



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
CURSO DE OCEANOGRAFIA

ÉVILA PINHEIRO DAMASCENO

**EFEITO DA MISTURA DOS METAIS ZINCO E NÍQUEL EM DIFERENTES
SALINIDADES SOBRE O MICROCRUSTÁCEO *Artemia* sp.**

FORTALEZA

2013

ÉVILA PINHEIRO DAMASCENO

EFEITO DA MISTURA DOS METAIS ZINCO E NÍQUEL EM DIFERENTES
SALINIDADES SOBRE O MICROCRUSTÁCEO *Artemia* sp.

Monografia apresentada ao Curso de graduação em Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Oceanografia.

Orientadora: Prof. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufó

FORTALEZA

2013

ÉVILA PINHEIRO DAMASCENO

EFEITO DA MISTURA DOS METAIS ZINCO E NÍQUEL EM DIFERENTES
SALINIDADES SOBRE O MICROCRUSTÁCEO *Artemia* sp.

Monografia submetida à Coordenação do
Curso de Oceanografia, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para
obtenção do grau em Oceanografia.

Aprovada em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Sandra Tédde Santaella
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Letícia Veras Costa Lotufo por me abrir as portas do mundo da ciência e pela dedicação durante todo o trabalho.

À Dr^ª. Marcionília pela paciência, parceria e todos os muitos ensinamentos compartilhados.

À Dr^ª Paula Jimenez que tão gentilmente exerceu uma grande ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos componentes da banca, Prof^ª. Dr^ª. Sandra Tedde e Prof^ª. Dr. Rivelino Martins pelo aceite ao convite de colaborarem com o trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, foi muito bom e engrandecedor trabalhar com vocês.

Aos meus amigos do curso de Oceanografia, com destaque, Bárbara Paiva. Felipe Facó, Heitor Gentil, Gaia Tavares e Wersângela Navarro, pela companhia e ajuda sempre quando eu mais precisei.

Ao CNPq pela concessão das bolsas de Iniciação Científica.

À minha família pelo apoio constante.

“Menos é mais” (Provérbio Alemão)

RESUMO

A poluição marinha, agravada com a modernização do estilo de vida do homem, abrange uma série de contaminantes que apesar de quase sempre ter origem terrestre, muitas vezes têm o mar como destino final. Dentre esses poluentes, os metais pesados destacam-se por apresentar alta toxicidade e persistência. Estudos de toxicidade comumente se baseiam na exposição de organismos as substâncias químicas isolados em condições controladas. Nesse sentido, o presente trabalho teve objetivo de avaliar a toxicidade dos metais pesados zinco e níquel isolados e em mistura frente ao microcrustáceo *Artemia* sp. nas salinidades 10, 17 e 35. O resultado da exposição individual dos metais revelou que zinco foi mais tóxico em todas as salinidades, sendo as CL_{50} 0,04, 0,18, 0,38 g/L para o zinco e 0,27, 0,29, 0,71 g/L para o níquel em salinidades 10, 17 e 35, respectivamente. Houve diferença estatística entre as concentrações letais de ambos os metais em todos os níveis salinos, com exceção de zinco em salinidade 10. Os dados da exposição em mistura foram trabalhados no gráfico isoblograma e no método MIXTOX, que utiliza os modelos conceituais concentração de adição (CA) e ação independente (IA). Em salinidade 35, o isoblograma evidenciou efeito aditivo para diversas proporções dos dois metais, enquanto o gráfico indicou antagonismo para todas as combinações, porém com proximidade à aditividade, enquanto os modelos IA e CA apontaram adição em salinidade 17. O método MIXTOX e o isoblograma apontaram o mesmo tipo de resposta da mistura dos metais, o antagonismo, sendo os dados melhores descritos pelo método CA em salinidade 10. Sendo assim, *Artemia* sp. foi muito resistente a zinco e níquel. Pôde-se concluir, portanto, que a mistura dos metais tende a ser antagônica com o decréscimo de salinidade.

Palavras-chave: Mistura de metais. Mudança de salinidade. *Artemia* sp. Ensaio agudo.

ABSTRACT

Marine pollution, caused for the human lifestyle modernization, include a range of contaminants that although almost always have terrestrial origin, often have the sea as their final destination. Among these pollutants, heavy metals are noted for having high toxicity and persistence. Toxicity studies commonly based on the exposure of organisms to stressors isolated under controlled conditions. In this sense, the aim of this work is to evaluate the toxicity of the heavy metals zinc and nickel isolated and combined in the microcrustacean *Artemia* sp. in the salinities 10, 17 and 35. The result of exposure of individual metals revealed that zinc was more toxic than nickel at all salt levels and the LC_{50} were 0,04, 0,18, 0,38 e 0,27, 0,29, 0,71 g/L for zinc and nickel in the salinities 10, 17 and 35, respectively. There was no statistical difference between lethal concentrations of both metals in all the salt levels, with the exception of zinc in salinity 10. The exposure data were worked in the graphic isobologram and in the method MIXTOX that use the conceptual models Concentration Addition and Independent Action (IA). In salinity 35, the isobologram showed antagonism for all the combinations, but with proximity to the effect additive, while the models IA and CA indicated addiction en salinity 17. The method MIXTOX and the isobologram showed the same metals mixture response, the antagonism, the best fit data occurred in the CA model in salinity 10. Thus, *Artemia* sp. was very resistant to the metals zinc and nickel. It was concluded, therefore, that the metal mixture tends to be antagonistic with the decrease of salinity.

Keywords:Metals Mixture. Salinity change. *Artemia* sp. Acute assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Náuplio de <i>Artemia</i> sp.....	18
Figura 2 – Etapas de eclosão de cistos de <i>Artemia</i> sp.....	19
Figura 3 – Esquema com procedimentos executados no ensaio de toxicidade agudo sobre <i>Artemia</i> sp.	20
Figura 4 - Modelos de curva concentração/resposta de misturas binárias.	24
Figura 5 - Isoblograma com as CL ₅₀ de 24 horas de várias combinações de zinco e níquel para <i>Artemia</i> sp. em salinidade 35.....	30
Figura 6 - Isoblograma com as CL ₅₀ de 24 horas de várias combinações de zinco e níquel frente à <i>Artemia</i> sp. em salinidade 17.....	31
Figura 7 - Isoblograma com as CL ₅₀ de 24 hr de várias combinações de zinco e níquel para <i>Artemia</i> sp em salinidade 10..	32
Figura 8 - Análise da resposta da mistura de zinco e níquel sobre a letalidade de <i>Artemia</i> sp. em salinidade 17.	34
Figura 9 - Análise da resposta da mistura de zinco e níquel sobre a letalidade de <i>Artemia</i> sp. em salinidade 10 do desvio antagônico do modelo Concentração de Adição.....	36
Figura 10 - Frequência do número de estudos que constataram negativa, positiva e não correlação da toxicidade de várias classes de contaminantes com a salinidade.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados gerais do teste de toxicidade de <i>Artemia</i> sp.	19
Tabela 2 - Unidades tóxicas usadas para configuração dos experimentos em mistura.	22
Tabela 3 - Interpretação dos parâmetros adicionais (<i>a</i> e <i>b</i>) que definem a forma funcional dos padrões de desvio da Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA).....	25
Tabela 4 - Concentrações letais medianas (CL ₅₀) de 24 horas de zinco e níquel.....	26
Tabela 5 - Contribuições individuais de zinco e níquel em mistura para <i>Artemia</i> sp. em salinidade 35.....	27
Tabela 6 - Contribuições individuais de zinco e níquel em mistura para <i>Artemia</i> sp. em salinidade 17.....	28
Tabela 7 - Contribuições individuais de zinco e níquel em mistura para <i>Artemia</i> sp. em salinidade 10.....	29
Tabela 8 - Resumo da análise do efeito da mistura de zinco e níquel em <i>Artemia</i> sp. em salinidade 17 e 10.	37
Tabela 9 - Valores de CL ₅₀ de zinco em diferentes salinidades para diversas espécies de organismos marinhos e estuarinos.	40
Tabela 10 - Valores de CL ₅₀ de níquel em diferentes salinidades frente a diversas espécies de organismos marinhos e estuarinos.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
	2.1 Objetivo Geral	17
	2.2 Objetivos Específicos	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
	3.1 Bioensaio	18
	3.1.1 <i>Organismo-Teste</i>	18
	3.1.2 <i>Obtenção dos náuplios de Artemia sp.</i>	18
	3.1.3 <i>Exposição</i>	19
	3.1.4 <i>Reagentes e soluções</i>	20
	3.1.5 <i>Preparação das concentrações-teste</i>	20
	3.2 <i>Análise estatística</i>	23
4	RESULTADOS	26
	4.1.1 Toxicidade dos metais isolados	26
	4.2 Toxicidade da mistura de metais	26
	4.2.1 <i>Isoblograma</i>	26
	4.2.2 <i>Método MIXTOX</i>	33
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A partir da revolução industrial, o estilo de vida do homem modernizou-se drasticamente, estimulando o desenvolvimento de indústrias como as de fármacos, petroquímicos e agroquímicos, que propiciaram o lançamento no ambiente de inúmeros compostos químicos de grande potencial impactante (HARRISON, 2001). Essas atividades foram impulsionadas por retornos econômicos satisfatórios e pela duplicação da população mundial nos últimos cinquenta anos (BACCI, 2012).

Esses contaminantes, muitas vezes, têm como destino final o mar. Os oceanos recebem altas cargas de esgoto doméstico, agrotóxicos, efluentes industriais e outros. Seu uso como destino final desses resíduos é justificado por seu imenso volume, o que lhe propicia um poder de diluição universal que evita a produção de danos significativos aos organismos vivos, mas sabe-se que esse argumento é falso. A contra prova disso é o surgimento de zonas mortas, que confirma que a biota marinha está sendo afetada pela poluição de fonte antrópica (SINGH, 2012).

Zonas costeiras são ambientes também bastante afetados pela poluição aquática, por ser destino inevitável de contaminantes transportados por corpos d'água continentais e também dos de fontes marinhas, como resíduos de tanques petroleiros e de barcos, derramamento de óleo e detritos industriais (SHARMA, 2009). Os efeitos nocivos se agravam pela importância das regiões de costa, por abrigar a maioria das grandes cidades do mundo e por conter importantes e sensíveis sistemas, como pântanos, mangues e recifes de coral (UNEP/GPA, 2006).

A problemática da poluição por metais pesados surgiu junto das primeiras grandes questões ambientais e não é um tema recente no mundo científico, tanto que é um assunto bem abordado tanto na área de toxicologia humana, quanto como na ambiental. Porém, ainda há lacunas sobre o comportamento desses estressores no ambiente e seus efeitos biológicos.

Os metais pesados são uma classe de poluentes associados aos mares e zonas costeiras. Estes estão presentes naturalmente no ambiente, mas atividades humanas estão incrementando os fluxos destes compostos em escala local, regional e global (GREEN *et al.*, 2003). São elementos químicos que apesar de essenciais para o funcionamento dos organismos, em altas concentrações são tóxicos (UNEP/GPA, 2006).

Metais traço são definidos como compostos presentes em baixas concentrações no ambiente e nos organismos. Exemplos destes como zinco, níquel, cobalto e cádmio são essenciais para a execução de diversas atividades metabólicas por enzimas em organismos marinhos. Zinco é o metal predominante na enzima anidrase carbônica, catalisador da reação que origina CO_2 a partir de HCO^- , mecanismo importante para obtenção de carbono orgânico pelos seres marinhos. O níquel, por sua vez, é componente da enzima urease, utilizada pelo fitoplâncton na obtenção de nitrogênio (EMERSON; HEDGES, 2008).

