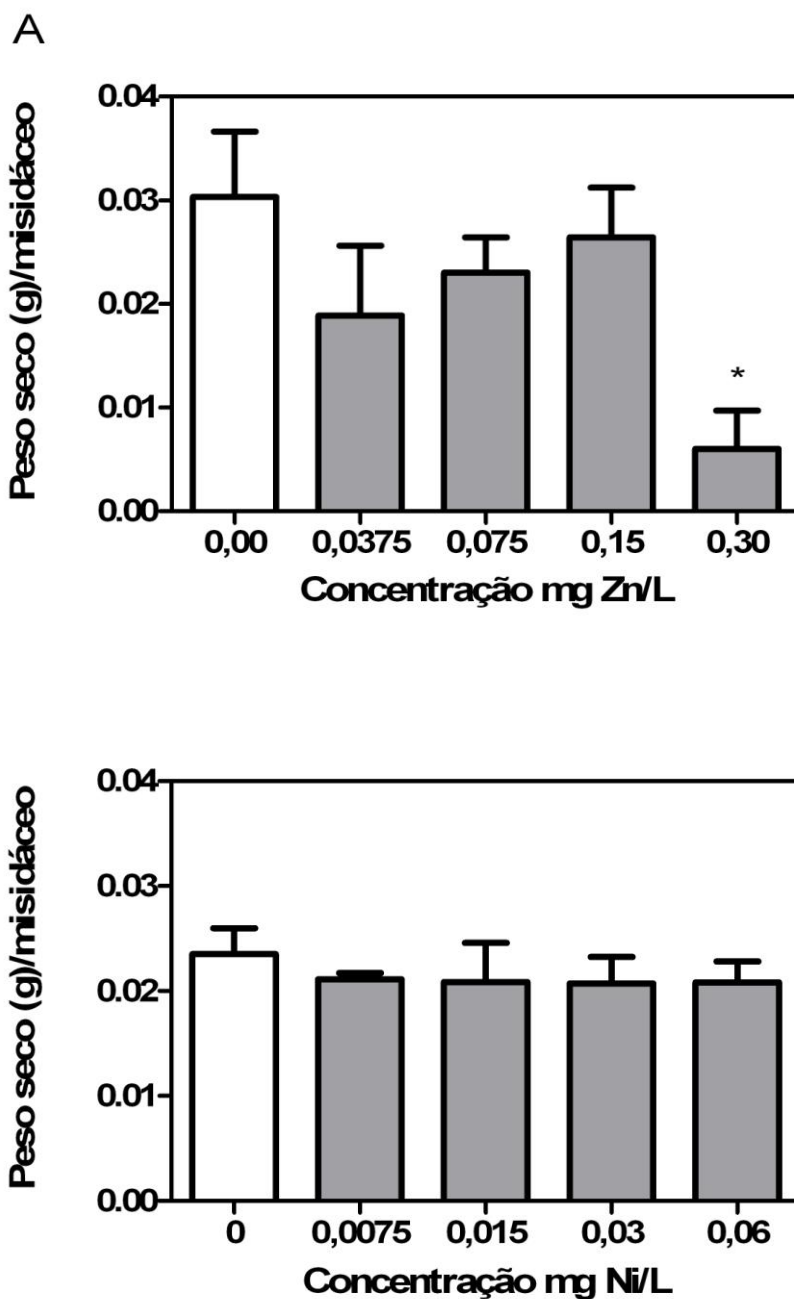


#### 3.4.4 Peso seco

Considerando todos os experimentos realizados, a título de padronização, pode-se dizer que o peso seco médio dos misidáceos ao final dos testes no controle foi de  $0,03 \pm 0,009$  mg,  $n = 8$ , com coeficiente de variabilidade de 33,98 %, sendo o valor mínimo de 0,02 mg e o máximo de 0,05 mg.

Não houve diferença significativa entre o controle e as concentrações testadas de zinco e de níquel, exceto para a maior concentração testada do zinco ( $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$ ) como ilustrado na Figura 3-6. Desta maneira, podemos afirmar que o valor de CENO para o zinco foi de  $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ , enquanto que o valor de CEO foi de  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Para o níquel não foi observado valor de CEO, pois nenhuma das concentrações apresentou efeito significativo, por outro lado, o CENO pode ser considerado a maior concentração testada ( $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Figura 3-6. Peso seco de *Mysidopsis juniae*, com idade inferior a 24h de vida, (média  $\pm$  desvio padrão) após 7 dias de exposição ao zinco- A e ao níquel- B (4 experimentos). \* diferença significativa do controle ( $p \leq 0,05$ ).



### 3.4.5 Fecundidade

Os resultados da fecundidade de *M. juniae* não mostraram-se estatisticamente diferentes do controle para os experimentos com zinco, mesmo que numericamente haja uma diminuição do número de fêmeas com ovos de acordo com o aumento das concentrações testadas (Tabela 3-2).

No manual dos testes com *M. bahia* padronizado pela USEPA (2002) aconselha-se que os dados de fecundidade nas concentrações, que houver mortalidade excessiva, não poderão ser analisados, o que inviabiliza a análise dos dados desse trabalho, uma vez que nas concentrações em que há um efeito na fecundidade há também uma mortalidade excessiva.

Na tentativa de analisar esse parâmetro, foram executados diversos protocolos diferentes que tentaram ajustar a questão da letalidade com a fecundidade, entretanto, quando conseguia-se o critério de aceitabilidade para essa análise, 50% de fêmeas com ovos no controle, a letalidade mostrava-se mais sensível ao zinco que a fecundidade.

Tabela 3-2. Resumo da fecundidade das fêmeas dos três experimentos realizados com *M. juniae*, de dez dias de vida, expostas ao zinco durante sete dias.

Concentrações (mg.L <sup>-1</sup> )	Total de misis	Número de vivos	Total de fêmeas	Total de fêmeas com ovos	Nº de fêmeas com ovos/ Nº total de fêmeas (%)
<b>Controle</b>	60	58	27	22	81
<b>0,019</b>	60	56	22	20	91
<b>0,038</b>	60	58	33	25	76
<b>0,075</b>	59	57	27	18	67
<b>0,15</b>	61	56	26	19	73
<b>0,30</b>	60	20	14	4	29

### 3.5 Discussão

Atualmente, a demanda por testes de medidas sub-letais ou testes crônicos vêm crescendo uma vez que esses ensaios consideram concentrações menores e, portanto são mais realistas (DEPLEDGE; AAGAARD; GYÖRKÖS, 1995).

