

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

MARINA CUNHA PASSARELLI

AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ANFÍPODES EPIBENTÔNICOS PARA
APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE TOXICIDADE

SANTOS/SP
2013

MARINA CUNHA PASSARELLI

**AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ANFÍPODES EPIBENTÔNICOS PARA
APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE TOXICIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade
Santa Cecília como parte dos requisitos
para obtenção de título de mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob
Orientação: Prof. Augusto Cesar
Co-orientação: Prof. Denis M. S. Abessa.

SANTOS/SP

2013

“Dedico este trabalho aos meus pais, pois desde o início eles não mediram esforços para me ajudar a alcançar essa grande conquista em minha vida”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por tudo que escolheu para fazer parte da minha história. Obrigada Senhor por me dar a chance de realizar este trabalho e ter me amparado nos momentos difíceis, não me deixando desistir!

Aos meus pais e irmão por todo o apoio e compreensão, sempre se mostrando interessados e prontos a ajudar no que fosse necessário. Obrigada Mãe por me fazer companhia nas coletas, me ajudar com os afazeres de casa nos momentos de correria e por todo carinho e dedicação atribuídos para que eu conseguisse realizar o tão sonhado mestrado. Obrigada Pai pela preocupação em colaborar para que tudo desse certo, pelo interesse, incentivo e conselhos, sempre em pró ao meu crescimento pessoal.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Augusto Cesar, não tenho palavras para agradecer todo o ensinamento passado, paciência e tempo gastos, puxões de orelha, e principalmente por confirmar e acreditar em mim. O Sr me ensinou não só como desenvolver um trabalho científico, como também me mostrou que o melhor caminho para o sucesso é trabalhar com humildade e amor no que faz. Obrigada por ser esse paizão!

Ao Prof. Dr. Denis Abessa por sua imprescindível co-orientação, sempre disposto e empolgado em colaborar para a melhoria do trabalho. Com certeza todas as sugestões e conselhos foram fundamentais na conquista da bolsa FAPESP, e também no término dessa dissertação. Agradeço também por deixar sempre de portas abertas a estrutura do laboratório da Unesp para o que fosse necessário.

À Unisanta, por disponibilizar a infraestrutura dos laboratórios, em especial o de Ecotoxicologia, onde praticamente morei esses dois últimos anos da minha vida e realizei toda a parte experimental do trabalho.

À toda a equipe do Laboratório, em especial ao Tio Aldo, Binho Fernando e Rodrigo, pelo apoio, conselhos, sugestões, ajuda nas coletas e até mesmo companhia nos longos dias de testes. Aos estagiários Salgadinho, Bruna e Pedro, que passaram pelo laboratório durante o período de realização dessa dissertação e eu tive o prazer em co-orientar em seus trabalhos de conclusão de curso. Enfim, à toda a família Ecotox o meu muito obrigada!

À FAPESP pela concessão da bolsa e reserva técnica (processo 2011/15924-8), e ao CNPQ pela bolsa de produtividade concedida aos orientadores desse trabalho, Prof. Dr. Augusto Cesar e Prof. Dr. Denis Abessa.

A todos os meus amigos (a) que me acompanharam e apoiaram nessa fase da minha vida, por toda a força e energias positivas enviadas, principalmente aqueles que colocaram a mão na massa e me ajudaram nas coletas, triagens etc.

Não estaria sendo justa se não separasse um agradecimento especial para a minha grande amiga Tete, obrigada por sempre me apoiar e ajudar em tudo, e principalmente pela paciência nos vários dias de estresse ao longo desses 2 anos, muito obrigada.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A avaliação da qualidade dos sedimentos é de grande importância para a gestão ambiental, pois, além deste compartimento servir como substrato para diversos organismos, também tem a capacidade de acumular xenobióticos em níveis superiores aos encontrados na coluna d'água. Anfípodes constituem um dos grupos taxonômicos mais sensíveis e por isso são considerados excelentes organismos-teste para avaliar a toxicidade de sedimentos. Contudo, entre as espécies de anfípodes marinhos padronizadas e utilizadas no Brasil, somente *Tiburonella viscana* e *Grandidierella bonnieroides* são nativas de ecossistemas brasileiros. Neste sentido, o presente estudo avaliou a viabilidade de aplicação dos anfípodes epibentônico *Hyale nigra* e *Hyale youngi* com o objetivo de validar essas espécies como organismos-teste em ensaios de toxicidade. Primeiramente, foram avaliados os limites de tolerância das espécies (*H. nigra* e *H. youngi*) aos fatores abióticos naturais (salinidade, temperatura, pH e granulometria), a fim de determinar as condições ótimas de sobrevivência e assim, facilitar a interpretação de suas respostas biológicas. Para avaliar a sensibilidade destes organismos foram realizados experimentos com substâncias tóxicas de referência: cloreto de cádmio (CdCl_2), dodecil sulfato de sódio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$), cloreto de amônia (NH_4Cl), dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e sulfato de zinco (ZnSO_4). Para validar a aplicação dos organismos-teste, foram realizados ensaios com amostras ambientais provenientes de quatro pontos de amostragem localizados no estuário e baía de Santos, cuja contaminação e toxicidade são historicamente citados na literatura. Os resultados dos ensaios prévios realizados com os diferentes parâmetros ambientais demonstraram valores ótimos de sobrevivência para *H. nigra* e *H. youngi* correspondentes aos encontrados em regiões tropicais, variando entre salinidades 30 – 40, 20°C - 25°C de temperatura e 7,5 - 8,5, de pH. Com os resultados obtidos, observou-se que a espécie *H. nigra* apresenta para as diferentes substâncias de referência testadas uma sensibilidade ligeiramente superior quando comparada com a *H. youngi*, exceto para o cloreto de cádmio. Ambas as espécies estudadas apresentaram tolerância às diversas substâncias testadas correspondentes aos encontrados na literatura para outras espécies de anfípodes marinho. Os resultados obtidos para *H. nigra* nos ensaios com sedimento integral e elutriato demonstrou diferença significativa do controle (P4) no P2 e P3, sendo similar aos resultados encontrados na literatura para essa área de estudo. A partir deste estudo foi possível avaliar que os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* demonstraram potencial para serem empregados como organismos-teste em ensaios de toxicidade, uma vez que se observou boa sensibilidade e resultados similares às reportados na literatura com outras espécies de anfípodes já utilizadas em estudos ecotoxicológicos.

Palavras - chave: Anfípodes; *Hyale nigra*; *Hyale youngi*; Ensaios de toxicidade; Sedimento.

ABSTRACT

The sediment quality assessment is very important to the environmental management because this compartment constitutes substrate for many aquatic organisms and accumulates xenobiotics in concentrations above those found in the water column. Amphipods are among the most sensitive taxonomic groups and are therefore considered excellent test organisms to evaluate the toxicity of sediments. However, among the only species of marine amphipods *Tiburonela viscana* and *Grandidierella bonnieroides* are native the Brazilian ecosystems. . In the sense, the present study evaluated the feasibility of applying of epibenthic amphipod *Hyale youngi* and *Hyale nigra* in order to validate this species as test organisms in toxicity tests. First, we assessed tolerance of the species (*H. youngi* and *H. nigra*) to natural abiotic factors (salinity, temperature, pH and particle size) in order to determine the great conditions for survival and thus facilitate interpretation of their biological responses. The sensitivity of these organisms were performed experiments with reference toxic substances: as cadmium chloride (CdCl_2), sodium dodecyl sulfate ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$), ammonium chloride (NH_4Cl), potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) and zinc sulfate (ZnSO_4). For validation the application of the test-organisms, tests were performed with environment tests samples from four sampling sites located in the estuary and bay of Santos, whose contamination and toxicity are historically in literature. The results of preliminary tests conducted with different environmental parameters showed great values of survival for *H. youngi* and *H. nigra* corresponding to those found in tropical regions, salinities raging between 30 – 40, 20°C - 25°C temperature and 7,5 - 8,5, of pH. With the results obtained, it was observed that the species *H. nigra* displays for the different reference substances tested sensitivity slightly higher when compared to *H. youngi* except for the cadmium chloride. Both species showed tolerance to various substances tested corresponding to those found in the literature for other species of marine amphipods. The results for *H. nigra* in sediment tests with full control showed significant difference (P4) in P2 and P3, was similar to the results found in literature in this area of study. From this study it was possible to evaluate the amphipods *H. nigra* and *H. youngi* demonstrated the potential to be used as test organisms in toxicity testing, since it was observed sensitivity good and results similar to those reported in the literature with other species of amphipods already used in ecotoxicological studies.