Os elementos químicos abordados neste estudo, zinco e níquel, estão presentes na água do mar em escala nanomolar, com concentrações médias de 0,1 a 10 nM e 1,7 a 8,5 nM, respectivamente (BERMIN *et al.*, 2006; CEMPEL; NIKEL, 2005). Porém os níveis de ambos podem expandir-se consideravelmente pela grande influência dos aportes antropogênicos (HOGSTRAND, 2011; PYLE; COUTURE, 2011).

Esses dois metais têm ampla interação nos processos biogeoquímicos, inclusive os ocorridos no mar. Ambos os compostos dissolvidos distribuem-se verticalmente na coluna de água do mar, com níveis mais pobres próximo à superfície e aumento da concentração com a profundidade, resultado da remineralização de matéria orgânica do fundo. Esse padrão é típico de compostos envolvidos em processos biológicos (SINOIR *et al.*, 2012; MOREL; MILLIGAN; SAITO, 2003).

O aporte desses dois metais se dá a partir de diversas fontes antrópicas nos corpos d'água continentais e marinhos. Zinco é um dos metais pesados mais empregados em atividades humanas, principalmente em galvanização de ligas de aço e indústrias de borracha e tintas. Os principais processos emissores deste metal para o ambiente são: mineração, usinas de galvanização e queima de carvão e de lixo (SINGH, 2005). Em áreas oceânicas, a introdução deste metal no ambiente ocorre principalmente em regiões portuárias devido à dissolução de zinco oriundo de tintas anticorrosão e de alguns materiais anti-incrustantes empregados nos cascos dos navios (ALZIEU, 2001).

Muitas das principais fontes de níquel são comuns ao zinco como: mineração e produção de ligas de aço, combustão de óleos pesados, fabricação de baterias e galvanoplastia (CORNELIS *et al.*, 2005). O incremento da concentração deste metal em águas marinhas se dá principalmente por atividades de refino de óleo e pelo intenso trânsito de barcos cargueiros e petroleiros (PARASKEVOPOULOU *et al.*, 2010). A entrada de níquel por fontes naturais

no ambiente, como por atividades vulcânicas e erosão eólica, corresponde de 40% a 50% do importe antropogênico (ALZIEU, 2001).

Metais são necessários aos organismos em pequenas concentrações, mas, em excesso, apresentam mecanismos de toxicidade, causando efeitos desde letalidade até danos manifestados em gerações seguintes ao organismo exposto (TSUI; WANG, 2007). Além disso, metais podem acumular-se nos tecidos dos seres vivos e serem transferidos ao longo da cadeia alimentar (CHERKASHIN; BLINOVA, 2010).

Em relação ao zinco, sua toxicidade é fortemente relacionada com a alteração no balanço iônico. Em crustáceos, o zinco foi registrado como modificante na homeostase em brânquias de lagostas, que refletiu no aumento da atividade de ATPases (CANLI; STAGG, 1996).

Assim como o zinco, níquel é um contaminante do sistema de regulação de íons, Deleebeeck *et al.* (2007) constataram que o metal é tóxico para o cladóceros *Daphnia magna* por prejudicar a absorção de íons de magnésio. Além disso, compostos formados de níquel têm alto potencial carcinogênico em humanos e demais animais, por causar possíveis danos por estresse oxidativo e outros efeitos deletérios (SIGEL; SIGEL; SIGEL, 2009). É importante destacar que dentre os metais do tipo divalente, o níquel é um dos que mais se desconhece o modo de ação e de toxicidade para diversas espécies (VIJAYAVEL *et al.*, 2009).

Em resposta aos efeitos deletérios causados pela exposição aos metais, organismos vivos desenvolveram vários mecanismos de proteção, como alterações na homeostase e síntese de proteínas sequestradoras de metais. Essa medida tem alto custo energético, podendo refletir significativamente na taxa de crescimento e reprodução (DELEEBEECK *et al.*, 2007).

A toxicidade de diversos contaminantes, como metais, muitas vezes, é variável para indivíduos de uma mesma espécie. No meio ambiente, diversas condições abióticas influenciam a magnitude do efeito tóxico dos poluentes como temperatura, pH, salinidade, dureza da água e concentração de oxigênio dissolvido (CHERKASHIN; BLINOVA, 2010; KOZLOVA; WOOD; MCGEER, 2009).

A especiação química afeta significativamente a biodisponibilidade dos contaminantes em relação aos organismos aquáticos. Vários fatores interferem na especiação na especiação dos metais, definida como a distribuição das espécies químicas, que por sua

vez, são as formas específicas dos elementos condicionadas pela composição isotópica, estado de oxidação ou eletrônico e/ou estrutura ou complexo molecular (NORDBERG; DUFFUS; TEMPLETON, 2004). Compostos metálicos podem ocorrer em sua forma livre ou complexados com moléculas orgânicas e íons; esse primeiro estado costuma ser mais biodisponível e, conseqüentemente, mais tóxico (BABICH; STOTZKY, 1983).

A salinidade é um fator importante na determinação da especiação dos elementos metálicos. A forma iônica livre dos metais é mais abundante em águas pouco salinas pela baixa disponibilidade de ânions, possíveis formadores de complexos metálicos (LEONARD *et al.*, 2011). Portanto, teoricamente, a salinidade atua de forma protetora contra a toxicidade dos metais (EISLER, 1998).

Em relação à especiação dos metais deste estudo em água do mar, o zinco é modulado por pH e matéria orgânica dissolvida, enquanto o níquel é afetado também pelo pH e pela concentração de oxigênio dissolvido. A especiação do níquel é dominada por sua forma livre, porém, no caso de zinco, sua condição livre é preponderante apenas entre as espécies inorgânicas (HOGSTRAND, 2011; PYLE; COUTURE, 2011).

A toxicidade de alguns contaminantes também é afetada pela presença de outros contaminantes. Visto que os organismos no ambiente estão expostos invariavelmente a várias misturas ou combinação de estressores (PAVLAKI *et al.*, 2011), a análise desse aspecto torna-se relevante em estudos ecotoxicológicos. Isto é reforçado pelo fato que relatórios de risco costumam se basear apenas na exposição dos contaminantes isoladamente (BARATA *et al.*, 2006).

O efeito das interações das misturas entre dois estressores é classificado como aditivo quando o efeito dos contaminantes unidos é igual à soma dos efeitos destes expostos isolados. Sinergismo é detectado na situação em que a toxicidade final excede a soma dos efeitos dos contaminantes isolados, enquanto o antagonismo é o oposto, observado quando dois ou mais estressores afetam a ação um do outro fazendo com que a toxicidade destas substância unidas seja menor em relação à soma delas isoladamente (RAND; WELLS; MCCARTY, 2003).

Frente às possíveis interações de contaminantes, foram desenvolvidas uma série de abordagens estatísticas que analisam os efeitos das misturas de estressores com o objetivo de prever ou avaliar o comportamento destes contaminantes no ambiente (PAVLAKI *et al.*,

2011). Diversos métodos estatísticos de análise de mistura utilizam diferentes artifícios matemáticos que envolvem, dentre outros, aplicações gráficas e índices algébricos.

Dentre os métodos abordados neste estudo, o isobograma é de mais simples desenvoltura e interpretação. É constituído de uma curva que envolve as toxicidades de diversas proporções da mistura de contaminantes e indica se a toxicidade desta mistura é de caráter aditivo, antagônico, ou sinérgico (KOUTSAFTIS; AOYAMA, 2007).

Outro método estatístico empregado requer mais informações e fornece explicações mais completas sobre o comportamento tóxico de misturas. Nesse caso, dois conceitos de referência são utilizados para prever os efeitos da mistura: concentração de adição (CA) e ação independente (IA). O primeiro conceito (CA) é assumido quando os estressores têm modos de ação similares e, portanto, agem contra o mesmo alvo no organismo, enquanto que o segundo (IA) é escolhido no caso dos contaminantes terem modos de ação distintos (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008; PAVLAKI *et al.*, 2011). Se os modos de ação dos estressores forem desconhecidos, assumem-se ambos os modelos e considera-se o conceito em que houver melhor ajuste dos dados (PAVLAKI *et al.*, 2011).

Misturas binárias, no entanto, podem não se comportar como a previsão de nenhum dos modelos, IA e CA, e, em vista disso, Jonker *et al.* (2005) propuseram padrões de desvios sinérgicos ou antagônicos, os quais representam misturas que tiveram calculadas todas as proporções de concentração com toxicidade maior e menor, respectivamente, em relação aos estressores isolados. Além disso, o desvio dependente das doses isoladamente (*Dose level-dependent deviation*) indica antagonismo em altas concentrações dos estressores e sinergismo em baixas concentrações. O desvio dependente da razão das doses (*Dose ratio-dependent deviation*), que ocorre quando há antagonismo em uma mistura de dois componentes com toxicidade causada principalmente pelo contaminante 1 e sinergismo quando o contaminante 2 é o principal causador da toxicidade. Sendo assim, o modelo denominado MIXTOX determina o efeito da mistura a partir destes padrões, definidos pela quantificação do desvio dos modelos de referência (CA e IA) em relação aos dados obtidos.

Tais métodos estatísticos utilizam dados de toxicidade obtidos em ensaios ecotoxicológicos. Estes permitem a determinação do intervalo de concentração e da duração de exposição requeridos para causar um efeito tóxico a parâmetros, tais como letalidade ou redução do comprimento, a partir de metodologias padronizadas e sob condições controladas.

Estes testes fornecem informações úteis para avaliações de risco e para o estabelecimento do limiar de concentração de estressores no ambiente (RAND; WELLS; MCCARTY, 2003).

Os efeitos adversos causados sobre organismos vivos por substâncias químicas liberadas no ambiente são estudados pela toxicologia ambiental e pela ecotoxicologia. O primeiro termo refere-se à abordagem dos efeitos deletérios de substâncias em seres humanos, enquanto o segundo tem foco na toxicidade de compostos sobre os ecossistemas e seus componentes não-humanos (FERNICOLA; BOHRER-MOREL; BAINY, 2003). Porém, esta última definição foi contestada visto que os humanos não se encontram isolados; estão no topo da cadeia alimentar e, por isso, as substâncias tóxicas incorporadas por outras espécies podem ser assimiladas por seres humanos (CHASIN; PEDROZO, 2003).

Dentre os ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos, um dos táxons mais utilizados são os crustáceos. Os animais de menor porte também são bem visados em estudos desse tipo por oferecerem reduções no custo dos experimentos, rotina simples de teste e métodos de ensaio práticos e seguros (VANHAECKE *et al.*, 1981). Estes fatores, dentre outros, foram relevantes para a escolha do microcrustáceo *Artemia* sp. para a execução dos bioensaios nesse estudo. O gênero tem uso intensivo na Ecotoxicologia há décadas por motivos como sua alimentação por filtração não seletiva, dessa forma, não oculta efeitos tóxicos de possíveis contaminantes não assimilados (SHAOJIE; WENLI, 2012).

O uso do gênero em Ecotoxicologia se apoia no fato de que diversos seguimentos científicos fornecem informações sobre *Artemia* sp. Além disso, do ponto de vista laboratorial, o crustáceo é um dos organismos de melhor adaptação a cultivos e ensaios toxicológicos (NUNES *et al.*; 2006) e representa redução de escala de teste, em relação a espaço dos bioensaios e volume de resíduos contaminados (BAISE, 1998).