Mesmo assim, ainda são poucos os protocolos crônicos desenvolvidos, principalmente para as espécies brasileiras, dos sete testes padronizados pela ABNT e 11 pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), apenas três avaliam toxicidade crônica em diferentes espécies de organismos (Quadro 3-2) (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Para o grupo estudado neste trabalho, a espécie *M. bahia*, nativa do hemisfério norte, é a mais utilizada, com vários resultados publicados, como pode ser visto no banco de dados da USEPA disponível na internet ([http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick\\_query.htm](http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm)), onde dos 57 trabalhos cadastrados que foram realizados com zinco, por exemplo, apenas em 17 não foram usados *M. bahia*.

Nipper et al., (1993) realizaram um dos poucos trabalhos de toxicidade de metal e de um composto orgânico com uma espécie de misidáceo nativa do Brasil. Esses autores avaliaram a sensibilidade dos copépodos *Acartia lilljeborgi* e *Temora stylifera* e do misidáceo *M. juniae* ao zinco e ao dodecil sulfato de sódio (DSS) e encontraram valores para CL<sub>50</sub> do zinco, em 96 horas, muito semelhantes para animais de diferentes idades (1, 2, 3 e 5 dias de vida) onde a média das CL<sub>50</sub> foi de  $0,28 \pm 0,01$  mg Zn. L<sup>-1</sup>.

Comparando a CL<sub>50</sub> obtida através do protocolo agudo já estabelecido no Brasil e a CL<sub>50</sub> obtida através protocolo do teste crônico de curta duração proposto nesse trabalho, podemos evidenciar que o níquel tem sua toxicidade aumentada quando são utilizados nos bioensaios organismos com idade inferior a 24 horas de vida, uma vez que a CL<sub>50</sub> passa de  $0,18 \pm 0,03$  mg Ni.L<sup>-1</sup> para  $0,10 \pm 0,04$  mg Ni.L<sup>-1</sup>, em 96 horas de experimento. Em sete dias de teste, a redução da CL<sub>50</sub> é ainda maior, com valor de  $0,06 \pm 0,04$  mg.L<sup>-1</sup>. Enquanto que para o zinco não há diferença entre os valores obtidos nos dois protocolos testados (agudo e crônico de curta duração) e nem nos dois períodos de tempo analisados (96 horas e 7 dias).

Quadro 3-2. Normas para testes ecotoxicológicos formuladas por instituições brasileiras. (Fonte: MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Entidade normatizadora	Tipo de teste
ABNT	NBR 15088. Toxicidade Aguda - Método de ensaio com peixe.
	NBR 12713. Toxicidade Aguda - Método de ensaio com <i>Daphnia spp.</i> (Crustacea, Cladocera).
	NBR 13373. Toxicidade Crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia spp.</i> (Crustacea, Cladocera).
	NBR 12648. Toxicidade Crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)
	NBR 15308. Toxicidade Aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea)
	NBR 15350. Toxicidade Crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do mar (Echinodermata, Echinodea)
	NBR 12716. Toxicidade Aguda - Método de ensaio com peixe - Parte III. Sistema de fluxo contínuo.
CETESB	L5.018 - Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera: Crustacea)
	L5.019 - Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I - sistema estático
	L5.019 - Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte II - sistema semi-estático
	L5.019 - Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte III - sistema de fluxo contínuo.
	L5.020 - Teste de toxicidade crônica com <i>Chlorella vulgaris</i> .
	L5.022 - Teste de toxicidade crônica utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea)
	L5.025 - Água: teste para avaliação de toxicidade aguda de cianofíceas (algas azuis).
	L5.227 - Teste de toxicidade aguda com bactéria luminescente <i>Vibrio fischeri</i> : método de ensaio.
	L5. 228 - Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i> : método de ensaio.
	L5.250 - Água do mar: Teste de toxicidade crônica de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> (Echinodermata, Echinoidea)
	L5.251 - Água do mar: Teste de toxicidade aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> (Crustacea, Mysidacea)

A relação encontrada entre a toxicidade dos metais estudados, como o níquel sendo mais tóxico que o zinco, quando consideramos exposições de sete dias ( $CL_{50}$  de  $0,21 \pm 0,01 \text{ mg. L}^{-1}$  para o zinco e  $0,06 \pm 0,01 \text{ mg. L}^{-1}$  para o níquel), também foi encontrada por outros autores como Baudouin e Scoppa (1974) ao estudar três espécies de zooplâncton (*Cyclops abyssorum*, *Eudiaptomus padanus* e *Daphnia*

*hyalina*) com valores de CL<sub>50</sub> (48h) para zinco de 5,5 mg. L<sup>-1</sup> (4,5-6,8); 0,50 mg. L<sup>-1</sup> (0,35-0,72) e 0,04 mg. L<sup>-1</sup> (0,03- 0,05) para cada espécie citada, enquanto que para o níquel os valores foram de 15,0 mg. L<sup>-1</sup> (8,8- 25,5); 3,6 mg. L<sup>-1</sup> (2,8- 4,6) e 1,90 mg. L<sup>-1</sup> (1,45- 2,48), respectivamente.