Key words: Amphipods; *Hyale nigra*; *Hyale youngi*; Toxicity tests; Sediment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécies empregada no estudo (1a. <i>H. nigra</i> ; 1b. <i>H. youngi</i>).....	10
Figura 2. Banco de algas coletadas na Ilha das Palmas.....	12
Figura 3. Banco de algas coletadas na Praia de Pernambuco, Guarujá – SP.....	12
Figura 4. Triagem dos organismos-teste.....	13
Figura 5. Aclimação dos organismos-teste.....	14
Figura 6. Ensaio com substância de referência (Fase líquida).....	19
Figura 7. Pesagem do sedimento controle para serem empregados nos ensaios de toxicidade.....	23
Figura 8. Agitador magnético empregado para a contaminação do sedimento	24
Figura 9. Ensaio para avaliar a natação horizontal do organismo-teste (<i>H. nigra</i>).....	26
Figura 10. Ensaio para avaliar a natação vertical do organismo-teste (<i>H. nigra</i>).....	27
Figura 11. Área de estudo e localização dos pontos de amostragem.....	28
Figura 12. A) Bosque de manguezal no estuário de Santos.....	29
Figura 12.B) Imagem do ponto P1 (Polo industrial de Cubatão).....	29
Figura 13. Coleta de sedimento utilizando o pegador de fundo do tipo <i>van Veen</i>	30
Figura 14. Valores obtidos nos ensaios de diferentes salinidades e temperaturas com o anfípode <i>H. nigra</i> (média, $\pm$ desvio padrão).....	32
Figura 15. Valores obtidos nos ensaios de diferentes salinidades e temperaturas com o anfípode <i>H. youngi</i> (média, $\pm$ desvio padrão).....	33
Figura 16. Valores obtidos no ensaio com diferentes granulometrias (*= diferença significativa com o controle).....	34

Figura 17. Resultados dos testes de sensibilidade com os anfípodes <i>H. nigra</i> e <i>H. youngi</i> com as substâncias de referência: dodecil sulfato de sódio, cloreto de amônia, dicromato de potássio, cloreto de cádmio e sulfato de zinco, expressos como valores médios de CL50-96h e seus respectivos desvios padrões.....	36
Figura 18. Resultados médios dos ensaios com amostras ambientais (*= diferença significativa; $p = 0.05$).....	44
Figura 19. Resultados médios dos ensaios com o tratamento elutriato (*= diferença significativa; $p = 0,05$). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas (pTukey $<0,01$).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frações de areias empregadas nos ensaios	17
Tabela 2. Localização dos pontos de amostragem.....	29
Tabela 3. Resultados encontrados nos ensaios com diferentes valores de pH com os anfípodes <i>Hyale youngi</i> e <i>Hyale nigra</i>	33
Tabela 4. Caracterização do sedimento empregado como controle (Ilha das Palmas, Guarujá – SP). AMF – Areia Muito Fina; AF – Areia Fina; AM – Areia Média; AG – Areia Grossa; AMG – Areia Muito Grossa.....	34
Tabela 5. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale nigra</i> empregando o Cloreto de Amônia como substância de referência ...	35
Tabela 6. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale nigra</i> empregando o Dodecil Sulfato de Sódio como substância de referência.....	37
Tabela 7. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale nigra</i> empregando o Dicromato de Potássio como substância de referência.....	37
Tabela 8. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale nigra</i> empregando o Cloreto de Cádmio como substância de referência....	38
Tabela 9. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale nigra</i> empregando o Sulfato de Zinco como substância de referência.....	38
Tabela 10. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale youngi</i> empregando o Cloreto de Amônia como substância de referência.....	39
Tabela 11. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale youngi</i> empregando o Dodecil Sulfato de Sódio como substância de referência.....	39
Tabela 12. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale youngi</i> empregando o Dicromato de Potássio como substância de referência.....	40
Tabela 13. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale youngi</i> o Cloreto de Cádmio como substância de referência.....	40

Tabela 14. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale youngi</i> empregando o Sulfato de Zinco como substância de referência.....	41
Tabela 15. Resultados dos ensaios com sedimento contaminado com o anfípode <i>Hyale nigra</i>	41
Tabela 16. Resultados dos ensaios para avaliar a natação horizontal do anfípode <i>H. nigra</i>	42
Tabela 17. Resultados dos ensaios para avaliar a natação vertical do anfípode <i>H. nigra</i>	42
Tabela 18. Caracterização das amostras de sedimento coletadas no estuário e baía de Santos –SP. AMF – Areia Muito Fina; AF – Areia Fina; AM – Areia Média; AG – Areia Grossa; AMG – Areia Muito Grossa.....	45
Tabela 19. Valores das CL50 obtidos no estudo e reportados na literatura para outras espécies de anfípodes marinhos (mg.L ⁻¹)......	52

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Justificativas.....	7
1.1 Objetivos.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
2.1 Organismos-teste.....	10
2.2 Coleta, triagem e seleção dos organismos.....	11
2.3 Manutenção e Aclimatação.....	13
2.4 Caracterização dos parâmetros limitantes.....	14
2.4.1 Caracterização de parâmetros sedimentológicos.....	16
2.5 Sedimento controle.....	18
2.6 Sensibilidade dos organismos-teste.....	18
2.6.1 Ensaios fase líquida.....	19
2.6.2 Ensaios fase sólida.....	20
2.6.2.1 Caracterização sedimento controle.....	20
2.7 Sedimento artificialmente contaminado.....	23
2.7.1 Avaliação do comportamento dos organismos-teste.....	25
2.7.1.1 Avaliação do comportamento de natação.....	25
2.7.1.2 Enterramento.....	27
2.8 Aplicação – Ensaios de toxicidade com amostras ambientais.....	28
2.8.1 Área de estudo e pontos de amostragem.....	28
2.8.2 Ensaios de toxicidade.....	29
2.8.2.1 Sedimento integral.....	30
2.8.2.2 Elutriato.....	30
2.9 Análises estatística.....	31
3. RESULTADOS.....	32
3.1 Caracterização dos parâmetros limitantes.....	32
3.2 Sensibilidade dos organismos-teste.....	35
3.2.1 Fase líquida.....	35
3.3 Fase sólida (sedimento artificialmente contaminado.....	41
3.3.1 Comportamento dos organismos-teste.....	42

3.3.1.1	Natação.....	42
3.3.1.2	Enterramento.....	43
3.4	Ensaio de toxicidade com amostras ambientais.....	44
4.	DISCUSSÃO.....	46
4.1	Caracterização dos parâmetros limitantes.....	47
4.2	Sensibilidade dos organismos-teste (Fase líquida).....	50
4.3	Sedimento artificialmente contaminado.....	54
4.4	Comportamento dos organismos-teste.....	55
4.4.1	Natação.....	56
4.4.2	Enterramento.....	57
4.5	Ensaio de toxicidade.....	58
5.	CONCLUSÕES.....	61
6.	RESULTADOS ALCANÇADOS.....	63
6.1	Trabalhos apresentados em Congressos.....	63
6.2	Trabalhos de Iniciação Científica.....	63
6.3	Elaboração de artigos.....	63
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	APENDECES.....	76
	APENDECE I. Caracterização dos parâmetros limitantes.....	76
	Resultados dos ensaios com diferentes salinidades e temperaturas com a espécie <i>Hyale nigra</i>	77
	Resultados dos ensaios com diferentes salinidades e temperaturas com a espécie <i>Hyale youngi</i>	78
	APENDECE II. Sensibilidade dos organismos-teste.....	79
	Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale nigra</i>	80
	Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode <i>Hyale youngi</i>	90
	APENDECE III. Resultados sedimento contaminado	94
	APENDECE IV. Sumário e critérios de aceitabilidade.....	97
	Sumário das condições e critérios de aceitabilidade para ensaios de toxicidade (fração aquosa) com <i>H. nigra</i> e <i>H. youngi</i> . Tais critérios foram baseados nos resultados dos ensaios de caracterização dos parâmetros físico-químicos.....	98

Sumário das condições e critérios de aceitabilidade para ensaios de toxicidade (fração sólida) com <i>H. nigra</i> e <i>H. youngi</i> . Tais critérios foram baseados nos resultados dos ensaios de caracterização dos parâmetros físico-químicos.....	99
APENDECE V. Cálculos para a contaminação do sedimento	100
APÊNDICE VI. Cartas controle (<i>Hyale nigra</i>) Ensaios fase líquida.....	104
APENDECE VII. Cartas controle (<i>Hyale youngi</i>) Ensaios fase líquida.....	106
APENDECE VII. Carta controle (<i>Hyale nigra</i>); Sedimento-contaminado.....	109
APENDECE IX. Modelos de fichas.....	113
Caracterização físico-química.....	114
Ensaios de sensibilidade.....	115
Análises físico-químicas.....	116
Ensaios de toxicidade.....	117
ANEXOS.....	118
ANEXO I. Resultados das análises químicas.....	119

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, os oceanos foram considerados verdadeiros sumidouros para uma variedade de resíduos provenientes das sociedades humanas. Acreditava-se que o grande volume de água presente nestes ambientes fosse capaz de diluir e eliminar todos esses resíduos de forma infinita, bem como que os recursos marinhos fossem inesgotáveis (NIBAKKEN, 2001). Contudo, nos últimos anos a ciência tem demonstrado que os oceanos não têm essa infinita capacidade de absorver o aumento progressivo dessas descargas, e que a intensa exploração dos recursos marinhos está levando à extinção de muitas espécies de importância comercial e ecológica (CESAR, 2003).

Hoje, em várias regiões do mundo, é possível observar que os ecossistemas vêm sofrendo alterações que podem estar associadas à atividade humana decorrente do processo de desenvolvimento industrial, urbano e agrícola. No que se refere aos ecossistemas aquáticos, às atividades antrópicas geram impactos, promovendo lentas e muitas vezes irreversíveis modificações nestes ambientes (BOHRER, 1995), como por exemplo, a perda da biodiversidade.

Devido ao fato dos ecossistemas aquáticos serem extremamente vulneráveis aos efeitos das ações antrópicas, e, paradoxalmente, de grande importância biológica para a manutenção da vida, faz-se necessário o controle e o monitoramento da sua qualidade, com o objetivo de garantir a sustentabilidade dos múltiplos recursos naturais para as presentes e as próximas gerações.