Há diversos estudos que abordam o efeito letal de metais pesados frente ao gênero *Artemia* sp. A busca na literatura aponta valores de concentração letal mediana (CL₅₀) de zinco e níquel frente a náuplios do gênero obtidos por MacRae e Pandey (1991) e Gajbhiye e Hirota (1990). A toxicidade aguda de metais em diferentes salinidades em microcrustáceos marinhos foi abordada, e ainda consta trabalhos que abordam isto aliado à mistura de metais, como em Verslycle *et al.* (2003). Entretanto, não há estudos em relação à *Artemia* sp. que foquem na exposição dos organismos à mistura de zinco e níquel, assim como mistura de metais aliada à mudança de salinidade.

Este estudo avaliou a toxicidade dos metais zinco e níquel isolados e em mistura para *Artemia* sp. Para tanto, foram utilizados os métodos estatísticos que se baseiam no gráfico isobograma e no modelo MIXTOX. A toxicidade de zinco e níquel, tanto isolados quanto em mistura, também foi analisado em diferentes salinidades.

Este trabalho apresenta uma nova abordagem de análise de mistura de contaminantes para um problema antigo, poluição por metais. Além disso, este estudo também aborda condições normalmente não discutidas pelos demais estudos ecotoxicológicos como contaminantes em mistura e mudança de salinidade, visto que regulamentações ambientais, muitas vezes, se baseiam na exposição dos estressores isolados sob condições abióticas controladas (BARATA *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade dos metais zinco e níquel isolados ou em mistura sobre o microcrustáceo *Artemia* sp. e verificar o efeito da salinidade na toxicidade destes metais.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a toxicidade de zinco e níquel isolados para *Artemia* sp.
- Investigar o efeito tóxico da mistura de zinco e níquel em *Artemia* sp.
- Pesquisar o efeito da salinidade na toxicidade dos metais zinco e níquel isolados e em mistura para *Artemia* sp.
- Comparar os métodos de análise de mistura isobograma e MIXTOX.

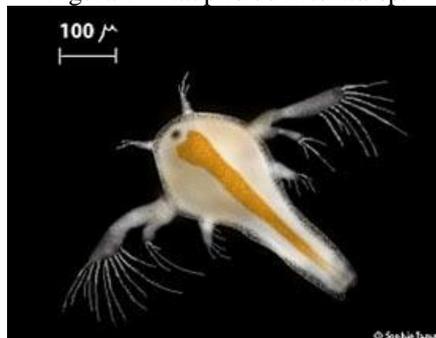
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bioensaio

3.1.1 Organismo-Teste

O microcrustáceo *Artemia* sp. Leach, 1919 pertence ao filo Arthropoda, classe Branchiopoda, ordem Anostraca, família Artemidae e gênero *Artemia* (Figura 1) (ASEM; RASTEGAR-POUYANI; DE LOS RÍOS-ESCALANTE, 2010). O táxon é cosmopolita, com ampla dispersão na costa brasileira, inclusive no Ceará, atribuída ao seu intenso uso na aquicultura (CAMARA, 2012). Habita ambientes de condições adversas como lagoas salinas, por resistir a um largo intervalo de temperatura e salinidade e por ter ciclo de vida curto e alta fecundidade (NUNES *et al.*, 2006).

Figura 1 - Náuplio de *Artemia* sp.

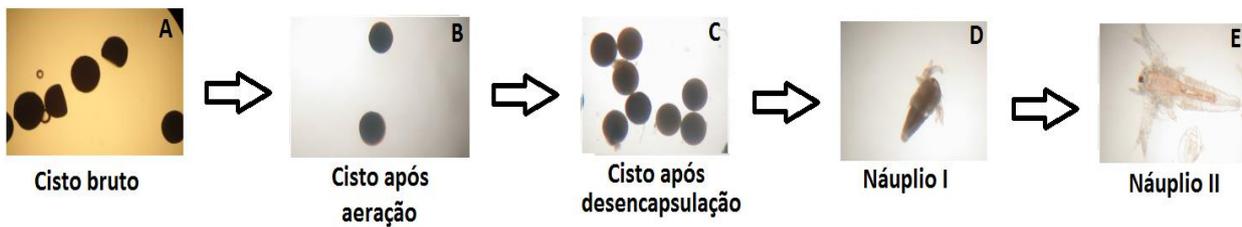


Fonte: Brine Shrimp Direct.

3.1.2 Obtenção dos náuplios de *Artemia* sp.

No Laboratório de Ecotoxicologia Marinha – Labomar (UFC), cistos comerciais foram submetidos a procedimentos para a obtenção de náuplios na fase II de *Artemia* sp. O primeiro processo, hidratação, consistiu na exposição dos cistos à água destilada em aeração por uma hr. A água destilada foi retirada e 150 mL de uma solução de hipoclorito de sódio foram adicionados, que, além de proporcionar a desencapsulação dos cistos, esta solução também tem função bactericida. Na solução de hipoclorito de sódio, os cistos são também submetidos à vigorosa agitação para acelerar o processo de desencapsulação. Este procedimento foi interrompido a partir da mudança de cor dos cistos, de marrom para laranja, e o hipoclorito de sódio foi totalmente retirado por lavagem com água destilada. Em um funil de separação, para que seja retirada os resíduos de cistos flutuantes, com água do mar filtrada e em aeração constante, os cistos eclodiram e atingiram a fase náuplio II após 48 hr (Figura 2).

Figura 2 - Fotos feitas em microscópio com 100 vezes de aumento. (A) Cistos sem passar por qualquer tipo de tratamento, (B) Cistos hidratados após uma hora de aeração, (C) Cistos após desencapsulação, (D) Náuplio de *Artemia* na fase I, após 24 horas da eclosão, (E) Náuplio de *Artemia* na fase II, após 48 horas da eclosão.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.3 Exposição

Os experimentos foram realizados em placas estéreis de 24 cavidades. Em cada cavidade foram incluídos 10 náuplios de *Artemia* sp., o respectivo tratamento e água do mar, completando, assim, o volume final de 2,5 mL. Cada tratamento foi realizado em três réplicas (Tabela 1).

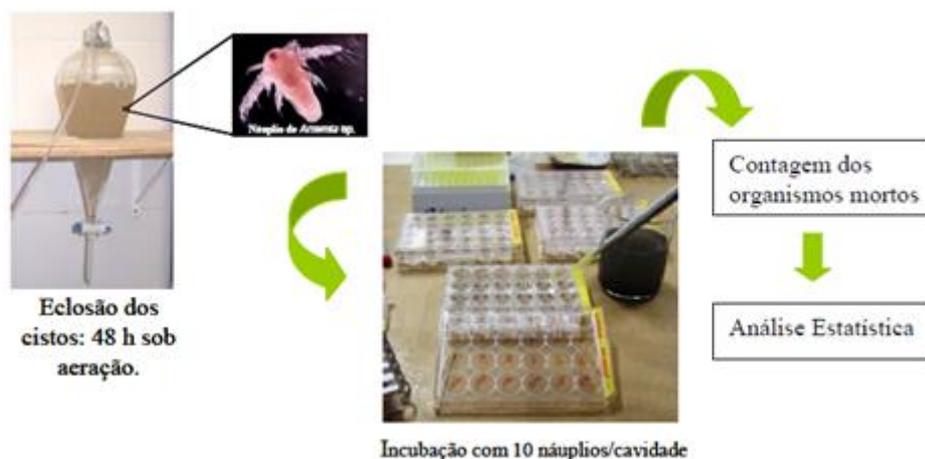
Tabela 1 – Dados gerais do teste de toxicidade de *Artemia* sp.

Tipo de teste	Estático sem renovação de água
Recipiente de teste	Placa estéril de 24 cavidades
Volume final	2,5 mL
Água de diluição	Água do mar filtrada (0,8 µm)
Idade dos organismos	48 hrs
Náuplios/Cavidade	10
Temperatura	25°C
Fotoperíodo	12 hr luz : 12 hr escuro
Duração	48 hr
Efeito observado	Mortalidade
CL ₅₀	Concentração Letal a 50% dos organismos expostos
Aceitabilidade	Porcentagem de mortos no controle menor que 10%

Fonte: Elaborado pela autora.

As placas montadas foram mantidas a de 25°C e no fotoperíodo de 12 hr escuro, 12 hr claro. Após 24 hr, foi realizada contagem em lupa (20x) de organismos vivos e mortos; os náuplios foram considerados sem vida depois de observada imobilidade por 10 s (Figura 3).

Figura 3 – Esquema com procedimentos executados no ensaio de toxicidade agudo frente à *Artemia* sp.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.4 Reagentes e soluções

Zinco e níquel foram obtidos através das substâncias sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (CAS 7446-20-0) e cloreto de níquel (II) hexa-hidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (CAS 7791-20-0) da marca comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

3.1.5 Preparação das concentrações-teste

As soluções contendo zinco e níquel foram preparadas a partir da diluição em água destilada de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A montagem do ensaio seguiu dois esquemas diferentes para atender cada análise estatística.

Para os ensaios de exposição a um metal, os intervalos de concentração de níquel foram de 0,050 a 1,2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ independente da salinidade, enquanto que para o zinco, as concentrações testadas foram de 0,05 a 0,15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ em salinidade 10, 0,025 a 0,250 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ em salinidade 17, e 0,2 a 0,600 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ em salinidade 35. As médias de concentrações letais médias (CL_{50}) obtidas de cinco testes de cada metal foram usadas como múltiplos dos ensaios de mistura.

Em função da montagem do gráfico isoblograma, as concentrações dos ensaios seguiram o plano: os valores de CL_{50} de 24 hr individuais foram multiplicados em uma série crescente para definir as concentrações utilizadas nos experimentos de mistura de metais. Sendo assim, as combinações entre zinco e níquel seguiram sete proporções de concentrações (4:1, 3:2, 2:1, 1:1, 1:2, 2:3, 1:4), representando zinco e níquel, respectivamente, sendo cada número múltiplo da CL_{50} média de cada metal individual.

Outro esquema de concentrações foi elaborado para os ensaios que forneceram dados para a execução do modelo MIXTOX. Os náuplios foram expostos aos metais isolados e em mistura em paralelo. Para a determinação das concentrações usadas na mistura, foi usado o conceito de unidade tóxica (UT) (Equação 1).

$$C = UT \times CL_{50} \quad (1)$$

Onde:

C = Concentração de metal;

UT = Unidade tóxica;

CL_{50} = Concentração letal mediana de 24 hr do contaminante isolado.

Para obter maior gama de resposta dos contaminantes, foram elaboradas 23 combinações de concentrações de zinco e níquel (Tabela 2).

Tabela 2 - Unidades tóxicas usadas para configuração dos experimentos em mistura.

Σ UTs	UTs (Zn)	UTs (Ni)
1,75	0,75	1
1,75	0,5	1,25
1,5	0,5	1
1,5	1	0,5
2	1	1
1	0,75	0,25
1	0,5	0,5
1	0,375	0,675
1	0,25	0,75
1	0,5	0,5
1	0,125	0,875
1	0,875	0,125
1	0,625	0,375
1,5	0,75	0,75
0,75	0,5	0,25
0,75	0,25	0,5
0,75	0,125	0,625
0,75	0,625	0,125
0,5	0,375	0,125
0,5	0,25	0,25
0,5	0,125	0,375
0,375	0,25	0,125
0,375	0,125	0,25

3.2 Análise estatística

A concentração letal média para os animais expostos (CL_{50}) foi determinada pelo método Trimmed Spearman Karber, descrito por Hamilton e colaboradores (1977), bem como o seu intervalo de confiança de 95% (IC). O valor de CL_{50} obtido por este método também foi usado nos procedimentos estatísticos de análises de misturas descritos a seguir.