A relação de letalidade, CL<sub>50</sub> e tempo de exposição demonstrada pelos valores de CL<sub>50</sub> do zinco e níquel, no qual os valores da CL<sub>50</sub> em sete dias são menores do que os valores calculados em 96 horas, também foi encontrada por Eisler e Hennekey (1977) quando avaliaram a CL<sub>50</sub> de 5 metais (mercúrio, cádmio, zinco, níquel e cromo) em três períodos diferentes de exposição (24, 96 e 168 horas) com 6 espécies de animais (*Mya arenaria*, *Asterias forbesi*, *Pagurus longicarpus*, *Nereis virens*, *Nassarius obsoletus*, *Fundulus heteroclitus*). Para o crustáceo *Pagurus longicarpus* quando se compara a CL<sub>50</sub> de 24 horas (12 mg. L<sup>-1</sup>) com a de 96 horas (0,50 mg. L<sup>-1</sup>), assim como para o *M. juniae*, vemos um decréscimo significativo nos valores com o passar do tempo, entretanto, quando comparamos 96 com 168 horas (0,20 mg. L<sup>-1</sup>) esse decréscimo não é tão significativo. Para o níquel, os valores de CL<sub>50</sub>, do *Pagurus longicarpus*, também decresceram de maneira similar nos mesmos períodos de exposição (24, 96 e 168 horas), como valores de 130, 47, 30 mg. L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Autores como Harmon e Langdon (1996) ao testarem a sensibilidade de três espécies de misidáceo (*M. bahia*, *M. intii* e *Holmesimysis costata*) ao zinco e ao DSS utilizando testes crônicos de curta duração, realizados por seis laboratórios diferentes, relataram que o parâmetro crescimento para juvenis de misidáceos menores de sete dias de vida, é mais sensível que os parâmetros como a letalidade e a reprodução. Entretanto, esses mesmos autores expõem que a letalidade apresentou-se mais sensível ao zinco que os outros parâmetros avaliados, crescimento e peso seco. Os valores de CL<sub>50</sub> para o zinco, de sete dias, foi de 0,071 (0,05 - 0,10) mg. L<sup>-1</sup> para *H. costata* e > 0,23 mg. L<sup>-1</sup> para *M. intii*. Mais uma vez, os valores encontrados foram muito similares aos deste trabalho o que enfatiza a ideia que *M. juniae* é uma espécie tão sensível quanto outras espécies já bastante utilizadas em testes crônicos de curta duração.

Já o parâmetro crescimento mostrou-se mais sensível para *M. juniae* do que para outras espécies como *M. intii* e de *H. costata*, isso porque para nesse trabalho o crescimento de *M. juniae* foi afetado a partir de concentrações de 0,075 mg.L<sup>-1</sup> de zinco, enquanto que Harmon e Langdon (1996) relataram que esse parâmetro em *M.*

*intii* só foi afetado em concentrações iguais ou superiores a 0,23 mg. L<sup>-1</sup> e para o *H. costata* não foi encontrada diferença nem mesmo na maior concentração testada (0,23 mg. L<sup>-1</sup>). Quando consideramos o níquel, a espécie brasileira também se mostrou mais sensível do que *M. intii*, uma vez que o crescimento de *M. juniae* foi afetado em concentrações de 0,015 e 0,06 mg.L<sup>-1</sup> enquanto que para o *M. intii* só houve redução do crescimento em concentrações iguais ou acima de 0,084 mg.L<sup>-1</sup>, como demonstrado por Hunt et al. (2002).

Para autores como Lussier, Gentile e Walker (1985) a ordem de toxicidade para o crescimento de *M. bahia* é Cu > Cd > Zn, se levarmos em consideração apenas esses metais, já Verslycke et al., (2003) acreditam que a ordem de toxicidade para metais de *Neomysis integer* é Hg > Cd > Cu > Zn > Ni > Pb, mas que essa ordem depende da salinidade no qual o teste foi realizado.

Cripe et al. (2000) relatam que outros parâmetros sub-letais, como o peso, são ainda mais sensíveis que o crescimento, o que o torna um excelente parâmetro para análise da toxicidade. Entretanto, neste trabalho o peso seco não se mostrou como um parâmetro sensível, uma vez que não foi encontrada diferença significativa entre o controle e as concentrações de níquel testadas, enquanto que para o zinco houve diferença apenas na maior concentração testada. Badaró-Pedroso (1993) ao testar zinco também em *M. juniae*, não encontrou diferença entre o controle e todas as concentrações testadas do metal (0,018; 0,032; 0,056 e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>), para esse trabalho os parâmetros letalidade e comprimento de *M. juniae* também foram mais sensíveis ao zinco. Enquanto que para o cobre, o autor relata que o peso seco e o comprimento do mesmo organismo teste só foi afetado em concentrações maiores de 0,015 mgCu.L<sup>-1</sup> (BADARÓ-PEDROSO, 1993).

Ward e Kramer (2002), quando avaliaram o peso seco de *M. bahia* de diferentes idades expostos a prata em testes de diferentes duração, encontraram que o peso seco é um parâmetro que além de variar com tempo de duração do experimento, a idade dos organismos também pode influenciar na resposta, isso porque para testes com 28 dias de duração o peso seco foi afetado em concentrações de 0,12 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que para os testes como sete dias de duração e iniciados com misidáceos menores de 24 horas de vida, o peso foi afetado em concentrações de 0,12 e 0,24 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, para os testes de também sete dias de duração, mas iniciados com organismos com sete dias de vida não foram encontradas diferenças do controle em relação a nenhuma das concentrações testadas, corroborando com

Ward e Kramer (2002) que afirmam que os primeiros sete dias, das espécies de misidáceos, são os mais sensíveis e, portanto, os melhores a serem utilizados em análises de efeitos subletais nessas espécies.

Para *M. juniae* o comprimento mostrou mais sensível para ambos os metais que os outros parâmetros avaliados, ressaltando a ideia que organismos < 24 horas de vida são bastante afetados nesse parâmetro. Para o peso seco, o grande desvio entre os dados e o “n” pequeno, já que eram realizados *pool* de organismos, talvez não tenha permitido verificar uma maior diferença entre os valores encontrados. Para o níquel, os organismos < 24 horas de vida revelaram-se mais sensível que os organismos com idade entre um e oito dias de vida, enquanto que para o zinco essa relação entre a idade dos organismos testes e a toxicidade do metal não foi verificada.

Trabalho como os realizados por Breteler, Williams e Buhl (1982) mostram que a redução no crescimento interfere diretamente na reprodução dos organismos, podendo assim utilizar esse parâmetro como uma estimativa indireta da reprodução. Isso porque a reprodução é sempre um critério de avaliação importante, devido a sua relevância ecológica por interferir diretamente no equilíbrio das comunidades, principalmente para organismos como os misidáceos, que por fazerem parte do segundo nível trófico dos estuários, servem como alimento e, portanto, elos na cadeia alimentar (CRIPE et al., 2000).