Neste contexto, existe um grande esforço no sentido de se conhecer e encontrar formas de preservação dos ambientes aquáticos, uma vez que esses são receptores de uma grande carga poluidora proveniente das mais diversas fontes antropogênicas (PRÓSPERI, 2002). Por conta disto, órgãos ambientais e instituições governamentais (USEPA - United States Environmental Protection Agency, ASTM - American Society for Testing and Materials, ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, USACE - United States Army Corps of Engineers, USGS - United States Geological Survey, OECD - Organisation for

Economic Co-operation and Development) têm voltado atenção para as análises ecotoxicológica, principalmente aquelas voltadas para avaliação da qualidade dos sedimentos.

A qualidade dos sedimentos tem sido vista como uma extensão da qualidade da água, uma vez que além de este compartimento ambiental possuir importância como habitat para diversos organismos aquáticos, também pode ser o principal repositório de vários agentes químicos persistentes introduzidos no ambiente aquático (ADAMS *et al.*, 1985). Algumas dessas substâncias podem ter origem natural e ser encontradas em altas concentrações, mas, no entanto, a maioria dos problemas de poluição é provocada por atividades antrópicas (POWER & CHAPMAN, 1992).

Atualmente, existe um crescente reconhecimento de que a contaminação localizada em sedimentos pode apresentar efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos, com impactos na estrutura das comunidades bentônicas, sendo os efeitos associados à água na região interface sedimento/água (GIESY *et al.*, 1990; LONG *et al.*, 1990).

Portanto, a vida no ambiente aquático vem sendo diretamente afetada pelas mudanças da qualidade da água e do sedimento e, indiretamente por mudanças ecológicas provenientes da poluição. Assim, a partir dos anos 1960, estudos sobre o efeito de poluentes em organismos marinhos passaram a ter maior atenção, com o objetivo de adquirir dados da toxicidade de efluentes, produtos químicos procedentes de indústrias e outras fontes de poluição (WELLS, 1989).

Várias ferramentas são utilizadas para avaliar a extensão da contaminação dos sedimentos e determinar seus efeitos sobre a biota, incluindo estudos de bioacumulação, biomarcadores, avaliação da estrutura de comunidades bentônicas, medidas de concentrações químicas de contaminantes e ensaios de toxicidade. Juntas, essas medidas fornecem uma avaliação integrada da qualidade do sedimento (ANDERSON *et al.*, 1996).

Uma das ciências que mais se desenvolveu no final do século XX foi a Ecotoxicologia. Esta ciência, de caráter multidisciplinar foi definida como aquela que estuda os efeitos de substâncias sobre os seres vivos e os ecossistemas, utilizando conhecimentos provenientes da química, farmacologia, bioquímica, fisiologia, biologia, genética, epidemiologia, direito, estatística e economia (ZAKREWSKI, 1991).

Entende-se por toxicidade a propriedade inerente de uma substância tóxica que produz efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, por certo período, a determinadas concentrações de substâncias tóxicas, efluentes ou amostras ambientais (CETESB, 1990). Dessa forma, as vias de exposição para os organismos bentônicos e epibentônicos ocorrem através do contato com a água intersticial, da água localizada logo acima do sedimento, através das paredes do corpo e superfície respiratória ou da ingestão de partículas de sedimento contaminado ou biofilme associado (ADAMS *et al.*, 1985).

Os testes de toxicidade constituem uma importante ferramenta de controle e monitoramento ambiental proporcionando evidências diretas e indiretas das consequências da contaminação, podendo ser utilizada para medir a toxicidade em efluentes, águas superficiais e, em misturas complexas de contaminantes tanto em fase líquida, como na fase sólida do sedimento (CESAR *et al.*, 2002).

Os ensaios de ecotoxicológicos podem apresentar dois tipos de efeitos: agudo e crônico. O efeito agudo se manifesta de maneira rápida e severa, causando a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo como, por exemplo, a imobilidade, que normalmente ocorre em um intervalo de 0 a 96 horas em testes com amostras líquidas e 10 dias em testes com amostras sólidas (CETESB, 1990). O efeito crônico é observado em um longo período do ciclo de vida do organismo, que afeta uma ou várias funções biológicas dos organismos expostos, interferindo, por exemplo, no metabolismo, crescimento e maturação, reprodução, desenvolvimento dos ovos, mutações e até mesmo morte dos organismos-teste após longos períodos de exposição (CETESB, 1990; COONEY, 1995; PUSCEDDU, 2007).

A preocupação com o desenvolvimento de testes de toxicidade que pudessem contribuir para avaliar a qualidade de um determinado ecossistema aquático, interligando-se com os dados químicos, ocorreu a partir de trabalhos desenvolvidos por Prater & Anderson (1977) apud Araújo (1996), onde os autores realizaram trabalhos visando o desenvolvimento de testes de toxicidade aguda com sedimento integral empregando as espécies *Hexagenia limbata*, *Daphnia magna* e *Asellus communis*.

Alguns anos mais tarde, NEBEKER *et al.*, (1984) descreveram alguns procedimentos para avaliar, em condições de laboratório, a toxicidade aguda e crônica, assim como a bioacumulação e testes *in situ*, para estimar o impacto de contaminantes presentes no sedimento para a vida aquática.

Nos primórdios, a maioria dos estudos realizados seguindo esta linha de pesquisa no Brasil estava relacionada à Ecotoxicologia de águas doces (ARAÚJO, 1996; BERTOLETTI *et al.*, 1992).

De modo complementar, a ecotoxicologia marinha é uma das áreas desta ciência que tem estado constantemente em desenvolvimento nos últimos anos (CETESB, 1990; NIPPER *et al.*, 1990; MELO, 1993; ABESSA *et al.*, 1998; ABESSA & SOUSA, 2003; CESAR *et al.*, 2004; CESAR *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2009) e, dentro dela, um ramo ainda carente de maior atenção é aquele voltado ao estudo da qualidade de sedimentos marinhos e estuarinos (ABESSA, 2002).

No Brasil os ensaios ecotoxicológicos já estão contemplados na legislação que regulamenta as atividades de dragagem e disposição de sedimentos dragados em áreas portuárias (BRASIL, 2012), bem como na resolução que estabelece os critérios de qualidade de água e os lançamentos de efluentes urbanos e industriais (BRASIL, 2005).

Entretanto, os valores orientadores estabelecidos nas resoluções supracitadas, foram fundamentados em critérios desenvolvidos nos Estados Unidos e Canadá, países com condições ambientais e espécies distintas das

encontradas no Brasil (MELO & NIPPER, 2007; ENVIRONMENT CANADA, 1990; 1995). Nipper (1998) destaca a necessidade da busca por testes ecologicamente mais realistas, com espécies nativas e, a validação destes em escala nacional e internacional.

Segundo USEPA (1994), para um organismo ser selecionado para aplicação em ensaios de toxicidade é necessário que se conheça a distribuição da espécie, sua localização dentro da estrutura trófica, sua biologia, seus hábitos nutricionais e fisiologia, que possuam sensibilidade constante, e por fim, que sejam desenvolvidas técnicas de manutenção e cultivo destes organismos em laboratório.

Entre os diferentes organismos utilizados em ensaios de toxicidade com sedimentos, os anfípodes estão entre os *taxa* mais sensíveis, sendo as primeiras espécies a desaparecer de comunidades marinhas bentônicas em locais contaminados (SWARTZ *et al.*, 1982; SWARTZ *et al.*, 1985; LAMBERSON *et al.*, 1992). Além disso, são considerados excelentes modelos biológicos para avaliar a toxicidade dos sedimentos e são frequentemente selecionados para estudos em ecologia e ecotoxicologia, tanto por sua relevância ecológica como também por sua sensibilidade (THOMAS, 1993; CONLAN, 1994; USEPA, 1994). Esses organismos têm sido empregados mundialmente como organismos-teste para avaliar a toxicidade de sedimentos (LAMBERSON e SWARTZ, 1988, 1989; DEWITT, *et al.*, 1988, 1992; BAT *et al.*, 1998; WOODWORTH *et al.*, 1999; BAT, 2005; CESAR, 2003; PRATO & RAFAELLI, 2006; McCREADY *et al.*, 2006; ALLEN *et al.*, 2007; ASTM, 2008, PICONE *et al.*, 2008; RÉ *et al.*, 2009).

Contudo, entre as espécies de anfípodes já padronizadas como organismos-teste em métodos de ensaios ecotoxicológicos com sedimento integral, em âmbito nacional e internacional, somente a *Tiburonella viscana* e *Grandidierella bonnieroides* (ABNT NBR 15638/2008; ABESSA *et al.*, 1998; MELO, 1993; MELO & ABESSA, 2002; MOLISANI *et al.*, 2013) são nativas de ecossistemas brasileiros. Portanto, há a necessidade de se avaliar e implantar um maior número de espécies representativas de ambientes locais para assim promover

um melhor entendimento e consequentemente uma real proteção aos impactos antrópicos.

Segundo Cesar (2003), novas descobertas e esforços devem centrar-se na melhoria da qualidade ambiental, sendo necessário tentar desenvolver e implementar um conjunto de procedimentos para a caracterização e identificação do grau de contaminação.

Neste sentido, estudos visando a validação de novas espécies para aplicação em ensaios de toxicidade vêm tomando maior proporção nos últimos anos como Abessa *et al.*, (1998); Abessa & Sousa, (2003); Melo (1993); Melo & Abessa (2002); Cesar *et al.*, (2000; 2002; 2004); Araújo, (1996); Tsvetnenko *et al.*, (2000); Sardo & Soares, (2005) ; Ré *et al.*, (2009).