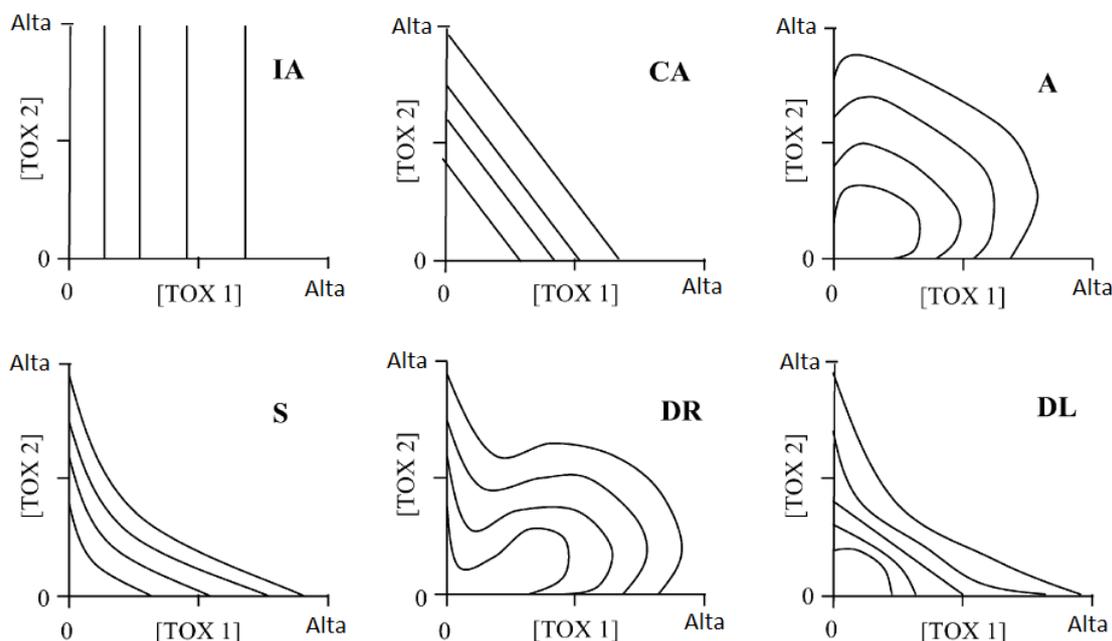
Um desses é o isoblograma, uma representação gráfica que possui uma curva que revela o efeito da mistura como: antagônico, aditivo ou sinérgico (CHOU; TALALAY, 1983). As CL_{50} individuais representam os eixos x e y que, quando plotados nas respectivas linhas de cada eixo, conectam-se formando a linha da aditividade (LANGE; THOMULKA, 1997). Os resultados da interação dos componentes foram obtidos usando intervalos de confiança (IC) de 95% dos metais individuais, ligando os pontos dos eixos que representam o maior e menor valor de IC de cada metal. Deste modo, estabelece-se uma região de entre linhas na qual os pontos que representam as CL_{50} das combinações das misturas, indicam o efeito aditivo. Sendo assim, os pontos mais próximos da linha da aditividade podem ser considerados mais aditivos, enquanto os mais distantes, menos. Os pontos situados abaixo e acima do intervalo de aditividade são considerados sinérgicos e antagônicos, respectivamente (LANGE; THOMULKA, 1997). Os gráficos foram confeccionados pelo programa Sigma Plot 10.0.

Outro método de análise estatística, denominado MIXTOX, utiliza os modelos teóricos concentração de adição (CA) e ação independente (IA). Estes dois modelos estabelecem uma previsão de toxicidade para a mistura baseando-se no modo de ação dos estressores e em seus efeitos tóxicos individuais. Como o modo de ação da toxicidade do níquel é desconhecida, aplicam-se os dois modelos e é assumido o de melhor ajuste.

Os estressores podem sofrer desvios em relação a IA e CA e comportarem-se de acordo com os padrões sinergismo/antagonismo, desvio dependente das doses isoladamente e desvio dependente da razão das doses (Figura 4).

Os cálculos do método MIXTOX foram realizadas a partir do programa Microsoft Office Excel 2010 com auxílio da ferramenta Solver. Os arquivos das planilhas foram elaborados por CLAUSS (2005).

Figura 4 - Modelos de curva concentração/resposta de misturas binárias representando os modelos ação independente (IA), concentração de adição (CA) e seus desvios, sinergismo (S), antagonismo (A), desvio dependente da razão das doses (DR) e desvio dependente das doses isoladamente (DL).



Fonte: Ferreira; Loureiro; Soares, (2008).

Os desvios sinergismo, antagonismo, desvio dependente das doses e desvio dependente das doses isoladamente dos modelos de referência foram obtidos a partir da adição dos parâmetros a e b . Para o modelo sinergismo/antagonismo, a determina antagonismo se positivo e sinergismo se for negativo. A inclusão de b_{DR} unido a a produzem o desvio dependente da razão das doses, tendo em vista que b_{DR} permite que os desvios dos modelos de referência dependam da composição da mistura. Em outras palavras, em uma mistura binária, sinergismo é observado quando a toxicidade dos contaminantes é atribuída principalmente por um dos componentes, e há antagonismo no caso de o outro componente ser o principal causador de toxicidade. No caso do desvio dependente das doses isoladamente, a indica se há desvio em doses baixas e altas e b_{DL} aponta em qual nível de dose o desvio sofre mudanças (PAVLAKI *et al.*, 2011). Esses conceitos se encontram organizados na tabela 3.

O melhor ajuste de dados foi obtido com comparação das probabilidades de verossimilhança entre IA e CA. Depois disto, os valores dos parâmetros a , b , b_{DR} e b_{DL} indicam os parâmetros de efeito dos componentes da mistura.

Tabela 3 - Interpretação dos parâmetros adicionais (a e b) que definem a forma funcional dos padrões de desvio da Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA).

Padrão de desvio	Parâmetro a (CA e IA)	Parâmetro b (CA)	Parâmetro b (IA)
Sinergismo/ Antagonismo(S/A)	>0 antagonismo <0 sinergismo		
Desvio Dependente da Razão das Doses (DR)	>0 antagonismo exceto para as razões da mistura em que b for negativo e indicar sinergismo <0 sinergismo exceto para as razões da mistura em que b for positivo e indicar antagonismo	>0 antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo componente 1 <0 sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo componente 1	
Desvio Dependente das Doses Isoladamente (DL)	>0 antagonismo em baixa dose e sinergismo em alta dose <0 sinergismo em alta dose e antagonismo em baixa dose	$b_{DL} > 1$ desvio no menor nível de CL_{50} $b_{DL} = 1$ desvio no nível de CL_{50} $0 < b_{DL} < 1$ mudança do nível de CL_{50} $b_{DL} < 1$ sem desvio, porém a magnitude de S/A é dependente da dose	$b_{DL} > 2$ desvios no menor nível de CL_{50} $b_{DL} = 2$ desvios em níveis semelhantes a CL_{50} $1 < b_{DL} < 2$ desvios no nível de CL_{50} $b_{DL} < 1$ sem desvio, porém S/A é dependente do nível da dose

Fonte: Jonker, *et al.* (2005).

4 RESULTADOS

4.1.1 Toxicidade dos metais isolados

Os testes foram executados para cada metal nas diferentes salinidades, 10, 17 e 35, para obter as concentrações letais médias de cada série de experimentos. Em todas elas, zinco foi mais tóxico para *Artemia* sp. que níquel.

As médias dos valores de CL_{50} de 24 horas, assim como o intervalo de confiança e número de ensaios realizados encontram-se na tabela 4:

Tabela 4 - Concentrações letais medianas (CL_{50}) de 24 horas (média \pm desvio padrão) e número de experimentos (n) de zinco e níquel frente à *Artemia* sp. a indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os dois metais na mesma salinidade segundo t-student, e b aponta diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com ANOVA seguido de Tukey.

	CL_{50} Zn ($g L^{-1}$)	n	CL_{50} Ni ($g L^{-1}$)	n
Salinidade 10	$0,04 \pm 0,01^{a,b}$	7	$0,27 \pm 0,04^b$	4
Salinidade 17	$0,18 \pm 0,02^{a,b}$	5	$0,29 \pm 0,03^b$	4
Salinidade 35	$0,41 \pm 0,05^{a,b}$	5	$0,71 \pm 0,09^{a,b}$	6

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados de toxicidade entre os níveis salinos dos dois metais mostraram que maiores efeitos tóxicos ocorreram nas menores salinidades. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey revelou diferença significativa entre as CL_{50} de ambos os metais e entre todos os níveis salinos, exceto entre as salinidades 10 e 17 para o níquel.

4.2 Toxicidade da mistura de metais

4.2.1 Isoblograma

Para elaboração do gráfico isoblograma, foram obtidas sete CL_{50} médias para cada proporção representando zinco e níquel, respectivamente, para cada salinidade (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 5 - Contribuições individuais de zinco e níquel em mistura para *Artemia* sp. em salinidade 35. Intervalo de confiança de 95% entre parênteses.

Zn:Ni	CL₅₀ Zn (g L⁻¹)	CL₅₀ Ni (g L⁻¹)	∑CL₅₀ (g L⁻¹)
1:4	0,05 (0,03-0,06)	0,35 (0,24-0,44)	0,40(0,27-0,5)
2:3	0,12(0,09-0,14)	0,34(0,25-0,38)	0,46(0,34-0,52)
1:2	0,08(0,07-0,10)	0,30(0,30-0,34)	0,38(0,37-0,44)
1:1	0,22(0,19-0,25)	0,37(0,34-0,40)	0,59(0,55-0,65)
2:1	0,29(0,26-0,33)	0,25(0,23-0,29)	0,54(0,49-0,62)
3:2	0,33(0,28-0,38)	0,34(0,29-0,40)	0,77(0,57-0,78)
4:1	0,32(0,23-0,44)	0,14(0,10-0,19)	0,46(0,33-0,63)

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 - Contribuições individuais de zinco e níquel em mistura para *Artemia* sp. em salinidade 17. Intervalo de confiança de 95% entre parênteses.

Zn:Ni	CL₅₀ Zinco (g L⁻¹)	CL₅₀ Níquel (g L⁻¹)	ΣCL₅₀ (g L⁻¹)
1:4	0,10(0,07-0,13)	0,56(0,46-0,74)	0,66(0,53-0,87)
2:3	0,11(0,09-0,12)	0,29(0,26-0,32)	0,40(0,35-0,44)
1:2	0,12(0,07-0,16)	0,34(0,24-0,53)	0,46(0,33-0,69)
1:1	0,13(0,11-0,16)	0,21(0,18-0,26)	0,34(0,29-0,42)
2:1	0,19(0,16-0,22)	0,13(0,13-0,18)	0,32(0,29-0,40)
3:2	0,18(0,15-0,22)	0,19(0,16-0,22)	0,37(0,31-0,44)
4:1	0,17(0,14-0,19)	0,07(0,06-0,12)	0,24(0,20-0,31)

Fonte: Elaborado pela autora.