Contudo, a avaliação desse parâmetro torna-se muitas vezes dificultada por fatores externos que podem introduzir um efeito não relacionado com a substância testada como, por exemplo, manuseio durante o experimento, que pode levar a um retardo na maturação sexual dos organismos testados e a uma dificuldade na avaliação desse critério (FIGUEIREDO, 2010). Ou ainda a fecundidade das fêmeas pode ser alterada pela mortalidade, já que após os vários dias de exposição sobram poucos sobreviventes para serem avaliados e, portanto, não permite uma determinação significativa dos efeitos dos elementos químicos nos organismos teste, como relata Hunt et al. (2002) quando testaram os efeitos agudos e crônicos do níquel em *M. intii* e conseguiram apenas poucas fêmeas grávidas no experimento, mesmo após 28 dias de exposição e, sendo sabido que as fêmeas dessa espécie com 20 dias já podem estar fecundadas. O mesmo foi exposto por Cripe et al. (2000) que também não encontraram ovos nos ovidutos das fêmeas de *M. bahia* mesmo após 14 dias de exposição.



Lussier, Gentile e Walker (1985) em seus experimentos com *M. bahia* e nove metais diferentes, que duraram entre 29 e 51 dias, encontraram que para o mercúrio, o zinco, o níquel e o arsênico a reprodução mostrou-se igualmente sensível a letalidade, enquanto que para o cádmio a mortalidade foi mais sensível que a reprodução e para o cobre, a prata, o crômio, e o chumbo a reprodução foi ainda mais sensível que a letalidade. Outros autores como Morton et al. (1997) testando azinofos-metil, uma substância orgânica, também não encontrou retardo na primeira produção de ovos pelas fêmeas de *M. bahia*. Entretanto, McKenney Jr e Celestial (1996) encontraram diferença significativa em relação ao controle nesse parâmetro quando expôs essa mesma espécie a metopreno, um pesticida. Isso demonstra o quanto o parâmetro reprodução pode variar sua resposta e, portanto, dificultar a sua análise.

Outra questão levantada por Ward e Kramer (2002) que avaliaram a reprodução, é o fato de normalmente a maior concentração nominal da amostra que não causa efeito deletério (CENO) estatisticamente significativo nos organismos, nas condições de ensaio normalmente ser muito próxima a menor concentração que se observa efeito (CEO) na letalidade o que interfere na interpretação dos dados, uma vez que ao fim do experimento na concentração que seria possível detectar efeito na fecundidade poucos organismos sobreviveram e, portanto, não é possível fazer uma análise estatística adequada. No presente trabalho, observamos uma redução no número de fêmeas com ovos em relação ao total de fêmeas que foi de 83% no controle e de apenas 29% na maior concentração testada (0,3 mg. L<sup>-1</sup>). Apesar disso, apenas um terço dos animais sobreviveu, o que impossibilita a comparação entre os dados. Portanto, pelo menos para o zinco, não há diferença entre a concentração que causa efeito na reprodução e na mortalidade, inviabilizando a utilização da reprodução como um parâmetro de análise.

Para alguns autores os parâmetros sub-letais, como crescimento, peso e ou até mesmo a letalidade se considerada por um período maior de exposição podem ser até mesmo mais relevantes que a reprodução, já que esses parâmetros muitas vezes mostram-se mais sensíveis que a reprodução e apresentam menos problemas que esta na sua execução. Com isso, esses parâmetros podem ser facilmente utilizados em trabalhos de monitoramento e até mesmo para regulamentar as concentrações das substâncias no ambiente visando a proteção desses ambientes

(HUNT et al., 1997; CRIPE et al., 2000; HUNT et al., 2002; WARD; KRAMER, 2002; WOODS; DAVI; ARNOLD, 2004; WARD et al., 2006).

### 3.6 Conclusões

Diante do exposto, pode-se concluir que a letalidade, o comprimento e o peso seco de *M. juniae* foram afetados pela exposição ao zinco, enquanto que para o níquel apenas o peso seco não sofreu redução em relação ao controle. Já os dados da reprodução não foram possíveis de avaliar adequadamente. De acordo com os valores de CENO E CEO, o comprimento mostrou-se mais sensível do que os outros parâmetros analisados aos metais testados.

Os valores de CL<sub>50</sub> mostram-se distintos para os períodos avaliados. Em 96 horas, o zinco teve uma média igual  $0,27 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  enquanto que para o níquel esse valor foi maior do que a maior concentração testada nos experimentos que foram analisados os parâmetros sub-letais. Nos testes crônicos que realizou-se apenas o cálculo da CL<sub>50</sub>, a média foi de  $0,10 \pm 0,04 \text{ mg.L}^{-1}$ . Já em sete dias, o níquel mostrou-se mais tóxico que o zinco com valores de CL<sub>50</sub> média de  $0,06 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,21 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Com isso, o protocolo de análise da toxicidade crônica utilizando *M. juniae* pode ser utilizado para avaliar os efeitos no comprimento, peso seco e a letalidade dos metais zinco e níquel e possivelmente de outros poluentes. É extremamente importante a padronização desta metodologia que baseia-se na utilização de animais cultiváveis, reduzindo o impacto dos próprios testes nas comunidades naturais.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae*, uma espécie nativa, cultivável e reconhecidamente sensível, mostrou-se bastante sensível aos metais zinco e níquel, tanto quando avaliado em protocolo agudo, com os metais isolados e em mistura, e quando avaliado no protocolo crônico de curta duração, proposto neste trabalho, o que permite dizer que esses organismos podem ser utilizados com uma importante ferramenta de análise de toxicidade de metais.

Entretanto, fazem-se necessários mais estudos com essa espécie para elucidar questões como a sua biologia e o seu comportamento que mesmo sendo reconhecidamente sensível ainda é pouco estudada em nosso país. Assim como, ainda se faz necessário estudo com misturas mais complexas que levem em consideração também outras classes de substâncias químicas para avaliar o comportamento desses organismos. Como também estudos genômicos para esclarecer o modo de ação dos metais zinco e níquel em *M. juniae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR – 15.308. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com misidáceos (Crustacea)**, 2005.

ANJOS, J. A. S. A. **Avaliação da Eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: O caso da Plumbum de Santo Amaro da Purificação/BA**. (2003). 238 f. (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21<sup>st</sup> ed. Washington, 2005.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2006. Cap. 6, p. 117-152.

BADARÓ-PEDROSO, C. **Toxicidade crônica de amostras ambientais do canal de São Sebastião e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (Crustacea: Mysidacea)**. (1993). 165 f. (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. Testes de toxicidade aguda com misidáceos – ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustácea: Mysidacea). In NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha**. Aplicações no Brasil. 2002, p. 123-169, Ed. Artes gráficas e indústria LTDA.

BAUDOUIIN, M. F.; SCOPPA, P. Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 745-751, 1974.