Assim, o presente trabalho pretende avaliar a viabilidade de aplicação dos anfípodes epibentônicos marinhos *Hyale nigra* e *Hyale youngi* em ensaios de toxicidade, a fim de ampliar o leque de opções na escolha de organismos-teste para avaliação da qualidade de sedimentos marinhos, além da possibilidade de sua utilização em outras formas de exposição.

1.1 Justificativas

Atualmente, o crescimento populacional e a ampliação da capacidade tecnológica e industrial fazem com que diversos programas de monitoramento sejam implantados para controlar e mitigar os impactos causados. Assim, com o avanço desta demanda há a necessidade de desenvolvimento de métodos ecotoxicológicos que contemplem espécies nativas capazes de avaliar estes impactos.

No Brasil, os ensaios de toxicidade padronizados com sedimento integral empregando espécies provenientes de ecossistemas marinhos e estuarinos são realizados normalmente com apenas três espécies de anfípodes escavadores, *Tiburonella viscana* e *Grandidierella bonnieroides* de ocorrência nacional e a espécie norte-americana *Leptocheirus plumulosus*. A espécie nativa *T. viscana* não é cultivada em laboratório e, portanto, a dependência exclusiva da captura constante de novos lotes de organismos diretamente na natureza infere grande variabilidade dos resultados, pois populações naturais estão sujeitas a variações na abundância e principalmente na sensibilidade dos organismos. Com relação à espécie exótica *L. plumulosus*, vale ressaltar que esta não é encontrada em ecossistemas brasileiros, o que gera questionamentos sobre a representatividade dessa espécie para avaliar impactos sobre ecossistemas brasileiros.

Dessa forma a busca de outras espécies mais representativas, aliado a possibilidade de cultivo visando à aplicação em ensaios de toxicidade é de suma importância. A relevância de estudos que contemplem outras espécies indicadoras de qualidade ambiental com potencial de cultivo em laboratório se baseia nos seguintes princípios: a não dependência de fatores externos; controle constante da sensibilidade dos organismos e dos parâmetros limitantes de cultivo. Todos esses parâmetros poderão ser ajustados devidamente ao organismo e ao cultivo, o que facilitará a implantação em qualquer laboratório, além de representar uma redução de custos.

Outro fator importante refere-se à possibilidade de desenvolvimento de um protocolo capaz de avaliar a toxicidade de amostras não somente de fase sólida - sedimento integral, como também de amostras em fase líquida. Isso possibilitará a identificação de outras abordagens de exposição (ex. elutriatos, interface sedimento-água água intersticial), devido ao fato dos anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* terem hábitos epibentônicos.

Os resultados obtidos neste estudo auxiliarão de modo geral, as pesquisas direcionadas à identificação de impactos ambientais em ecossistemas marinhos e estuarinos, principalmente, no desenvolvimento de novas espécies apropriadas para a realização de ensaios ecotoxicológicos, destinadas a avaliação da qualidade de sedimentos, considerando diferentes aplicações e formas de exposição.

1.2 Objetivos

O presente trabalho teve a finalidade de avaliar, descrever e validar um protocolo para realização de ensaios de toxicidade aguda empregando os anfípodes epibentônicos marinhos *Hyale nigra* e *Hyale youngi* para avaliação da qualidade de sedimentos, através da exposição dos organismos tanto à fase sólida (sedimento integral), como também à fase líquida (ex. elutriato e água intersticial). Para alcançar este objetivo geral, foi necessária a realização dos seguintes objetivos específicos:

- Identificar e caracterizar as condições ótimas para a realização de ensaios laboratoriais com ambas as espécies, considerando as características limitantes (salinidade, pH, temperatura, granulometria e amônia);
- Avaliar e caracterizar a sensibilidade destas espécies utilizando diferentes substâncias tóxicas de referência (fase aquosa);
- Avaliar a sensibilidade do anfípode *Hyale nigra* em fase sólida empregando a técnica de contaminação do sedimento “spiked”.
- Avaliar efeitos subletais a partir de um gradiente de contaminação em amostras com sedimento-marcado “spiked” com cádmio;
- Aplicar validar o ensaio com o anfípode *H. nigra* empregando amostras ambientais que apresentem um gradiente de contaminação;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Organismo-teste

As espécies *Hyale nigra* (Fig. 1a) e *Hyale youngi* (Fig. 1b) são crustáceos, anfípodes, pertencentes à família Hyalidae BULYCHEVA, 1957. Esses crustáceos são representantes da epifauna vágil e destacam-se dos outros grupos por sua abundância e riqueza de espécies em comunidades de macrófitas de todo o mundo (MUKAI, 1971; EDGAR, 1983; GUNNILL, 1985). Além disso, constituem um importante recurso alimentar para várias espécies de peixes e crustáceos (ZAMPROGNO, 1989; DUBIASKI-SILVA, 1999), possibilitando assim, a transferência de contaminantes ao longo de toda a cadeia trófica, como por exemplo, pelo processo de biomagnificação.

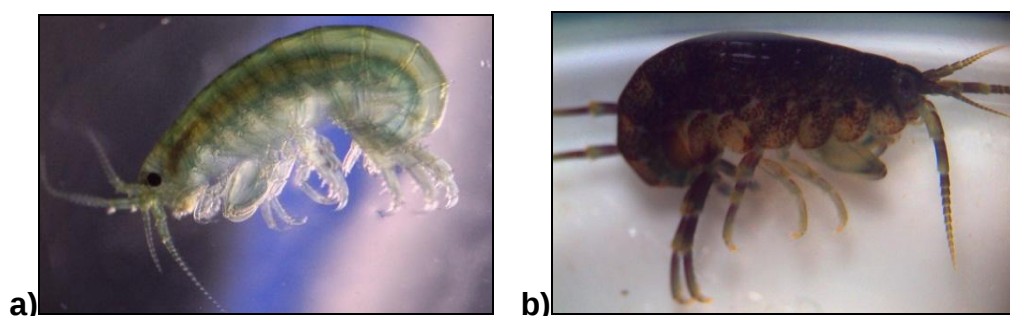


Figura 1. Espécies empregadas no estudo (1a. *Hyale nigra*; 1b. *Hyale youngi*).

Anfípodes pertencentes à família Hyalidae são muito generalistas e apresentam grande facilidade de adaptação às adversidades ambientais (LEITE *et al.*, 2000). De acordo com Tararam *et al.*, (1981) indivíduos dessa família são onívoros e comem qualquer alimento oferecido, havendo algumas mudanças de acordo com a estação do ano.

Esta família apresenta como característica taxonômica o dimorfismo sexual estimado através da variação das medidas dos gnatópodos, nos machos o gnatópodo I é modificado para agarrar as fêmeas na cópula. No caso dos indivíduos da espécie *Hyale nigra*, a diferenciação taxonômica está tanto nos pereópodes de 5 a 7 com há presença de 3 espinhos simples, como também no ramo dos uropódos 1 e 2 com espinhos marginais. Já a espécie *Hyale*

youngi apresenta setas grandes e estriadas nos dactilus dos pereópodes de 3 a 7, e o pedúnculo do urópode 1 com espinho lateral (SEREJO, 2001).

Estes anfípodes são frequentemente encontrados abrigados em costões rochosos de regiões entre - marés marinhas e estuarinas predominantemente associada a algas *Ulva sp.* Estudos relataram que geralmente ocorre maior abundância da espécie *Hyale nigra* na região inferior do costão rochoso, o que demonstra que além de tolerante, esta espécie é também o melhor competidor entre os hialídeos, mantendo-se em regiões mais protegidas contra dessecação, enquanto *H. youngi* encontram-se restritas as regiões mais altas dos costões (TARARAM *et. al.*, 1986; CHAVANICH & WILSON, 2000).

Espécies desse grupo apresentam como regra a reprodução contínua, com as fêmeas carregando seus embriões em uma bolsa ventral, ajustando seu ciclo reprodutivo a fim de explorar as condições ambientais favoráveis. De acordo com Valério-Berardo e Flynn (2004), apesar desses organismos encontrarem-se férteis durante todo o ano, a espécie *H. nigra* apresenta seu pico na reprodução principalmente na primavera e verão.

2.2 Coleta, triagem e seleção dos organismos

Os organismos foram coletados em bancos de algas da espécie *Ulva sp* presentes nas praias de Santos e Guarujá (Fig. 2), preferencialmente na Ilha das Palmas, Santos – SP (Fig. 3). Foram retiradas as algas presentes na zona entre marés do costão rochoso e posteriormente transportadas em caixa térmica com água do mar e aeração até o laboratório (ABNT NBR 15638/2008).



Figura 2. Banco de algas coletadas na Praia de Pernambuco, Guarujá - SP.

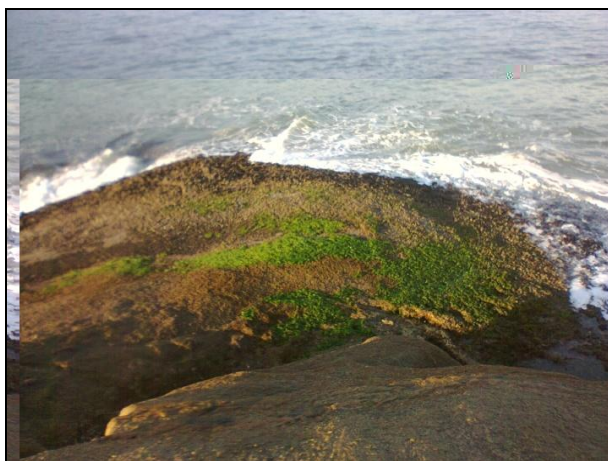


Figura 3. Banco de algas coletadas na Ilha das Palmas.