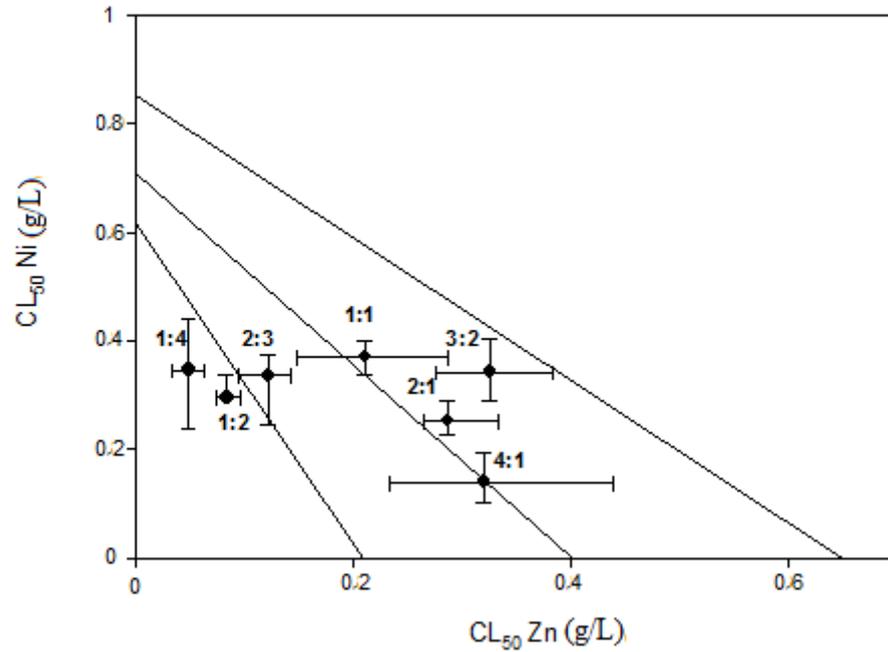
Tabela 7 - Contribuições individuais de zinco e níquel em mistura para *Artemia* sp. em salinidade 10. Intervalo de confiança de 95% entre parênteses.

Zn:Ni	CL₅₀ Zinco (g L⁻¹)	CL₅₀ Níquel (g.L⁻¹)	∑CL₅₀ (g L⁻¹)
1:4	0,02(0,02-0,02)	0,48(0,40-0,57)	0,50(0,42-0,59)
2:3	0,03(0,03-0,04)	0,33(0,28-0,37)	0,36(0,31-0,41)
1:2	0,03(0,03-0,04)	0,40(0,34-0,50)	0,43(0,37-0,54)
1:1	0,05(0,04-0,05)	0,28(0,25-0,30)	0,33(0,29-0,35)
2:1	0,08(0,06-0,1)	0,24(0,19-0,31)	0,32(0,25-0,41)
3:2	0,05(0,04-0,05)	0,20(0,17-0,30)	0,25(0,21-0,35)
4:1	0,05(0,04-0,07)	0,08(0,06-0,10)	0,13(0,1-0,17)

Fonte: Elaborado pela autora.

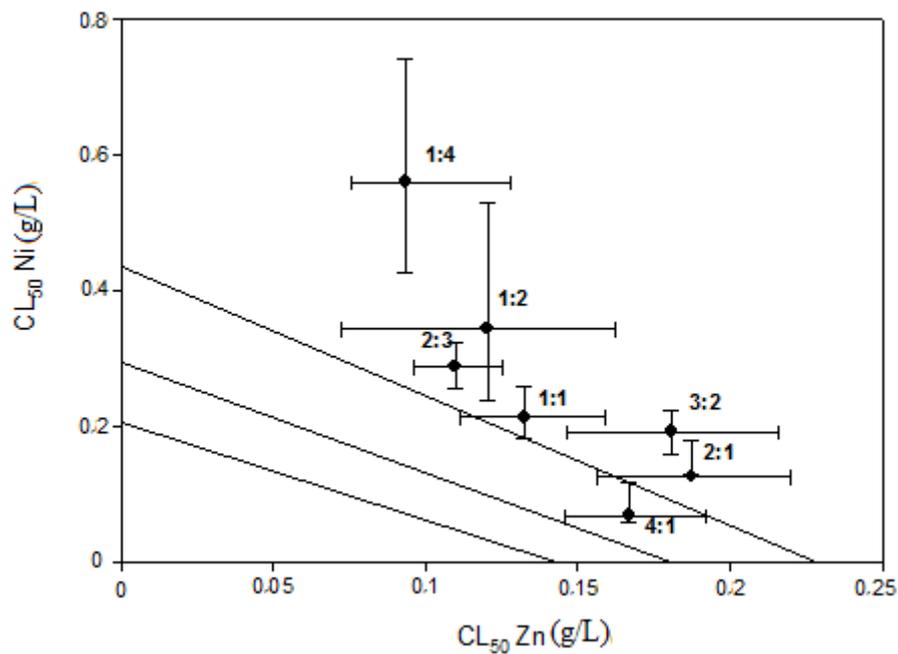
Em salinidade 35, a maioria das proporções de metais ficaram na área do gráfico correspondente à adição, sendo que a combinação 4:1 (Zn:Ni) estabeleceu-se exatamente sob a linha da aditividade. As proporções 1:4 e 1:2, representando zinco e níquel, respectivamente, mostraram-se sinérgicas (Figura 5).

Figura 5 - Isobograma com as CL_{50} de 24 horas de várias combinações de zinco e níquel para *Artemia* sp. em salinidade 35. Barras representam intervalo de confiança de 95%.



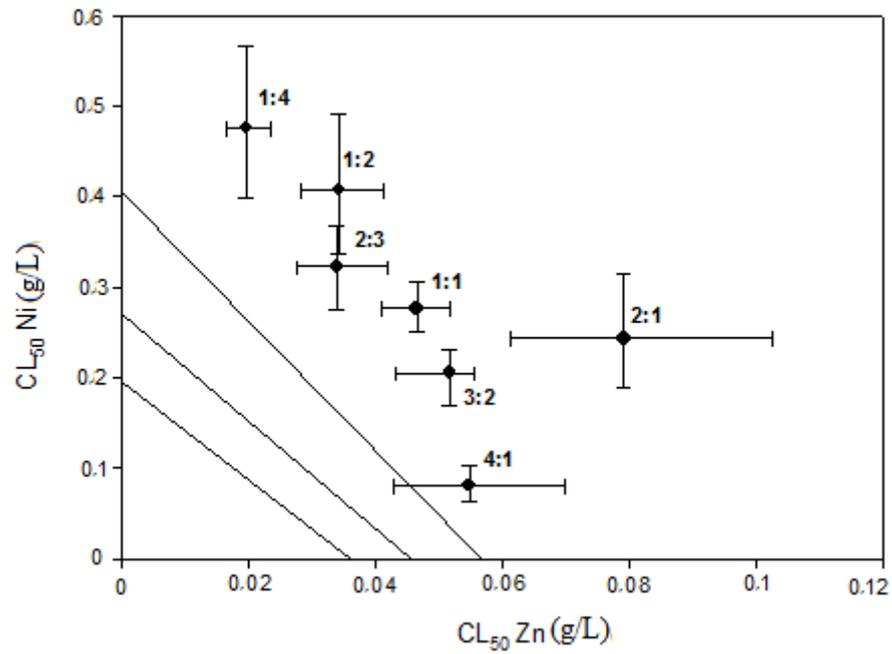
As misturas de zinco e níquel não se comportaram da mesma forma em salinidade 17. Apenas a proporção 4:1 foi aditiva, enquanto as demais indicam antagonismo. O ponto referente à combinação 1:4 destaca-se dos outros e aponta forte efeito antagonístico. As proporções 4:1 e 1:2 indicam adição e os pontos relacionados à 1:1 e 2:1 encontram-se muito próximos à linha da aditividade (Figura 6).

Figura 6 - Isoblograma com as CL_{50} de 24 horas de várias combinações de zinco e níquel frente à *Artemia* sp. em salinidade 17. Barras representam intervalo de confiança de 95%.



Os experimentos em salinidade 10 mostram a tendência do aumento do comportamento antagônico de metais com a redução de salinidade. Apenas a proporção 4:1 apontou leve efeito aditivo, através de seu intervalo de confiança, os demais pontos representantes das outras proporções indicaram antagonismo significativo (Figura 7).

Figura 7 - Isoblograma com as CL50 de 24 hr de várias combinações de zinco e níquel para *Artemia* sp em salinidade 10. Barras representam intervalo de confiança de 95%.



4.2.2 Método MIXTOX

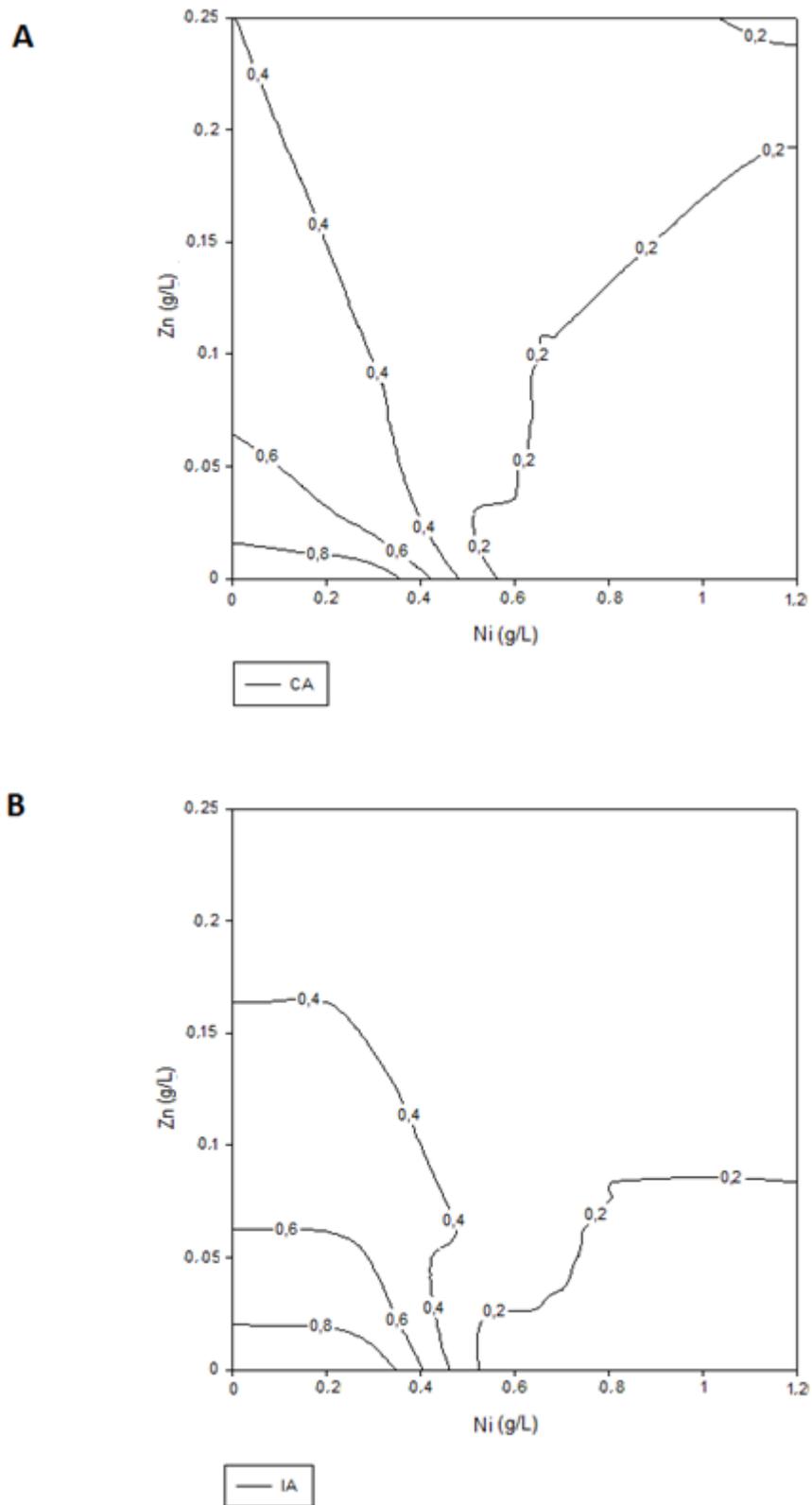
Os experimentos em mistura foram realizados nas salinidades 10, 17 e 35, porém o teste dos metais isolados em paralelo no maior nível salino não forneceu as CL_{50} pelo fato de as concentrações individuais não terem causado toxicidade suficiente nos náuplios de *Artemia* sp. para o cálculo do parâmetro. Sendo assim, a mistura de zinco e níquel foi realizada apenas em salinidade 17 e 10.