BAGGIO, H. F. **Contribuições naturais e antropogênicas para a concentração e distribuição de metais pesados em água superficial e sedimento de corrente na bacia do rio do Formoso, município de Buritizeiro-MG**. (2008). 234 f. (Doutorado) - Instituto de Geociências, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

BRASIL. Resolução Conama 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 da União*, Brasília, Edição no 87 de 07/05/2004.

\_\_\_\_\_. Resolução Conama nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. *Diário Oficial da União*, Brasília, Edição no 53 de 18/03/2005.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre os**

**parâmetros, condições, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores, alterou parcialmente e complementou a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** *Diário Oficial da União*, Brasília, Edição nº 92 de 16/05/2011.

\_\_\_\_\_. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo Demográfico 2010- Características da população e dos domicílios.** Rio de Janeiro, 2011.

\_\_\_\_\_. Departamento Nacional de Proteção Mineral (DNPM). **Anuário Mineral Brasileiro.** Brasília, 2001.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil.** Brasília, 2010.

BIELMYER, G. K., GROSELL, M.; BRIX, K. V. Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 12, p. 4040-4040, 2006.

BLISS, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585-615, 1939.

BRETELER, R. J.; WILLIAMS, J. W.; BUHL, R. L. Measurement of chronic toxicity using the opossum shrimp *Mysidopsis bahia*. **Hydrobiologia**, v. 93, n. 1-2, p. 189-194, 1982.

BRIX, K. V., *et al.* Effects of copper, cadmium, and zinc on the hatching success of brine shrimp (*Artemia franciscana*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 4, p. 580-583, 2006.

BURUAEM, L. *et al.* Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. v., n. 1879-3363 (Electronic), p., 2012.

CALABRESE, A., *et al.* The toxicity of heavy metals to embryos of the american oyster *Crassostrea virginica*. **Marine Biology**, v. 18, n. 3, p. 162-166, 1973.

CALAMARI, D.; VIGHI, M. A proposal to define quality objectives for aquatic life for mixtures of chemical substances. **Chemosphere**, v. 25, n. 4, p. 531-542, 1992.

CORNELIS A.M. *et al.* (eds). **Mixture toxicity: linking approaches from ecological and human toxicology.** New York: SETAC Books, 2011. 302 p.

COONEY, J.D. 1995. Freshwaters tests. In: RAND, G.M. Ed. *Fundamentals of aquatic toxicology.* 2 ed. 1125 p.

CRIFE, G. M., *et al.* Effects of whole sediments from Corpus Christi Bay on survival, growth, and reproduction of the mysid, *Americamysis bahia* (Formerly *Mysidopsis bahia*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 426-433, 2000.

DEPLEDGE, M. H.; AAGAARD, A.; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1–3, p. 19-27, 1995.

DEZOTTI, M. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2008. 360 p. (Série Escola Piloto de Engenharia Química)

DOREA, J. G.; BARBOSA, A. C. Fish consumption and blood mercury: Proven health benefits or probable neurotoxic risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n. 2, p. 249-250, 2005.

DRESCHER, K.; BOEDEKER, W. Assessment of the combined effects of substances: The Relationship between Concentration Addition and Independent Action. **Biometrics**, v. 51, n. 2, p. 716-730, 1995.

EISLER, R.; HENNEKEY, R. Acute toxicities of Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>+6</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> to estuarine macrofauna. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 315-323, 1977.

EISLER, R. **Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. US Geological Survey, Biological Resources Division, Biological Science Report USGS/BRD/BSR-1998-2001.p. 76, 1998.

ENSERINK, E. L.; MAAS-DIEPEVEEN, J. L.; VAN LEEUWEN, C. J. Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. **Water Research**, v. 25, n. 6, p. 679-687, 1991.

FERREIRA, A. L. G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 28-39, 2008.

FIGUEIREDO, L.P. **Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Mysidopsis juniae***. 2010. 47f. (Monografia), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

FRANCO, J. L., *et al.* Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 3, p. 232-240, 2006.

GOMEZ-EYLES, J. L., *et al.* Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 71-79, 2009.

GOPAL, R., *et al.* Chelating efficacy of CaNa<sub>2</sub> EDTA on nickel-induced toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) through its effects on glutathione peroxidase, reduced glutathione and lipid peroxidation. **Comptes Rendus Biologies**, v. 332, n. 8, p. 685-696, 2009.

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

HARMON, V. L.; LANGDON, C. J. A 7-D toxicity test for marine pollutants using the pacific mysid *Mysidopsis intii*. 2. Protocol evaluation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 1824-1830, 1996.

HERMENS, J. *et al.* Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: Acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 143-154, 1984.

HERSHFINKEL, M., *et al.* A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> and regulates ion transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11749-11754, 2001.

HUNT, J. W., *et al.* Precision and sensitivity of a seven-day growth and survival toxicity test using the west coast marine mysid crustacean *Holmesimysis costata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 824-834, 1997.

HUNT, J. W., *et al.* Acute and chronic toxicity of nickel to marine organisms: Implications for water quality criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 2423-2430, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011. Atlas Geográfico das Zonas Costeiras e Oceânicas. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2036&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2036&id_pagina=1). Acesso em: 23 de janeiro de 2013.

JONKER, M. J., *et al.* Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701-2713, 2005.

KÖNEMANN, H. Structure—activity relationships and additivity in fish toxicities of environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 4, n. 4, p. 415-421, 1980.

KÖNEMANN, H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. **Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 229-238, 1981.

KRAAK, M. H. S.; STUIJFZAND, S. C.; ADMIRAAL, W. Ecotoxicity of mixtures of metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 109-114, 1994.

LEMOS, J.L.S. *et al.* **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 65 p., 2008.

LOEWE, S; MUISCHNEK, H. Combined effects I announcement-Implements to the problem. Naunyn Schmiedeberg's. **Arch Exp Pathol Pharmacol**, vol. 114, p. 313–326, 1926.

LOUREIRO, S., *et al.* Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1716-1726, 2010.

LUSSIER, S. M., GENTILE, J. H.; WALKER, J. Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (crustacea:mysidacea). **Aquatic Toxicology**, v. 7, n. 1–2, p. 25-35, 1985.

MACÊDO, L.S.; MORRIL, W.B.B. **Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: Revisão da literatura**. Tecnol. & Ciên. Agropec., v. 2, n. 2, p. 29-38, 2008.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

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.