No laboratório foi realizada a triagem do material coletado e os organismos separados de acordo com sua espécie. As principais espécies encontradas nos locais de coleta foram *H. nigra* e *H. youngi*, porém, a frequência de ocorrência de cada uma destas é bastante variada.

Embora não seja o enfoque do estudo, foi observado que a espécie *H. nigra* ocorre de forma mais abundante e com mais frequência nas praias de Santos e Guarujá –SP do que a espécie *H. youngi*. Deste modo, este foi o motivo pelo qual a quantidade de testes realizados com cada uma das espécies foi diferente.



Figura 4. Triagem dos organismos-teste.

A identificação das espécies de anfípodes foi conduzida com o auxílio de bibliografia especializada (BARNARD & KARAMAN, 1991; SEREJO, 2001) e, quando necessário com a ajuda da especialista em anfípodes marinhos, doutoranda do Instituto Oceanográfico da USP, Carina Waiteman Rodrigues.

A frequência de ocorrência de cada uma das espécies utilizadas neste estudo variou muito, a espécie que apresentou maior abundância nas coletas foi a *Hyale nigra*, por esse motivo, os ensaios foram realizados em maior número empregando este organismo.

2.3 Manutenção e aclimação

Após a triagem do material coletado os organismos foram aclimatados às condições empregadas nos ensaios, em cubas de vidro contendo 1L de água do mar filtrada em membrana 0,45 μm e livre de contaminações.

Foi avaliada também a viabilidade de manutenção e cultivo dos organismos-teste em laboratório. Dessa forma, a manutenção foi realizada uma vez por semana, com troca da água de cultivo, sendo controlados os parâmetros físico-químicos (salinidade, pH e oxigênio dissolvido).

Inicialmente os parâmetros físico-químicos da água do mar foram mantidos de acordo com os valores encontrados no local de coleta dos organismos, após a realização dos ensaios de caracterização dos fatores físico-químicos (item 2.4), os parâmetros foram ajustados conforme os ótimos encontrados para a espécie (20°C-25°C) salinidade 35±2 e pH entre 7,5 e 8,5).



Figura 5. Aclimação dos organismos-teste.

Durante o período de aclimação os organismos foram alimentados com 1,5 ml de uma ração de peixe concentrada e algas *Ulva lactuca* diariamente, e foram adicionadas redes tipo *nylon* como substrato artificial conforme estabelecido na ABNT NBR “Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda)” (15470/2007).

Para o preparo da ração, pesou-se 2g da ração (Tetra-Min[®]), avolumados em 80 mL da água de cultivo e agitado até ficar em pequenos flocos.

2.4 Caracterização dos parâmetros limitantes

De acordo com Melo & Nipper (2007), os critérios para aplicar uma espécie em ensaios toxicológicos incluem avaliar a tolerância a fatores ambientais naturais tais como salinidade, temperatura e granulometria, bem como sua sensibilidade a contaminantes.

Neste sentido, para avaliar os parâmetros limitantes para as espécies *H. nigra* e *H. youngi* foram realizados diversos ensaios, os quais foram separados por etapas, sendo nomeados de Etapa I os ensaios com diferentes salinidades e temperatura, Etapa II os ensaios com diferentes condições de pH.

Etapa I

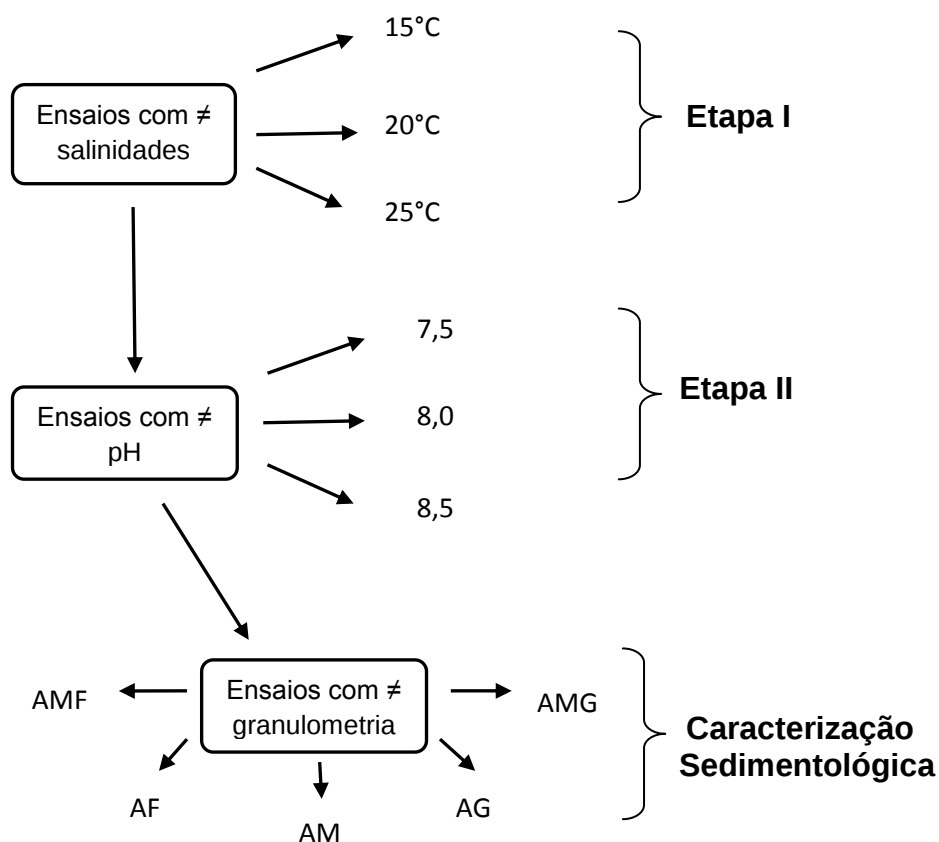
Inicialmente os organismos foram expostos a diferentes salinidades (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40) sob três temperaturas (15°C, 20°C e 25°C), em ensaios de 10 dias. As soluções testes foram preparadas misturando água do mar filtrada e água destilada ou sal marinho comercial. Em seguida, os organismos foram transferidos para frascos de polietileno de 1L de capacidade contendo 400 ml da solução teste.

Etapa II

Posteriormente, os organismos foram expostos a três condições de pH (7,5; 8,0; 8,5) por 10 dias, utilizando os valores ótimos de salinidade e temperatura encontrados no ensaio anterior. A água do mar utilizada nesta etapa dos ensaios apresentava o pH inicial de 8,67, sendo assim, foi adicionado HCl 10% para diminuir o pH nas concentrações propostas no estudo.

Os ensaios foram realizados com 3 réplicas contendo 10 organismos, em um período de execução de 10 dias e foram mantidos em câmaras de germinação com a temperatura e fotoperíodo controlados, sendo os parâmetros físico-químicos medidos periodicamente, juntamente com a alimentação e manutenção dos frascos testes.

O fluxograma 1 sintetiza os procedimentos realizados nessa fase do trabalho.



Fluxograma I. Procedimentos para a realização da caracterização dos parâmetros limitantes

2.4.1 Caracterização de parâmetros sedimentológicos

Também foi avaliada a sensibilidade das espécies a diferentes granulométricas (areia muito grossa, areia grossa, areia média, areia fina, areia muito fina). Para isso, o sedimento controle (item 2.5) foi lavado, peneirado e os grãos separados conforme sua fração de acordo com a escala de Wentworth. Em seguida, os organismos foram expostos às diferentes frações propostas.

Tabela 1. Frações de areias empregadas nos ensaios (mm).

Frações	Tamanho
Areia Muito Fina	0,063
Areia Fina	0,125
Areia Média	0,250
Areia Grossa	0,500
Areia Muito Grossa	1,000

Os testes foram realizados somente com a espécie *H. nigra*, e conduzidos em frascos de polietileno com volume de 1 L de capacidade, onde, foi introduzida uma camada de 2 cm (150g) de sedimento e 600 ml de água do mar filtrada em membrana de 0,45 µm. Após este procedimento, foram adicionadas telas de *nylon* com abertura de malha de 600µm em todas as réplicas. Tais telas foram adicionadas para servir como substrato artificial para os organismos, e evitar seu estresse, uma vez que a espécie *H. nigra*, como já relatado, apresenta hábitos epibentônicos e vivem fixadas em algas presentes no costão rochoso.

Como já descrito anteriormente, os ensaios foram realizados com 3 réplicas contendo 10 organismos, em um período de execução de 10 dias. Embora não seja normalmente realizada a renovação da água e alimentação dos frascos-teste nos experimentos com anfípodes marinhos, no presente estudo optou-se por realizar a renovação de 2/3 da água de diluição por 3 vezes ao longo dos 10 dias de exposição, juntamente com a alimentação. A adaptação da renovação da água e alimentação foi baseada em estudos preliminares e de acordo a ABNT NBR 15470/2007 que estabelece estas condições para os ensaios com anfípodes de água doce. Os ensaios foram realizados empregando 3 réplicas, contendo 10 organismos por réplica.

2.5 Sedimento Controle

O sedimento empregado como controle para a etapa de separação das frações granulométricas foi coletado na Praia de Itaguapé, Bertioga - SP, localizada dentro do Parque Estadual das Restingas de Bertioga, sendo uma área bastante preservada e livre de impactos antrópicos e contaminação. Já para os ensaios, o sedimento foi coletado na Ilha das Palmas, Guarujá - SP, ponto considerado controle para estudos na região da Baixada Santista (CESAR *et al.*, 2006).