Em função do desconhecimento dos modos de ação dos metais, os dados foram aplicados nos modelos de referência CA e IA. Foi considerado aquele modelo que teve melhor previsão do efeito da mistura e o desvio destes modelos de referência foi determinado.

Analisando os efeitos de zinco e níquel sobre a letalidade de *Artemia* sp. em salinidade 17, o modelo de IA forneceu resíduo (SS) de 8,97 com $p < 0,05$, com 76,9% dos dados explicados. A adição dos parâmetros a , b_{Ni} e b_{Zn} não revelou nenhuma diferença significativa ($p(X^2) < 0,05$). Em outras palavras, não ocorreu nenhum desvio em relação ao modelo conceitual IA (Figura 8 B).

Aplicando os resultados no modelo CA, foi gerado resíduo de valor 10,67 com explicação de 72,54% dos dados e $p(X^2) < 0,05$. Assim como em IA, o emprego dos parâmetros não evidenciou desvios em relação ao modelo de referência. Sendo assim, ambos os modelos, CA e IA, explicaram os dados, portanto, nesse caso, não é possível afirmar se há diferença entre o modo de ação dos dois metais em *Artemia* sp. Não se evidencia nenhum tipo de interação entre os dois contaminantes em mistura em salinidade 17, ou seja, seus efeitos, quando combinados, correspondem à soma de suas respostas isoladas (Figura 8 A).

Figura 8 - Análise da resposta da mistura de zinco e níquel sobre a letalidade de *Artemia* sp. em salinidade 17. (A) Concentração de Adição, (B) Ação Independente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados dos experimentos em salinidade 10 foram aplicados no modelo de referência IA produzindo SS com valor de 14,98 com $p < 0,05$ e 74,63% dos dados foram explicados. Seguindo a análise no desvio sinergismo/antagonismo, SS sofreu uma redução discreta para 14,36, porém de forma significativa ($p(X^2)=0,42$) e 75,69% dos dados foram explicados. A análise do desvio dependente da razão das doses ocorreu com a adição dos parâmetros a e b_{Ni} , e o valor de SS caiu para 11,54, porém a mudança não foi significativa ($p(X^2)=0,17$), tendo 80,46% dos dados explicados. Com a adição dos parâmetros a e b_{Zn} , também não foi observada mudança significativa dos resíduos no desvio dependente das doses isoladamente ($p(X^2)=0,6$), que atingiu 13,96 e 76,36% dos dados foram explicados.

Estes resultados não foram observados no modelo concentração de adição. Um ajuste significativo ($p < 0,05$) foi observado: o valor de SS foi de 19,73, com 66,58% dos dados explicados. Os resíduos sofreram uma queda significante, para 12,23, $p(X^2)$ demonstrou isto com seu valor abaixo de 0,05 (0,006) e 79,29% dos dados foram explicados. A análise segundo o desvio dependente da razão das doses com os parâmetros a e b_{Ni} indicou uma diminuição de SS para 10,90, porém não significativa ($p(X^2)=0,25$) e 81,54% dos dados foram explicados. A adição dos parâmetros a e b_{Zn} no desvio dependente das doses isoladamente gerou o aumento de SS para 12,20, mas continuou a não haver mudança significativa ($p(X^2)=0,85$) e 79,35% dos dados foram explicados (Figura 9). O valor do parâmetro a de 5,54 indica que a mistura é antagonica de acordo com a Tabela 3.

Figura 9 - Análise da resposta da mistura de zinco e níquel sobre a letalidade de *Artemia* sp. em salinidade 10 do desvio antagônico do modelo Concentração de Adição.

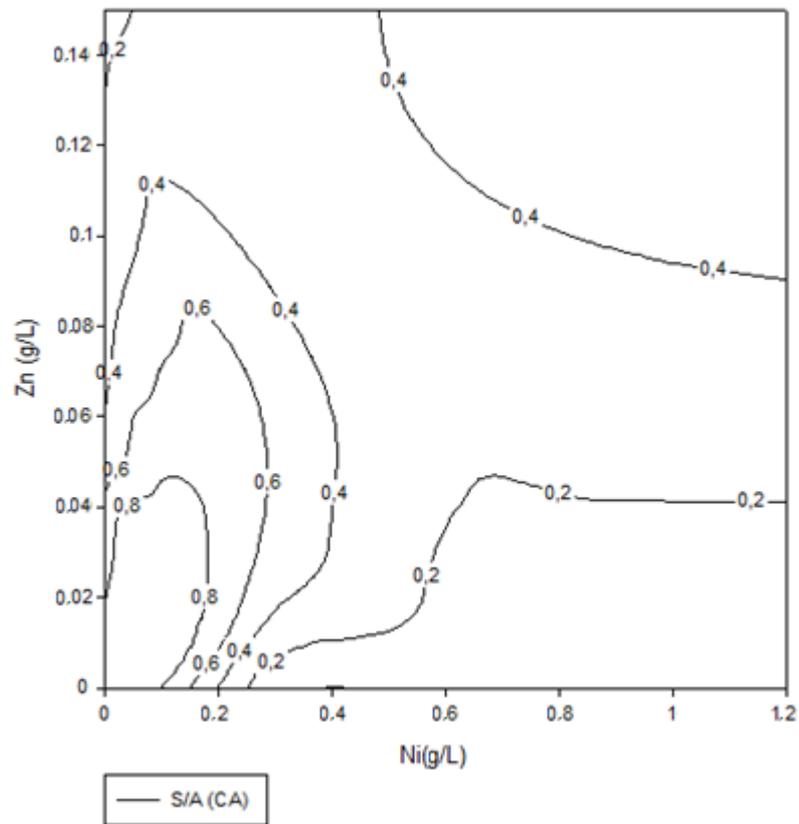


Tabela 8 - Resumo da análise do efeito da mistura de zinco e níquel em *Artemia* sp. em salinidade 17 e 10, A e B, respectivamente. Max é a resposta do controle, beta é a inclinação da curva dose/resposta individual, CL₅₀ é a concentração letal mediana, a, b_{Zn} e b_{Ni} são os parâmetros da função, SS é a Soma dos Quadrados dos Resíduos, X² é o teste estatístico, df são os graus de liberdade, p(X²) indica o resultado do teste de probabilidade, R² é a probabilidade máxima. S/A é sinergismo/antagonismo, DR é desvio dependente da razão das doses e DL é desvio dependente das doses isoladamente.

A

	Ação Independente				Concentração de Adição			
	Referência	S/A	DR	DL	Referência	S/A	DR	DL
Max	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
beta (Ni)	0,86	0,67	0,74	0,76	0,60	0,68	0,75	0,94
beta (Zn)	6,85	6,29	6,36	6,35	6,58	6,54	6,53	6,57
CL ₅₀ (Ni)	101,24	64,7	57,84	63,21	128,25	65,6	59,05	73,74
CL ₅₀ (Zn)	431,18	433,18	433,57	433,57	452,84	441,11	438,34	439,57
a	-	2,94	-1,65	0,43	-	7,52	-2,66	-0,03
b _{Ni}	-	-	7,19	-	-	-	14,81	-
b _{Zn}	-	-	-	-12,04	-	-	-	100,89
SS	8,97	7,25	7,01	7,21	10,67	7,29	7,03	7,83
R ²	0,77	0,81	0,82	0,81	0,72	0,81	0,82	0,80
X ²	-	1,72	1,96	1,75	-	3,37	3,63	2,84
df	-	1	2	2	-	1	2	2
p(x ²)	5,18x10⁻⁶	0,19	0,38	0,42	1,15x10⁻⁵	0,07	0,16	0,24

Fonte: Elaborado pela autora.

B

	Ação Independente				Concentração de Adição			
	Referência	S/A	DR	DL	Referência	S/A	DR	DL
Max	0,92	0,91	0,98	0,92	0,92	0,98	0,98	0,98
beta (Ni)	2,25	1,91	1,82	2,09	1,78	1,48	1,75	1,43
beta (Zn)	11,55	9,08	3,08	11,56	10,48	3,58	3,79	3,56
CL₅₀ (Ni)	69,66	63,64	56,60	66,18	95,47	50,37	56,88	49,07
CL₅₀ (Zn)	260,26	238,62	142,89	233,61	278,71	148,66	134,53	149,48
a	-	3,53	13,65	-0,07	-	5,54	9,51	-0,02
b_{Ni}	-	-	-20,67	-	-	-	-12,78	-
b_{Zn}	-	-	-	96,52	-	-	-	0,093
SS	14,98	14,36	11,54	13,96	19,73	12,23	10,90	13,52
R²	0,75	0,76	0,80	0,76	0,67	0,79	0,81	0,77
X²	-	0,62	3,45	1,02	-	7,50	1,33	0,03
df	-	1	2	2	-	1	1	1
p(x²)	6,19x10 ⁻⁹	0,43	0,18	0,60	5,97x10 ⁻⁸	6,16x10⁻³	0,25	0,85

Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, os ensaios de toxicidade aguda foram realizados com o organismo-teste *Artemia* sp. Este gênero é um dos mais valiosos para o uso em estudos toxicológicos e ecotoxicológicos. Ensaios baseados na obtenção de *Artemia* sp. através de cistos são baratos, disponíveis, simples e confiáveis. Além disso, a tolerância do táxon permite seu uso em variadas condições de teste, como estudos hipersalinos, marinhos e estuarinos (NUNES *et al.*, 2006).

Quanto à toxicidade individual de cada um dos metais aqui estudados, Zn foi mais tóxico frente ao Ni, ao passo que a CL₅₀ do primeiro corresponde a quase metade da CL₅₀ do segundo, quando da salinidade de 35‰. No caso da salinidade de 10 ‰, Zn foi cinco vezes mais tóxico com relação ao Ni. A maior toxicidade do Zn em relação ao Ni também foi observada em grande parte dos estudos que abordam o efeito tóxico agudo em microcrustáceos, inclusive no gênero *Artemia* (MACRAE; PANDEY, 1991). Verslycke *et al.* (2003) constataram a mesma relação também em diferentes níveis salinos, quando o Zn foi mais tóxico que níquel nas salinidades 5 e 25 sobre o misidáceo *Neomysis integer*.

Há escassos registros da toxicidade de zinco e níquel em diferentes salinidades em 24 hrs. Os únicos dados encontrados de CL₅₀ dos metais neste mesmo tempo de exposição, por Bryant *et al.* (1985), tiveram amplitude similar aos experimentos em 96 horas dos demais estudos encontrados. Em estudos com microcrustáceos marinhos, os valores de CL₅₀ dos metais tiveram valor cerca de três ordens de magnitudes menores em relação a este estudo, evidenciando a elevada tolerância de *Artemia* sp. Ao zinco e níquel (Tabela 9).

Nas tabelas 9 e 10 estão representados dados de toxicidade obtidos em experimentos de zinco e níquel em diferentes salinidades para diferentes espécies marinhas.

Tabela 9 - Valores de CL₅₀ de zinco em diferentes salinidades para diversas espécies de organismos marinhos e estuarinos.