MCKENNEY JR, C. L.; CELESTIAL, D. M. Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a juvenile hormone analogue through a complete life cycle. **Aquatic Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 11-20, 1996.

MEES, J.; ABDULKERIM, Z.; AMERLYNCK, O. Life history, growth and production of *Neomysis integer* in the Westerschelde estuary (S.W. Netherlands). **Marine Ecology Progress Series**. n.109, p. 43-57, 1994.

MISRA, M.; RODRIGUEZ, R. E.; KASPRZAK, K.S. Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. **Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 1-17, 1990.

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

MORTON, M. G., *et al.* Acute and Chronic Toxicity of azinphos-methyl to two estuarine species, *Mysidopsis bahia* and *Cyprinodon variegatus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 436-441, 1997.

NEGILSKI, D. S.; AHSANULLAH, M; MOBLEY, M. C. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. II. Effects of paired and triad combinations of metals. **Marine Biology**, v. 64, n. 3, p. 305-309, 1981.



NIENCHESKI, L.F.; MILANI, M.R.; MILANI, I. **Metais traços: Água**. In: Baptista Neto, J.A.; Wallner-Kersanach, M.; Patchineelam, S.M. (Org.). *Poluição Marinha*. 1 Ed. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 7, p.179-196, 2008.

NILIN, J. **Avaliação da qualidade do sedimento do estuário do rio Ceará**. (2008). 95 f. (Mestrado) - Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

NIPPER, M., *et al.* Toxicity testing with coastal species of Southeastern Brazil. Mysids and copepods. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 99-106, 1993.

NORBERG-KING, T.J. Seven-days test and chronic test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, n.11, p. 1327-1434, 1990.

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.

O'BRIEN, D. P. Analysis of the internal arrangement of individuals within crustacean aggregations (Euphausiacea, Mysidacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 128, n. 1, p. 1-30, 1989.

OLMSTEAD, A. W.; LEBLANC, G. A. Toxicity assessment of environmentally relevant pollutant mixtures using a heuristic model. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 1, n. 2, p. 114-122, 2005.

OTITOLOJU, A. A. Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 3, p. 404-415, 2002.

PARROTT, J. L.; SPRAGUE, J. B. Patterns in toxicity of sublethal mixtures of metals and organic chemicals determined by Microtox® and by DNA, RNA, and protein content of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, n. 10, p. 2245-2253, 1993.

PAVLAKI, M. D., *et al.* Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99-110, 2010.

PHILLIPS, B. M., *et al.* Toxicity of cadmium-copper-nickel-zinc mixtures to larval purple sea urchins (*Strongylocentrotus purpuratus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 0592-0599, 2003.

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

PROPHETE, C., *et al.* Effects of elevated temperature and nickel pollution on the immune status of *Japanese medaka*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, n. 3, p. 325-334, 2006.

PTASHYNSKI, M. D., *et al.* Accumulation, distribution and toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*).

**Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 130, n. 2, p. 145-162, 2001.

PTASHYNSKI, M. D., *et al.* Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, v. 58, n. 3–4, p. 229-247, 2002.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, n. 3, p. 497-507, 2002.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington. 665 p., 1985.

RESGALLA JÚNIOR, C.; LAITANO, K.S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Notas téc. FACIMAR – Rev. Fac. Ciênc. Mar**, Itajaí. v.6, p.153-163, 2002.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. The position maintenance behaviour of *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) in response to current velocity, substratum and salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 220, n. 1, p. 25-45, 1998.

RUPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.

SARABIA, R., *et al.* Sublethal zinc exposure has a detrimental effect on reproductive performance but not on the cyst hatching success of *Artemia parthenogenetica*. **Science of The Total Environment**, v. 398, n. 1–3, p. 48-52, 2008.

SILVA. V.M.A.P da. ***Mysidopsis juniae***, 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.

SIQUEIRA, J. O. *et al.* **Microorganismo e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPAP/CNPS, 1994. 142 (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 45).

SPRY, D.; WOOD, C. Acid-base, plasma ion and blood gas changes in rainbow trout during short term toxic zinc exposure. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 154, n. 2, p. 149-158, 1984.

STUMM, W.; Morgan, J. J. **Aquatic chemistry – Chemical equilibria and rates in natural waters**. Nova Iorque. John Wiley & Sons, 3ed., 1996.

TARALDSEN, J. E.; NORBERG-KING, T. J. New method for determining effluent toxicity using duckweed (*Lemna Minor*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 761-767, 1990.

TATTERSALL, W.M.; TATTERSALL, O.S. The British Mysidacea. **Ray Society Monograph: London**. 1951.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles, and perspectives. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 1, p. 151–173, 1977.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms: Mysid, *Mysidopsis bahia*, Survival, Growth, and Fecundity Test Method**, 3. ed., 2002.

\_\_\_\_\_. United States Environmental Protection Agency. **ECOTOX Database**. Disponível em: [http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick\\_query.htm](http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm). Acesso em 16 de janeiro de 2013.

VAN GESTEL, C. A. M.; HENSBERGEN, P. J. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 1177-1186, 1997.

VERRIOPOULOS, G.; DIMAS, S. Combined toxicity of copper, cadmium, zinc, lead, nickel, and chrome to the copepod *Tisbe holothuriae*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 378-384, 1988.

VERSLYCKE, T. *et al.* The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 307-315, 2003.

VIJAYAVEL, K., *et al.* Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 1, p. 133-139, 2009.

VITALE, A. M., *et al.* Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 121-129, 1999.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2–3, p. 203-216, 2001.

WARD, T. J.; KRAMER, J. R. Silver speciation during chronic toxicity tests with the mysid, *Americamysis bahia*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 1–2, p. 75-86, 2002.

WARD, T. J., *et al.* Influence of salinity and organic carbon on the chronic toxicity of silver to mysids (*Americamysis bahia*) and silversides (*Menidia beryllina*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 1809-1816, 2006.

WEIS, J. S. Effect of zinc on regeneration in the fiddler crab *Uca pugilator* and its interactions with methylmercury and cadmium. **Marine Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 249-255, 1980.

WEINSTEIN, D. A.; BIRK, E. M. The effects of chemicals on the structure of terrestrial ecosystems: mechanisms and patterns of change. p. 181-209, 1989. *In*: WRIGHT, D. A; WELBOURN, P. (ed). **Environmental toxicology**. Cambridge Environmental Chemistry Series, 2002. Cap. 2. p. 21-66.