As amostras de sedimento foram coletadas utilizando um pegador de fundo do tipo *van Veen* e em caso de sedimentos com frações granulométricas maiores, foi utilizada uma pá. Posteriormente as amostras foram transferidas para sacos plásticos e levadas ao laboratório em uma caixa térmica. No laboratório as amostras foram armazenadas a 4°C, seguindo as recomendações de USEPA (2001).

2.6 Sensibilidade dos organismos-teste

Segundo Environment Canada (1990 e 1995), os ensaios com substâncias tóxicas de referência são úteis para avaliar a sensibilidade relativa da população dos organismos que se pretende utilizar para estudar toxicidade de qualquer amostra-teste, além de fornecerem informações sobre precisão e confiabilidade dos dados produzidos em laboratório.

Dessa forma, para avaliar a viabilidade do uso das espécies *H. nigra* e *H. youngi* como organismos-teste foram realizados ensaios utilizando como substâncias tóxicas de referência o cádmio (como cloreto de cádmio - CdCl_2), o detergente dodecil sulfato de sódio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) a amônia (como cloreto de amônia (NH_4Cl_2)) o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e o sulfato de zinco (ZnSO_4) recomendados mundialmente (ASTM, 1992; ENVIRONMENT CANADA, 1995; SCHIPPER *et al.*, 1999; SWARTZ *et al.*, 1985; USEPA, 1994;

ABNT NBR, 15638/2008), todos os reagentes empregados nos ensaios apresentavam grau analítico.

2.6.1 Ensaios fase líquida

Os ensaios com as substâncias de referência citadas acima foram realizados em fase líquida e as concentrações letais a 50% dos organismos expostos nos ensaios (CL50) foram estabelecidas para o período de 96h (USEPA, 1994; ABNT NBR 15638/2008).

Foram realizados 5 testes para cada substância tóxica de referência com a espécie *H. nigra* e 3 testes com cloreto de cádmio, dodecil sulfato de sódio e dicromato de potássio, 2 testes com cloreto de amônia e 1 com sulfato de zinco com a espécie *H. youngi*, utilizando 3 réplicas para cada concentração, contendo 10 organismos por réplica. Para a realização dos ensaios foram utilizados frascos de polietileno de 1L, contendo 400 ml da solução e adicionado redes de *nylon* como substrato artificial. A figura 6 ilustra a execução de um ensaio com substância de referência em fase líquida.



Figura 6. Ensaios com substância de referência (Fase líquida).

As concentrações definitivas foram determinadas nos ensaios preliminares, seguindo um padrão de fator de diluição de 1.5 a 2.0, sendo que no término de cada experimento foram contados os números de organismos vivos, imóveis e/ou mortos.

Em paralelo aos ensaios, os parâmetros físico-químico (salinidade, oxigênio dissolvido, pH e temperatura) foram analisados no início e no final de cada experimento, de acordo com os protocolos estabelecidos por APHA (1998).

2.6.2 Ensaios fase sólida

De acordo com Lamberson *et al.*, (1992), a causa da toxicidade e magnitude de interação dos contaminantes nos sedimentos podem ser estimadas através de ensaios com sedimento marcado por produtos químicos ou misturas complexas de resíduos. Ensaios de toxicidade empregando sedimento marcado ou “*spiked sediments*” são rotineiramente utilizados para avaliar a sensibilidade de organismos-teste a diversos contaminantes (ENVERONMENT CANADA, 1990; 1995; USEPA, 1994; ASTM, 1992), sendo preferencialmente realizados com metais, como cádmio, cobre e zinco (GIUTSO *et al.*, 2012; KING *et al.*, 2006; BARJHOUX *et al.*, 2012), devido estabilidade que essas substâncias apresentam.

No presente estudo foram realizados ensaios com sedimento marcado (“*spiked sediments*”) utilizando como substância tóxica de referência o cádmio, seguindo os protocolos técnicos nacionais e internacionais (ABNT NBR 15638/ 2008; USEPA, 1994).

2.6.2.1 Caracterização do sedimento-controle

Segundo ABNT NBR (15638/2008), o sedimento-marcado empregado nos ensaios deve ser caracterizado quanto ao carbono orgânico total, distribuição

de tamanho da partícula e umidade. Neste sentido, cabe ressaltar que tais parâmetros foram avaliados antes dos experimentos, seguindo os protocolos padronizados referenciados abaixo.

Umidade

Para a determinação da umidade do sedimento controle, foram pesados 5g da amostra em um cadinho tarado, a qual permaneceu na estufa a 60-70°C por 72h, para ocorrer a perda da água da amostra.

O valor da umidade foi calculado em:

$$\%U = 100(p-p_1)/p$$

Sendo:

p= peso da massa de amostra natural inicial

p₁ = peso da massa seca

Granulometria

Para a determinação da granulometria das amostras de sedimento foram utilizados béqueres de 400 ml, os quais foram inicialmente pesados e, tarados, em seguida foram empregados ao longo de todo o procedimento. Dessa forma, foram pesados 100 g das amostras e secas em estufa sob 60°C por 3 dias. Após seco, o sedimento foi lavado e peneirado em malha de 0,063 mm, para a retirada da fração lama. Em sequência, as amostras voltaram para os béqueres identificados e novamente levados a estufa por mais 3 dias. Com o sedimento seco, as amostras foram pesadas novamente, o peso inicial e o peso após a lavagem é a fração lama.

Em seguida as amostras de sedimento foram peneiradas no *shaker* por 10 minutos, e as frações separadas e pesadas. Com os resultados foram calculadas as classificações granulométricas de Shepard (1954) e obtidos os teores de areia, segundo classificação de Folk; Ward (1957).

Teor de Carbonato de Cálcio (CaCO₃)

A quantificação do teor de carbonato cálcio (CaCO₃) foi realizada com base no método descrito por Hirota & Szyper (1975). Foram pesados cerca de 30g das amostras em béqueres de 400 ml, sendo estes inicialmente pesados e identificados. As amostras foram transferidas para a estufa a 60°C, onde permaneceram por 3 dias. Após este procedimento, as amostras foram pesadas e o ataque de ácido clorídrico (HCl 15%) realizado, permanecendo imerso por 24 horas.

Em paralelo ao ataque de HCl foram secos filtros de papel na estufa e pesados. Dessa forma, o sedimento com o ácido foi filtrado e lavado com água destilada. Após a retirada de todo o ácido, o sedimento juntamente com o filtro foi novamente transferido para a estufa a 60°C por mais 3 dias. O peso inicial (antes do ataque com HCl) e o peso final (após o ataque) é considerado como o valor de carbonato presente nas amostras.

Matéria orgânica (MO)

O método para medir teor de matéria orgânica foi descrito por Luczak *et al.*, (1997). O mesmo sedimento empregado na determinação do carbonato de cálcio foi utilizado para a determinação da matéria orgânica das amostras.

Os cadinhos foram secos em mufla a 500°C por 30 minutos e sequencialmente pesados e identificados. Posteriormente, os cadinhos com as amostras de sedimento foram calcinados na mufla sob 500°C por 4 horas. Em seguida, permaneceram no dessecador por 30 minutos para a realização da pesagem.

Dessa forma, o valor antes de ir para a mufla (após retirada do carbonato de cálcio e pesagem) e o valor após a calcinação, é o teor de matéria orgânica.

Amônia

O método empregado para a determinação da amônia nas amostras de sedimento foi o de titulação com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e encontra-se descrito em APHA (1998).

2.7 Sedimento artificialmente contaminado

Este método envolve a adição de uma ou mais substâncias químicas em amostras de sedimento em diferentes concentrações para avaliação dos efeitos do composto testado sobre os organismos expostos, através de ensaios de toxicidade (USEPA, 2001; OECD, 1984; SIMPSON & KING, 2005).

Para a realização da marcação do sedimento foi empregado o cádmio como substância de referência. A técnica utilizada foi a de resuspensão, misturando 600 ml da solução contendo as concentrações de cádmio (CdCl_2) e o sedimento controle (150g) (Fig. 7) com um agitador magnético (QUIMIS) por 4 horas em uma velocidade de 130 rpm (rotação por minuto) (Fig. 8). Após 24h foi retirada toda a solução dos frascos testes.



Figura 7. Pesagem do sedimento controle para serem empregados nos ensaios de toxicidade.

Segundo as normas técnicas USEPA, 1994 e ABNT NBR 15638/2008, após o procedimento de mistura deve-se assegurar um tempo suficiente para equilíbrio da substância de referência. Dessa forma, o sedimento permaneceu estabilizando sob a temperatura empregada nos ensaios (20°C) (SIMPSON *et al.*, 2005) por 14 dias (Giutso *et al.*, 2012).



Figura 8. Agitador magnético empregado para a marcação do sedimento “spiked”.

Inicialmente foi realizada uma marcação preliminar para determinar as concentrações reais que foram empregadas nos ensaios definitivos. Dessa forma, todo o procedimento descrito anteriormente foi realizado com 2 concentrações (0,40 mg.L⁻¹ e 0,60 mg L⁻¹ de Cd) baseadas em estimativas e derivadas a partir de uma solução estoque de 50 mg. L⁻¹. O cálculo foi baseado em concentrações da solução e não concentrações nominais.

Após os 14 dias de estabilização, as amostras foram encaminhadas ao Ecolabor (laboratório acreditado junto ao Inmetro para a realização desta análise) e submetidas a análises químicas, a fim de avaliar a concentração real de cádmio que constava no sedimento.

Com os resultados obtidos nas análises químicas foi possível determinar as concentrações reais que seriam utilizadas nos ensaios definitivos (1mgCd, 2 mg, 4 mgCd e 8 mgCd/Kg de sedimento), estimadas a partir da equação da reta ($y = ax+b$). No apêndice V seguem os cálculos detalhados.