Grupo Taxonômico	Espécie	Tempo de Exposição	Salinidade	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Referência
Bivalve	<i>Macoma balthica</i>	24h	15	0,7	Bryant <i>et al.</i> (1985)
			25	>2,0	
			35	1,4	
Crustáceo	<i>Artemia sp.</i>	24 h	10	45,4	Este trabalho
			17	179,83	
			35	405,5	
Crustáceo	<i>Corophium volutator</i>	24 h	5	0,044	Bryant <i>et al.</i> (1985)
			10	0,09	
			15	0,09	
			25	0,065	
			35	>0,13	
Crustáceo	<i>Neomysis integer</i>	96h	5	0,54	Versycle <i>et al.</i> (2003)
			25	1,04	
Anelídeo	<i>Nereis diversicolor</i>	96h	5	6	Fernandez e Jones (1990)
			10	16	
			17,5	42	
			30	35	
Peixe	<i>Morone saxalitis</i>	96h	0	0,12	Palawski, Hunn e Dwyer (1985)
			1	0,43	

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10 - Valores de CL₅₀ de níquel em diferentes salinidades frente a diversas espécies de organismos marinhos e estuarinos.

Grupo Taxonômico	Espécie	Tempo de Exposição	Salinidade	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Referência
Bivalve	<i>Macoma balthica</i>	24h	15	0,54	Bryant <i>et al.</i> (1985)
			25	0,95	
			35	>1,2	
Crustáceo	<i>Artemia sp.</i>	24 h	10	709,83	Este trabalho
			17	292,9	
			35	269,3	
Crustáceo	<i>Corophium volutator</i>	24 h	5	>0,128	Bryant <i>et al.</i> (1985)
			10	>0,128	
			15	>0,128	
			25	>0,128	
			35	>0,128	
Crustáceo	<i>Litopenaeus vannamei</i>	96h	5	0,042	Leonard <i>et al.</i> (2011)
			25	0,385	
			5	0,290	
Crustáceo	<i>Excirrolana armata</i>	96h	25	>2,0	Versycle <i>et al.</i> (2003)
			5	0,76	
Crustáceo	<i>Neomysis integer</i>	96h	25	1,04	Versycle <i>et al.</i> (2003)
			5	0,76	
Peixe	<i>Morone saxalitis</i>	96h	0	3,9	Palawski <i>et al.</i> (1985)
			1	21	

Fonte: Elaborado pela autora.

A alta resistência aos metais por organismos do gênero *Artemia* pode ser atribuída, dentre outros fatores, à sua alta produção de metalotioneínas, que são proteínas citoplasmáticas de alta afinidade a diversos metais tóxicos. A síntese de metalotioneínas está relacionada com assimilação, estoque, transporte e eliminação de elementos metálicos nocivos (ASADPOUR; MANAVI; BANIAMAN, 2013).

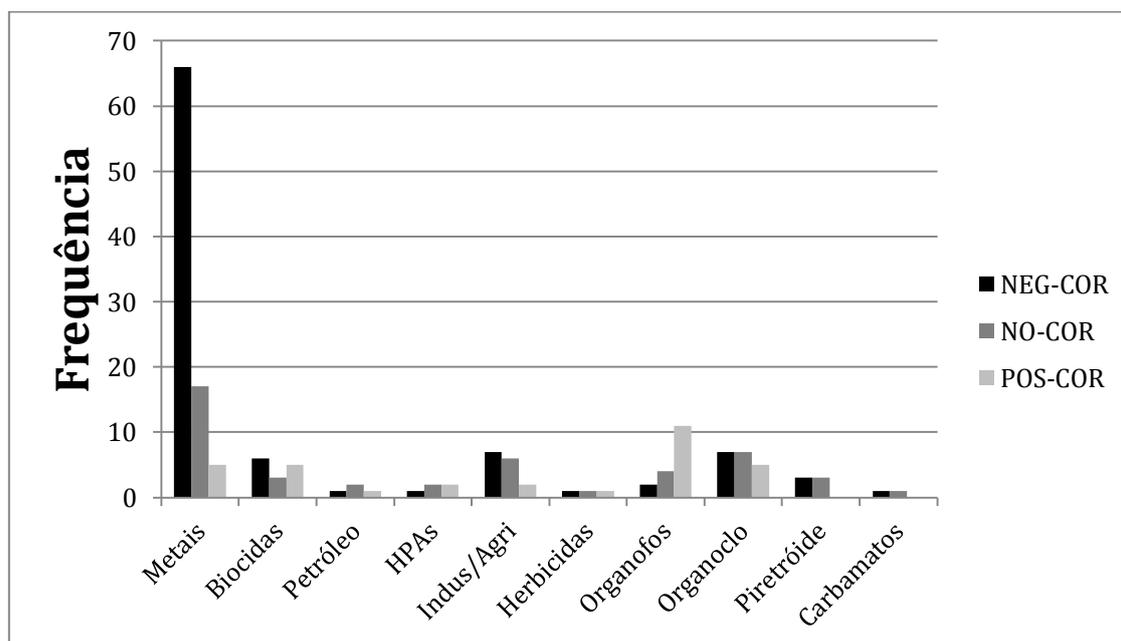
Nunes *et al.* (2006) ao compararem a sensibilidade da *Artemia* com espécies de variados grupos taxonômicos, concluíram que o crustáceo era o de mais baixa sensibilidade.

Os autores afirmaram que a alta tolerância natural do gênero pode ser considerada uma vantagem frente aos outros organismos, já que esses são menos adaptados às várias condições abióticas. Além disso, apontaram *Artemia* como organismo-teste essencial no futuro da ecotoxicologia devido à alta adaptabilidade a diversas condições ambientais.

Examinando a toxicidade de cada metal em diferentes salinidades, observou-se que a concentração de sal exerce influência significativa no efeito tóxico dos estressores, com exceção de zinco em salinidade 10. Este resultado é bastante frequente em trabalhos ecotoxicológicos, inclusive com relação a zinco e níquel em vários níveis tróficos (HALL; ANDERSON, 1995).

A correlação negativa entre a salinidade e a toxicidade do metal é comumente observada em diversos outros trabalhos (HALL; ANDERSON, 1995). Entretanto, ainda que não seja a regra geral, a não-correlação entre a toxicidade do estressor e a concentração de sal, como visto neste estudo para a toxicidade de Ni na salinidade de 10, é mais comum em metais em relação a outras classes de contaminantes (Figura 10) devido à sua complexação, principalmente cloreto. Versycle *et al.* (2003) e Leonard *et al.* (2011) constataram esta relação ao concluírem que concentrações de metais livres, maiores em baixos níveis salinos, é proporcional à toxicidade aguda em crustáceos. Isso ocorre porque em maiores salinidades, os cátions metálicos em sua forma livre formam complexos com vários outros íons, com destaque para cloreto, ânion majoritário da água do mar, assumindo assim uma forma menos tóxica (WRIGHT, 1995)

Figura 10 - Frequência do número de estudos que constataram negativa, positiva e não correlação (NEG-CORR, POS-CORR e NO-CORR, respectivamente) da toxicidade de várias classes de contaminantes com a salinidade.



Fonte: Hall e Anderson (1995).

O fato de a toxicidade do níquel não ter sido afetada significativamente pela salinidade no mais baixo nível salino (10) pode ser relacionado com a não complexação do metal com íons cloreto, mesmo em água do mar (KUSHNER, 1993). Entretanto essa afirmação não corroborou com outros autores, como Donat (1994) que inferiu que níquel na forma livre estabelece complexos com íons como o próprio cloreto e sulfato.

Além do fator químico, no caso, a complexação iônica, questões biológicas (fisiológicas) podem ser atribuídas à interferência da salinidade na toxicidade de metais. Em baixas salinidades, os processos de homeostase são intensificados pela alta atividade do transporte ativo de íons, aumentando a sensibilidade, em termos de toxicidade aguda, a metais (LEONARD *et al.*, 2011). Porém, organismos eurihalinos, como *Artemia*, são mais resistentes a condições tóxicas devido à atenuação do estresse osmótico, que ocorre devido ao menor fluxo de água absorvida e, conseqüentemente, de íons metálicos (HALL; ANDERSON, 1995). Blust e colaboradores (1992) confirmaram que a acumulação de cádmio por *Artemia franciscana* é regida pela disponibilidade de íons livres do metal, com apenas uma pequena influência de osmolaridade.

Com relação aos metais Zn e Ni em mistura, em salinidade 35, o gráfico isoblograma apontou adição para maioria das combinações da mistura, porém duas proporções, 1:4 e 1:2, dominadas por níquel, foram consideradas sinérgicas. Koutsaftis e Aoyama (2007), também usando o isoblograma constataram padrões de resposta diferentes

dentre misturas de anti-incrustantes, as combinações binárias de piritionato de zinco, piritionato de cobre, clorotalonil e diuron revelaram efeitos antagônicos, com exceção da mistura entre os dois primeiros compostos, que foi classificada como sinérgica.

O método MIXTOX indicou toxicidade aditiva entre os metais em salinidade 17, enquanto os resultados indicaram antagonismo com ajuste à Concentração de Adição no nível salino 10. O uso do modelo CA para prever o efeito de misturas de contaminantes com modos de ação similares é bem estabelecido na Ecotoxicologia (ALTENBURGER *et al.*, 2000). Algumas informações sobre a atividade tóxica destes metais para crustáceos marinhos estão disponíveis, mas não permitem afirmar com segurança se zinco e níquel têm modos de ação semelhantes.

A resposta aditiva é comum entre os ensaios agudos de metais nesse mesmo nível salino. Figueirêdo (2013) observou a não interação entre zinco e níquel a partir dos modelos CA e IA na letalidade do microcrustáceo *Mysidopsis juniae*. Mais além, com o modelo MIXTOX, outros estudos obtiveram diferentes respostas das misturas a partir de ensaios agudos. Loureiro *et al.* (2010) observaram sinergismo na exposição da mistura de níquel e do inseticida clorpirifós frente ao microcrustáceo *Daphnia magna*, enquanto Ferreira e colaboradores (2008) constataram o desvio dependente da razão das doses para a mistura de cádmio e do fungicida carbendazim, também utilizando *D. magna*. A resposta antagônica observada em salinidade 10 pode ser relacionada com a semelhança de zinco e níquel em relação às suas propriedades físicas e químicas, com toxicidade associada a sítios de ligação de processos celulares específicos (GEORGE, 1990).

Apesar da impossibilidade da análise da mistura dos metais em salinidade 35 pelo modelo MIXTOX, os experimentos nos demais níveis salinos, 17 e 10, permitiram confrontar os resultados deste método e do isoblograma. Pode-se afirmar que houve similitude entre os efeitos da mistura revelados pelas duas análises. Algumas combinações, como 2:1 e 1:1, mostraram-se aditivas ou próximas disso no isoblograma em salinidade 17, enquanto o modelo MIXTOX revelou a não interação entre os dois estressores no mesmo nível salino. Em salinidade 10, foi observado antagonismo significativo para maioria das proporções de mistura analisadas pelo isoblograma, enquanto que a modalidade CA do modelo MIXTOX também apontou ação antagônica entre zinco e níquel.

Os métodos isoblograma e MIXTOX analisaram com êxito a toxicidade da mistura de zinco e níquel e a interferência da salinidade do meio sobre o caráter deste efeito. Porém o conhecimento mais detalhado dos modos de ação dos metais tornaria a abordagem do último método de análise mais precisa e explicativa. Visto que os náuplios de *Artemia*

mostraram-se úteis na realização de experimentos com variação significativa de salinidade (10 - 35), podemos propor o uso gênero para futuros estudos de diversos ambientes aquáticos

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pôde-se concluir que os náuplios de *Artemia* sp. apresentaram alta resistência de zinco e níquel, quando comparados com outras espécies de crustáceos marinhos. A salinidade exerceu forte influência na toxicidade individual dos metais, sendo o efeito tóxico do níquel mais afetado, possivelmente pela complexação dos metais em presença de sal. A interação dos metais na mistura também foram influenciado pela concentração de sais, quanto menor o nível salino, maior é o efeito antagônico.