WOODS, R; DAVI, R.; ARNOLD, W. Toxicity of Vanadium to the Estuarine Mysid, *Americamysis bahia* (Molenock) (Formerly *Mysidopsis bahia*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 4, p. 635-643, 2004.

XU, X., *et al.* Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 294-300, 2011.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. D. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**, v. 21, n., p. 551-556, 1998.

ZAMBONI, A.J. *et al.* **Efeito da temperatura na toxicidade aguda de cobre e zinco sobre diferentes estágios de vida de *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea)**. *In*: III Simpósio sobre Oceanografia, 1996. IOUSP, São Paulo, SP. (Livro de Resumos). p. 284, 1996.

**ANEXO(S)**

ANEXO A- Tabela resumo dos parâmetros físicos-químicos (pH, oxigênio dissolvido – OD e salinidade- Sal) no início e fim dos experimentos agudos realizados com zinco-Zn (Média; Desvio Padrão; Coeficiente de Variação; n=4)

	<b>pH início Zn</b>	<b>pH fim Zn</b>	<b>OD início Zn</b>	<b>OD fim Zn</b>	<b>Sal início Zn</b>	<b>Sal fim Zn</b>
<b>Média</b>	7,79	7.70	7,18	5,76	35	36
<b>Desvio Padrão</b>	0,31	0,31	0,80	0,98	0,51	0,72
<b>Coeficiente de Variação</b>	3,99%	4,08%	11,22%	17,04%	1,44%	1,97%

ANEXO B - Tabela resumo dos parâmetros físicos-químicos (pH, oxigênio dissolvido – OD e salinidade- Sal) no início e fim dos experimentos agudos realizados com níquel- Ni (Média; Desvio Padrão; Coeficiente de Variação; n=4).

	<b>pH início Zn</b>	<b>pH fim Zn</b>	<b>OD início Zn</b>	<b>OD fim Zn</b>	<b>Sal início Zn</b>	<b>Sal fim Zn</b>
<b>Média</b>	7,71	7,80	7,66	6,33	36	37
<b>Desvio Padrão</b>	0,27	0,31	0,47	1,15	0,48	0,64
<b>Coeficiente de Variação</b>	3,48%	3,94%	6,15%	18,20%	1,35%	1,74%

ANEXO C- Tabela resumo dos parâmetros físicos-químicos (pH, oxigênio dissolvido – OD e salinidade- Sal) no início e fim dos experimentos crônicos realizados com zinco-Zn (Média; Desvio Padrão; Coeficiente de Variação; n=4).

	pH início Zn	pH fim Zn	OD início Zn	OD fim Zn	Sal início Zn	Sal fim Zn
<b>Média</b>	8,03	7,77	6,40	5,49	36	38
<b>Desvio Padrão</b>	0,15	0,07	0,32	0,44	0,88	1,42
<b>Coeficiente de Variação</b>	1,82%	0,97%	5,06%	7,94%	2,42%	3,77%

ANEXO D - Tabela resumo dos parâmetros físicos-químicos (pH, oxigênio dissolvido – OD e salinidade- Sal) no início e fim dos experimentos crônicos realizados com níquel- Ni (Média; Desvio Padrão; Coeficiente de Variação; n=4).

	pH início Ni	pH fim Ni	OD início Ni	OD fim Ni	Sal início Ni	Sal fim Ni
<b>Média</b>	7,89	7,57	5,23	4,88	35	37
<b>Desvio Padrão</b>	0,11	0,29	0,71	0,95	0,28	0,61
<b>Coeficiente de Variação</b>	1,39%	3,84%	13,57%	19,43%	0,80%	1,65%

ANEXO E - Tabela Resumo dos efeitos da mistura binária dos metais níquel e do zinco na letalidade de *M. juniae*, experimento 1.

	Ação Independente (26/03/12)				Concentração de Adição (26/03/12)			
	Referência	S/A	DR	DL	Referência	S/A	DR	DL
<b>Max</b>	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
<b>beta (Ni)</b>	2.5748732	2.603601	3.116057	2.854798	2.861930084	2.555368	2.994916126	2.902443
<b>beta (Zn)</b>	4.6382056	4.681882	4.197982	5.260744	3.837931718	4.747973	4.732673906	5.124876
<b>EC<sub>50</sub> (Ni)</b>	0.1417203	0.143022	0.151342	0.149376	0.177993173	0.139232	0.15341634	0.14892
<b>EC<sub>50</sub> (Zn)</b>	0.2699835	0.271377	0.24991	0.26226	0.311439685	0.258524	0.240878206	0.261048
<b>A</b>	-	-0.16124	5.621237	-1.78701	-	1.840829	4.457101168	-0.00748
<b>b<sub>Ni</sub></b>	-	-	-13.1751	-	-	-	-6.80240541	-
<b>b<sub>Zn</sub></b>	-	-	-	2.405208	-	-	-	167.6092
<b>SS</b>	7.2403232	7.237388	6.279291	7.069599	9.270540822	7.111299	5.94977854	7.236447
<b>R<sup>2</sup></b>	0.8206794	0.820752	0.844481	0.824908	0.770397141	0.823875	0.852642236	0.820775
<b>χ<sup>2</sup></b>	-	0.002935	0.961033	0.170724	-	2.159242	3.320762282	2.034094
<b>DF</b>	-	1	2	2	-	1	2	2
<b>p(x<sup>2</sup>)</b>	<b>1.1202E-06</b>	0.956792	0.618464	0.91818	<b>2.91286E-06</b>	0.141715	0.190066524	0.361661

ANEXO F - Tabela resumo dos efeitos da mistura binária dos metais níquel e do zinco na letalidade de *M. juniae*, experimento 2.