Foram realizados 5 testes com o anfípode *H. nigra*, sendo um período de exposição de 10 dias, com 4 réplicas contendo 10 organismos. Os ensaios foram realizados em frascos de polietileno de 1L, contendo 150 g do sedimento e 600 ml de água do mar filtrada a 0,45 µm. As condições dos ensaios na fase sólida seguiram as mesmas descritas no item 2.4.1.

2.7.1 Avaliação do comportamento dos organismos-teste

Embora a letalidade seja na maioria das vezes o “*endpoint*” avaliado em ensaios de toxicidade, analisar efeitos subletais como, por exemplo, alterações na produção de descendência ou no comportamento, podem ser mais vantajosos, pois nem sempre ocorre a mortalidade em organismos expostos a contaminantes sob ambientes naturais (FAY *et al.*, 2000; ROAST *et al.*, 2001; PEREZ & WALLACE, 2004).

Neste sentido, a fim de complementar as informações e o entendimento do efeito de um contaminante sobre a espécie estudada, foram avaliados os efeitos subletais como a alterações no comportamento de natação e enterramento do anfípode *H. nigra*.

Tais avaliações foram realizadas a partir dos ensaios com sedimento contaminado (item 2.7), onde se encontra um gradiente de contaminação conhecido. Sendo assim, no final dos experimentos com sedimento-marcado os organismos da espécie *Hyale nigra* foram expostos nos ensaios para avaliar seu comportamento de natação e enterramento, descritos abaixo.

2.7.1.1 Avaliação do comportamento de natação

Após os 10 dias de ensaios com sedimento-marcado com cádmio (item 2.7), os organismos foram direcionados aos ensaios para avaliar possíveis alterações no seu comportamento de natação horizontal e vertical, seguindo a metodologia empregada por Wallace & Estephan (2004).

Para avaliar as alterações na natação horizontal do anfípode *Hyale nigra*, foram realizados 2 ensaios com 10 réplicas, sendo 1 organismo por réplica. Os organismos foram transferidos para placas de Petri contendo tampinhas de plásticos com 2,5 ml de água do mar (Fig. 9) (salinidade 35 sob 20°C), onde foram observados por 15 minutos, sendo os 5 primeiros minutos considerados como período de aclimação e, nos 10 minutos restantes foram observados a natação no sentido horário e anti-horário, onde foi avaliado o percentual de tempo móvel dos organismos-teste $[(\text{segundo móvel}) / (600\text{s})] \times 100$.

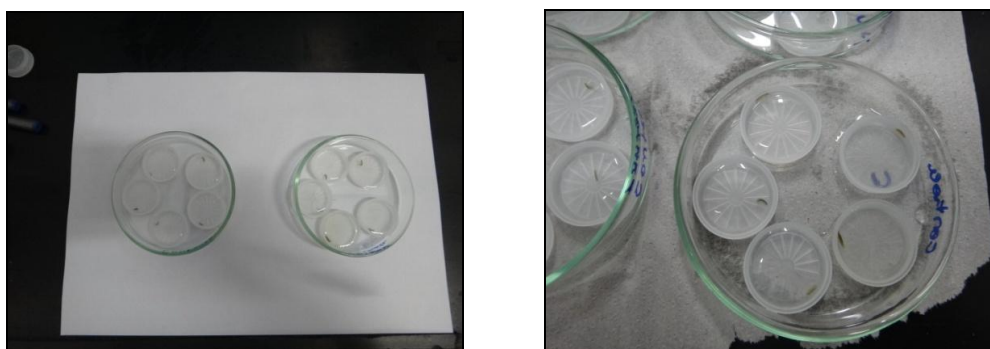


Figura 9. Ensaio para avaliar a natação horizontal do organismo-teste (*H. nigra*).

Após avaliada a natação horizontal, os organismos foram transferidos para caixas de plástico transparente com dimensões de 3,5 cm de largura, 6,0 cm de altura e 1,0 cm de profundidade, contendo 10 ml de água do mar (Fig. 10) (salinidade 35 sob 20°C), para avaliar as alterações de sua natação vertical. A observação teve um período de exposição de 40 minutos, sendo os 10 primeiros minutos considerados o período de aclimação. Nos 30 minutos restantes foi observada a natação dos organismos até a superfície do frasco-teste. Os ensaios tiveram 4 réplicas contendo 2 organismos.

As concentrações utilizadas nessa etapa dos ensaios foram de: 1 mgCd, 2 mgCd e 4 mgCd/kg de sedimento, sendo a concentração de 8 mgCd/kg descartada para essa avaliação, pois a maioria dos organismos morreram nos ensaios em fase sólida.

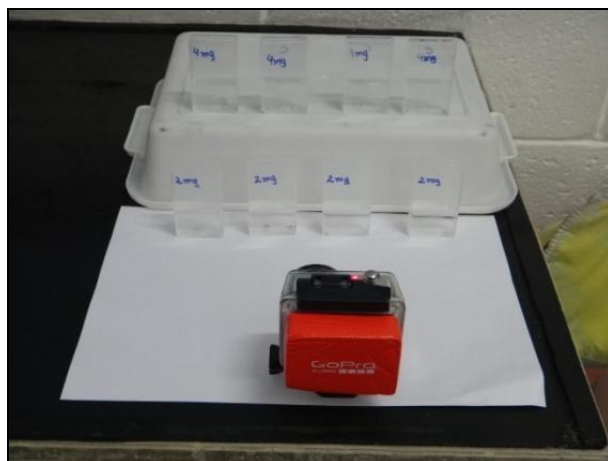


Figura 10. Ensaio para avaliar a natação vertical do organismo-teste (*H. ni*)

2.7.1.2 Enterramento

Em paralelo aos términos dos ensaios agudos com sedimento-marcado (item 2.6.2.2) foi observado também o comportamento em relação à frequência de enterramento dos organismos, a fim de compreender se há alguma ligação com este comportamento e o meio exposto.

Considerando que a espécie *Hyale nigra* seja um organismo com hábito epibentônico e não escavador como, por exemplo, *Tiburonella viscana*, foi avaliada sua real rota de exposição em ensaios com sedimento, possibilitando entender de que maneira este organismo está sendo afetado pelos contaminantes contidos nos sedimento.

As observações foram feitas de forma visual, a partir da comparação do comportamento dos organismos expostos no controle com as concentrações empregadas nos ensaios.

Dessa forma, no final dos experimentos com sedimento-marcado foi observada a quantidade de organismos: i. enterrado, ii. sobre a superfície do sedimento e iii. na coluna d'água.

2.8 Aplicação - Ensaios com amostras ambientais

2.8.1 Área de estudo e pontos de amostragem

O Estuário de Santos está localizado na porção central do litoral do Estado de São Paulo, fazendo parte da Baixada Santista e englobando as Baías de Santos e São Vicente. Essa região possui grande importância econômica, devido à presença do polo industrial de Cubatão, do Porto de Santos, do imenso potencial turístico e também dos recursos pesqueiros e naturais proporcionados pelos manguezais que ocorrem junto ao estuário.

A rede de pontos de amostragem estabelecida para o sistema estuarino de Santos (Fig. 11) foi desenhada a partir de trabalhos anteriores (LAMPARELLI *et al.*, 2001; ABESSA, 2002 e CESAR, *et al.*, 2006; 2007; 2009), sendo o P1 localizado próximo a empresa Usiminas, o P2 e P3 próximo a Ilha Barnabé, local onde está situado os terminais de granéis líquidos do Porto de Santos, e o P4 considerado como ponto controle, localizado na Ilha das Palmas, Guarujá – SP. De acordo com os autores acima citados, as estações P1, P2 e P3 são consideradas as mais críticas do Estuário de Santos, e relacionam a contaminação e toxicidade presentes nestas com as operações portuárias e atividade industrial.

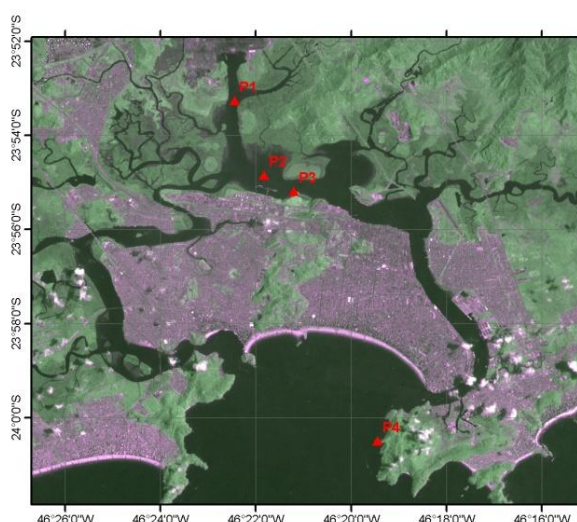


Figura 11. Área de estudo e localização dos pontos de amostragem.

As figuras abaixo demonstram o contraste de paisagens que há no estuário de Santos, onde na figura 12. A) é possível observar a presença de um bosque de manguezal ainda preservado, e na figura 12. B) o polo industrial de Cubatão, sendo que as emissões atmosféricas que aparecem no fundo da figura são provenientes da empresa Usiminas.



Figura 12. A) Bosque de manguezal no estuário de Santos; B) Imagem do ponto P1 (Polo industrial de Cubatão).

As amostras foram coletadas em dezembro de 2012, sendo 4 pontos de amostragem localizados no estuário de Santos, conforme descritos abaixo (Tabela 2).