Os modelos usados neste estudo, o gráfico isobograma e o modelo MIXTOX, foram boas ferramentas na análise do efeito da mistura de zinco e níquel frente à *Artemia* sp., além disso, seus resultados correlacionaram-se ao longo da salinidade.

REFERÊNCIAS

- ALSIEU, C. **Dredging and marine environment**. Lorient, França: Ed. Ifremer: 2001. 128 p.
- ASADPOUR, Y. A.; MANAVI, P. N.; BANIAMAN, M. 2013. Evaluating the Bioaccumulation of Nickel and Vanadium and their effects on the Growth of *Artemia urmiana* and *A. franciscana*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. v. 12, n. 1, p.183-192. 2013.
- ASEM, A.; RASTEGAR-POUYANI, N.; DE LOS RÍOS-ESCALANTE.; P. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 38, p. 501-506, 2010.
- BABICH, H.; STOTZKY, G. Developing Standards for Environmental Toxicants: The Need to Consider Abiotic Environmental Factors and Microbe-Mediated Ecologic Processes. **Environmental Health Perspectives**, Estados Unidos v. 49, p. 247-260, mar. 1983.
- BACCI, MASSIMO LIVI. **A Concise History of World Population**. 5 ed. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. 271 p.
- BAISE, C. Microbiotesting: An Expanding Field in Aquatic Toxicology. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 40, p. 115-119, mai. 1998.
- BARATA, C.; BAIRD, J.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A.M.V.M.; RIVA, M.C. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**. v. 78, n. 1, p. 1-14, jun. 2006.
- BERMIN, J.; VANCE, D.; ANCHER, C.; STATHAM, P. J. The determination of the isotopic composition of Cu and Zn in seawater. **Chemical Geology**, v. 266, n. 3-4, fev. 2006.
- BLUST, R.; KOCKELBERGH, E.; BAILLIEUL, M. Effect of salinity on the uptake of cadmium by the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Marine Ecology Process Series**, v. 30, n. 4, p. 343-356, 1992.
- BRINE SHRIMP DIRECT. Disponível em <<http://www.brineshrimpdirect.com/teachers-highschoolxprmt-c177.html>> Acesso em: 30 jul. 2013.
- CAMARA, M. Review of the biogeography of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Brazil. **International of Artemia Biology**, v. 2, n. 1, p. 3-8, 2012.
- CANLI, M.; STAGG, R. M. Effects of *In Vivo* Exposure to Cadmium, Copper and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster, *Nephrops norvegicus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, p. 494-501, mar. 1996.
- CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 15, n. 3, p. 375-382, 2006.

- CHERKASHIN, S. A.; BLINOVA, N. K. Effect of Heavy Metals on Survival of Crustaceans (a Review). **Hydrobiological Journal**, Redding, Estados Unidos, v. 46, n. 6, p. 76-87, 2010.
- CHASIN, A. A. M.; PEDROZO, M. F. M. O Estudo da Toxicologia. *In*: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 320 p. 2003.
- CHOU, T. C.; TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, p. 450-454, 1983.
- CLAUSS, S. **Mixture Toxicity Analysis Tools: The MixTox Model**. Centre for Ecology & Hidrology. Disponível em: <<http://www.ceh.ac.uk/products/stats/mixturetoxicity-analysisistools.html>>. Acesso em: 25 outubro 2013.
- CORNELIS, R.; CARUSO, J.; CREWS, H.; HEUMANN, K. **Handbook of Elemental Speciation II: species in the environment, food, medicine & occupation health**. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd. 2005. 775 p.
- DELEEBEECK, N. M. E.; MUYSSSEN, B. T. A.; DE LAENDER, F.; JANSSEN, C. R.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C. Comparison of nickel toxicity to cladocerans in soft versus hard surface waters. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 2, p. 223-235, ago. 2007.
- DONAT, J. R. Speciation of dissolved copper and nickel in South San Francisco Bay: a multi-method approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 288, n. 3, p. 547-571, jan. 1994.
- EISLER, R. Nickel Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. **Contaminant Hazard Reviews**. United States Geological Survey, Biological Resources Division, Washington, D.C., Biological Science Report USGS/BRD/BSR, 1998. 76 p.
- EMERSON, S. R.; HEDGES, J. I. **Chemical Oceanography and the Marine Carbon Cycle**. Nova Iorque, Estados Unidos: Cambridge University Press. 2008. 445 p.
- FERNICOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. *In*: AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. 320 p.
- 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, ago. 2008.
- FIGUEIRÊDO, L. P. **Uso de *Mysidopsis Juniae* na análise da toxicidade dos metais zinco e níquel**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- GAJBHIYE, S. N.; HIROTA, R. Toxicity of Heavy Metals to brine shrimp Artemia. **Journal of the Indian Fisheries Association**, Kerala, Índia, v. 20, p. 43-50, 1990.
- GREEN, N.; BJERKENG, B.; HYLLAND, K.; RUUS, A.; RYGG B.. Norwegian Institute for Water Research. **Hazardous substances in the European marine environment: Trends in**

metals and persistent organic pollutants. Copenhagen, Dinamarca: European Environmental Agency. 2003. 71 p.

HALL, L. W.; ANDERSON, R. D. The Influence of Salinity on the Toxicity of Various Classes of Chemicals to Aquatic Biota. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 281-346, 1995.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. **Environmental Science & Technology**. Washington, Estados Unidos, v. 11, n. 7, p. 714-718, jul. 1977.

HARRISON, R. M. **Pollution: Causes, Effects and Control**. 4 ed. Cambridge, Reino Unido: The Royal Society of Chemistry, 2001. 563 p.

HOGSTRAND, C. Zinc. In: WOOD, C. M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**, Academic Press, v. 31, parte A, 135-200 p., 2011.

JONKER, M. J.; SVENDSEN, C.; BEDAUX, J. J. M.; BONGERS, M.; KAMMENGA, J. E. Significance Testing of Synergistic/Antagonistic, Dose Level-Dependent, or Dose Ratio-Dependent Effects in Mixture Dose-Response Analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry. Wiley Online Library**. v. 24, n. 10, p. 2701-2713, out. 2005.

KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**, v. 387, p. 166-174, set. 2007.

KOZLOVA, T.; WOOD, C. M.; MCGEER, J. C. The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the cladoceran *Daphnia pulex* and the development of a biotic ligand model. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 221-228, fev. 2009.

KUSHNER, D. J. Effects of speciation of toxic metals on their biological activity. **Water Pollution Research Journal of Canada**, v. 28, n. 1, p. 111-128, 1993.

LANGE, J. H.; THOMULKA, K. W. Use of the *Vibrio harveyi* Toxicity Test for Evaluating Mixture Interactions of Nitrobenzene and Dinitrobenzene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, n. 1, p. 2-12, out. 1997.

LEONARD, E. M.; BARCAROLLI, I.; SILVA, K. R.; WASIELESKY, W.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A. The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirrolana armata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 409-419, nov. 2011.

LOUREIRO, S.; SVENDSEN, C.; FERREIRA, A. L. G.; PINHEIRO, C. Toxicity of three Binary Mixtures to *Daphnia magna*: Comparing Chemical Models of Action and Deviations from Conceptual Models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Setac Press. v. 29, n. 8, p. 1716-1726, 2010.

MACRAE, T. H.; PANDEY, A. S. Effects of Metals on Early Life Stages of the Brine Shrimp, *Artemia*: A Developmental Toxicity Assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 20, p.247-252, 1991.

MOREL, F. M. M.; MILLIGAN, A. J.; SAITO, M. A. Marine Bioinorganic Chemistry: The Role of Trace Metals in the Oceanic Cycles of Major Nutrients. *In*: ELDERFIELD, H.; HOLLAND, H. D.; TUREKIAN, K. K. (Eds.). **Treatise on Geochemistry: The oceans and marine geochemistry**. Elsevier, 2003. 113- 143 p.

NORDBERG, M.; DUFFUS, J. H.; TEMPLETON, D. M. Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendations 2003). **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 1033-1082, 2004.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**. v. 144, n. 2, p. 453-462, nov. 2006.

PALAWSKI, D.; HUNN, J.B.; DWYER, F.J. Sensitivity of young striped bass to organic and inorganic contaminants in fresh and saline waters. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 114, n. 5, p. 748-753, 1985.

PARASKEVOPOULOU, V.; TRIANTAFYLLAKI, S.; GIANNIKOPOULOS, N.; DASSENAKIS, M. Dissolved and particulate nickel distribution in a coastal marine area affected by geochemical and industrial process. **Fresenius Environmental Bulletin**. Freising, Alemanha, v. 19, n. 9, p. 1833-1840, set. 2010.

PAVLAKI, M. D.; PEREIRA, R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; RIVA, M. C. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Elsevier, v. 74, n. 1, p. 99-110, jan. 2011.

PYLE, G.; COUTURE, P. Nickel. *In*: WOOD, C. M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Fish Physiology: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**, Academic Press, v. 31, parte A, 253-289 p., 2011.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Introduction to Aquatic Toxicology. *In*: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. Londres e Nova Iorque: Taylor & Francis, 2 ed. 3-66 p. 2003.

SHARMA, P. **Coastal Zone Management**. 1 ed. Nova Delhi, India: Globas India Publications. 2009. 315 p.

SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. **Metallothioneins and Related Chelators**. Metal Ions in Life Sciences. Cambridge, Reino Unido: The Royal Society of Chemistry, 2009. 514 p.

SINGH, V. P. **Toxic Metals and Environmental Issues**. Nova Delhi, Índia: Sarup & Sons. 2005. 362 p.

SINGH, R. I. B. Marine Pollution: Its Causes, Consequences and Cure. **Social Science Research Network**. mar. 2012.

SINOIR, M.; BUTLER, E. C.; BOWIE, A. R.; MONGIN, M.; NESTERENKO, P. N.; HASSLER, C. S. Zinc marine biogeochemistry in seawater: a review. **Marine and Freshwater Research**. v. 63, p. 644-657, jul. 2012.

SHAOJIE, D.; WENLI, Z. Response of growth and development of *Artemia* saline to four kinds of heavy metals stress. **Procedia Environmental Science**. ELSEVIER. v. 12, parte B, p. 1164-1171, 2012.

TSUI, M. T.; WANG, W. Biokinetics and Tolerance Development of Toxic Metals in *Daphnia magna*. Setac Press, v. 26, n. 5, p. 1023 – 1032, nov. 2007.

UNEP/GPA. The State of The Marine Environments: Trends and processes. The Hague, Holanda: UNEP/GPA, 2006.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia* Nauplii. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 5, n. 3, p. 382-387, set. 1981.

VERSLYCKE, T.; VANGHELUWE, M.; HEIJERICK, D.; DE SHAMPHELAERE, VAN SPRANG, P.; JANSSEN, C. R. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. **Aquatic Toxicology**. v. 54, n. 3, p. 307-315, ago. 2003.

VIJAYAVEL, K.; GOPALAKRSHINAN, S.; THIAGARAJAN, R.; THILAGAM, H. Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 1, jan. 2009.

WRIGHT, D. A. Trace Metal and Major Ion Interactions in Aquatic Animals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 8-18, 1995.