	Ação Independente (09/04/12)				Concentração de Adição (09/04/12)			
	Referência	S/A	DR	DL	Referência	S/A	DR	DL
<b>Max</b>	0.9724431	0.97058	0.970751	0.968783	0.95251656	0.951452	0.952666781	0.951483
<b>beta (Ni)</b>	3.2985389	3.616331	3.528068	3.094135	3.678106866	3.882695	3.74021283	4.027794
<b>beta (Zn)</b>	5.2837021	5.560869	5.625206	3.977913	14.48607335	16.20653	18.32788236	20.10902
<b>EC<sub>50</sub> (Ni)</b>	0.1577564	0.162719	0.162421	0.154364	0.196917404	0.168063	0.165448115	0.171284
<b>EC<sub>50</sub> (Zn)</b>	0.2351296	0.245088	0.247047	0.254632	0.286684946	0.277367	0.28066521	0.281756
<b>A</b>	-	-1.14499	-1.78791	4.239056	-	0.807938	0.409854743	-0.00335
<b>b<sub>Ni</sub></b>	-	-	1.511256	-	-	-	1.036962721	-
<b>b<sub>Zn</sub></b>	-	-	-	3.051023	-	-	-	173.7303
<b>SS</b>	8.1220309	8.019115	8.0109	7.313669	8.61050435	7.419031	7.37410512	7.574735
<b>R<sup>2</sup></b>	0.8225578	0.824806	0.824986	0.840218	0.811886121	0.837916	0.838897762	0.834515
<b>X<sup>2</sup></b>	-	0.102916	0.111131	0.808362	-	1.191474	1.23639923	1.035769
<b>DF</b>	-	1	2	2	-	1	2	2
<b>p(x<sup>2</sup>)</b>	<b>1.323E-07</b>	0.748358	0.94595	0.667523	<b>1.66779E-07</b>	0.275033	0.538913818	0.59578



ANEXO G - Tabela resumo dos efeitos da mistura binária dos metais níquel e do zinco na letalidade de *M. juniae*, experimento 3.

	<b>Ação Independente (16/04/12)</b>				<b>Concentração de Adição (16/04/12)</b>			
	<b>Referência</b>	<b>S/A</b>	<b>DR</b>	<b>DL</b>	<b>Referência</b>	<b>S/A</b>	<b>DR</b>	<b>DL</b>
<b>Max</b>	0.98	0.98	0.98	0.98	0.966543	0.967049	0.967473	0.966823
<b>beta (Ni)</b>	3.336086	3.275661	3.292011	2.762509	3.210427	3.640985	3.557602	3.934417
<b>beta (Zn)</b>	5.997137	5.928657	5.912867	4.219685	25.1606	427.2572	1033.9	1052.951
<b>EC<sub>50</sub> (Ni)</b>	0.161098	0.160003	0.160055	0.151022	0.217056	0.166527	0.163155	0.169173
<b>EC<sub>50</sub> (Zn)</b>	0.250954	0.248979	0.248495	0.255827	0.292978	0.29906	0.299611	0.299618
<b>A</b>	-	0.249443	0.423684	6.676395	-	0.972734	0.596917	-0.00254
<b>b<sub>Ni</sub></b>	-	-	-0.4086	-	-	-	1.119224	-
<b>b<sub>Zn</sub></b>	-	-	-	2.042145	-	-	-	290.0288
<b>SS</b>	8.013297	8.008161	8.007544	7.338066	9.879659	6.790232	ND	ND
<b>R<sup>2</sup></b>	0.830504	0.830613	0.830626	0.844787	0.791027	0.856374	ND	ND
<b>X<sup>2</sup></b>	-	0.005136	0.005753	0.67523	-	3.089428	ND	ND
<b>DF</b>	-	1	2	2	-	1	2	2
<b>p(x<sup>2</sup>)</b>	<b>6.14E-08</b>	0.942868	0.98019	0.71347	<b>1.49E-07</b>	0.078803	ND	ND

ANEXO H - Tabela resumo dos efeitos da mistura binária dos metais níquel e do zinco na letalidade de *M. juniae*, experimento 4.

	Ação Independente (07/05/12)				Concentração de Adição (07/05/12)			
	Referência	S/A	DR	DL	Referência	S/A	DR	DL
<b>Max</b>	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
<b>beta (Ni)</b>	21.106.171	2.729.539	2.852.522	2.969.402	2.761.599.408	2.708.604	2.806.959.895	2.898.329
<b>beta (Zn)</b>	4.083.283	4.610.506	4.417.665	505.186	4.534.559.143	4.626.637	4.696.959.833	4.965.519
<b>EC<sub>50</sub> (Ni)</b>	0.1319876	0.155974	0.156496	0.157277	0.157890002	0.151583	0.154484529	0.154384
<b>EC<sub>50</sub> (Zn)</b>	0.2269961	0.253583	0.249684	0.247329	0.258250542	0.250963	0.243201416	0.250153
<b>A</b>	-	-301.026	-18.885	-407.309	-	0.295928	1.373.550.825	-0.50153
<b>b<sub>Ni</sub></b>	-	-	-252.226	-	-	-	-259.169.504	-
<b>b<sub>Zn</sub></b>	-	-	-	0.834855	-	-	-	1.407.956
<b>SS</b>	9.145.530	8.058.493	8.019.043	7.919.205	7.988.122.145	792.631	7.676.495.129	7.859.421
<b>R<sup>2</sup></b>	0.7867664	0.812111	0.813031	0.815359	0.813752087	0.815193	0.82101786	0.816753
<b>X<sup>2</sup></b>	-	1.087.038	1.126.488	1.226.326	-	0.061812	0.311627016	0.128701
<b>Df</b>	-	1	2	2	-	1	2	2
<b>p(x<sup>2</sup>)</b>	<b>8,41E-04</b>	0.297129	0.569359	0.541635	<b>4,87E-02</b>	0.803655	0.855718761	0.937676

ANEXO I- Resumo das condições para o teste de toxicidade crônica de curta duração com *Mysidopsis bahia*, padronizado pela USEPA.

<b>Tipo de teste</b>	Crônico; Estático; Com Renovação.
<b>Salinidade</b>	20 a 30
<b>Temperatura</b>	26 ± 1 °C
<b>Fotoperíodo</b>	16h luz: 8h escuro
<b>Recipiente para teste</b>	Béqueres 400 ml
<b>Volume da solução teste</b>	150 mL
<b>Idade dos organismos para o teste</b>	7 dias
<b>Nº de organismos por réplica</b>	5
<b>Nº de réplicas por concentração</b>	8
<b>Nº de organismo por concentração</b>	40
<b>Alimentação</b>	Diariamente com náuplios de <i>Artêmia</i> sp. (menores que 24h de vida)
<b>Aeração</b>	Nenhuma
<b>Água de diluição</b>	Água do mar natural
<b>Duração do teste</b>	7 dias
<b>Parâmetros avaliados</b>	Letalidade; Comprimento; Peso Seco
<b>Crítérios de aceitabilidade</b>	80% de sobrevivência no controle