Tabela 2 . Localização dos pontos de amostragem.

Ponto	Coordenada
P1	235616.462226
P2	235450.462148
P3	235511.462127
P4	240034.461927

Os procedimentos de coleta (Fig. 13), armazenamento e manipulação das amostras de sedimentos foram realizados da mesma forma descrita no item 2.5.



Figura 13. Coleta de sedimento utilizando o pegador de fundo do tipo *van Veen*.

2.8.2 Ensaios de toxicidade

2.8.2.1 Sedimento Integral

O método utilizado na execução dos ensaios de toxicidade com sedimento integral foi fundamentado nas normas ABNT NBRs 15470/2007; 15638/2008 e USEPA (1994) e encontram descritos no item 2.4.

2.8.3.2 Elutriato

Com as mesmas amostras foi realizado teste de toxicidade com a fase líquida do sedimento no tratamento elutriato, foram agitadas por 30 minutos 200 ml das amostras de sedimento e 800 ml de água marinha filtrada. Após a agitação, as amostras permaneceram estabilizando por 1 hora, sendo utilizada a água sobrenadante (ABNT NBR15325/2011). Posteriormente os organismos foram transferidos para os recipientes testes contendo 400 ml da amostra.

Os ensaios foram realizados com 4 réplicas para cada amostra contendo 10 organismos por réplica, sendo estes adultos, sadios e de mesmo tamanho. Não foram utilizadas fêmeas ovígeras.

Os experimentos na fase líquida do sedimento (Elutriato) tiveram duração de 96 horas. Ao fim do experimento, os organismos foram transferidos para placas de Petri, com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta arredondada e examinado em estereomicroscópio. O número de animais mortos e vivos foi contado. Quando a soma final de vivos e mortos numa réplica não atingiu 10, os organismos não encontrados foram considerados mortos.

Os parâmetros físico-químicos (salinidade, pH e oxigênio dissolvido) foram controlados diariamente.

2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes com as substâncias referência foram analisados pelo método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber*, dessa forma, foram estimadas as respectivas CL50 (concentrações letal mediana a 50% dos organismos) e seus intervalos de confiança, para as diferentes substâncias, após 96h de exposição na fase aquosa e 10 dias na fase sólida (sedimento).

Os dados de toxicidade obtidos nos ensaios dos itens 2.4 Caracterização dos parâmetros limitantes, 2.7.1.1 Avaliação do comportamento de natação e 2.8 Ensaios com amostras ambientais foram analisados estatisticamente com o auxílio do Software TOXSTAT 3.5 (1996). A normalidade e homocedasticidade dos dados foram testadas aplicando-se o teste de Chi-quadrado e Bartlett, respectivamente. Não houve necessidade da transformação dos dados obtidos, pois os resultados passaram nos testes citados anteriormente, sendo assim para a comparação dos resultados foram aplicados os testes de Dunnett, Tukey e *T test*.

No item 2.7.1.2 Enterramento, a observação foi realizada somente para entender e descrever o perfil da espécie *H. nigra* quanto a esse comportamento, para assim entender qual é de fato a sua principal via de exposição aos contaminantes contidos na matriz sedimentar.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização dos parâmetros limitantes

Os resultados obtidos nos ensaios com diferentes salinidades e temperaturas apresentaram valores ótimos na salinidade 35 e temperatura de 20°C, onde apresentaram 95% de sobrevivência dos organismos expostos para espécie *Hyale youngi*, e salinidade 35 em temperatura de 20°C e 25°C para a espécie *Hyale nigra*, com 86% de sobrevivência. Contudo, também foram encontrados valores considerados satisfatórios entre as salinidades 30 e 40 sob as 3 temperaturas testadas (15°C, 20°C e 25°C), conforme pode ser observados nas figuras 14 e 15. Os dados brutos dos ensaios com diferentes salinidades e temperatura para ambas as espécies encontram-se descritos no apêndice I. Nas salinidades de 5, 10 e 15 não houve sobrevivência ou foram muito baixas, sendo assim, estas salinidades foram consideradas inadequadas para as espécies.

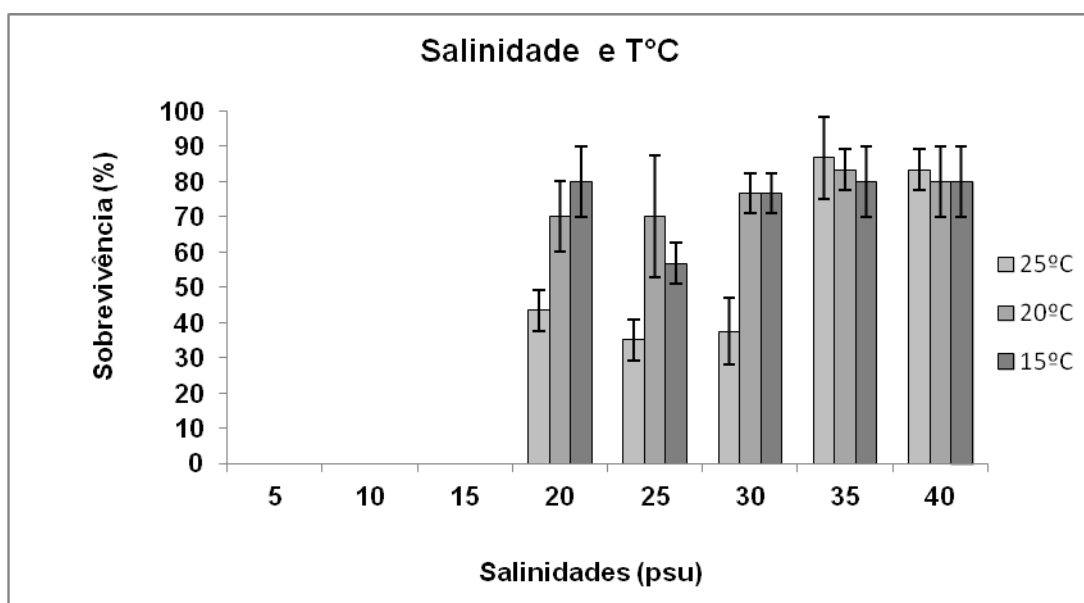


Figura 14. Valores obtidos nos ensaios de diferentes salinidades e temperaturas com o anfípode *H. nigra* (média, $\pm$ desvio padrão).

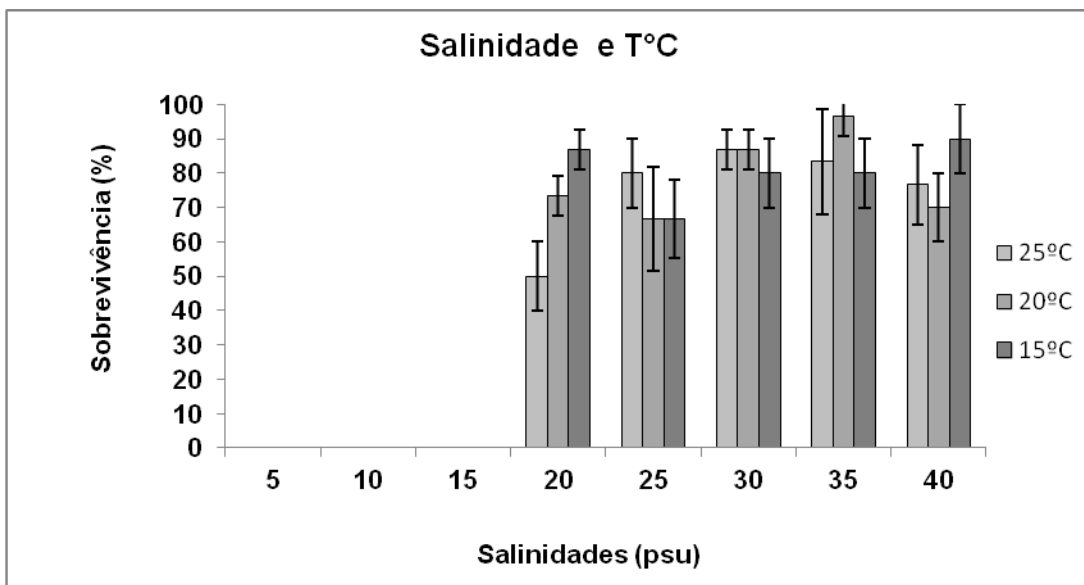


Figura 15. Valores obtidos nos ensaios de diferentes salinidades e temperaturas com o anfípode *H. youngi* (média, $\pm$ desvio padrão).

Nos ensaios com os diferentes concentrações de pH o melhor valor encontrado para o anfípode *H. youngi* foi de 90% de sobrevivência na concentração de 8,5, e para o anfípode *H. nigra* também em 8,5 com 86% de sobrevivência. Porém, os organismos apresentaram sobrevivências satisfatórias ($\geq 80\%$) em todas as condições de pH, suportando variações de pH entre 7,5 a 8,5; conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3. Resultados encontrados nos ensaios com diferentes valores de pH com os anfípodas *Hyale youngi* e *Hyale nigra*.

pH	% de sobrevivência (<i>Hyale youngi</i>)	% de sobrevivência (<i>Hyale nigra</i>)
7,5	85%	83%
8,0	85%	85%
8,5	90%	86%

Os ensaios com diferentes tamanhos de grãos apresentou resultado acima de 80% de sobrevivência no sedimento controle para *Hyale nigra*, sendo assim, foram considerados válidos. Na figura 16, é possível observar que nas frações de areia fina (AF) e areia grossa (AG) os resultados apresentaram diferenças significativas do controle ($p > 0.05$), sendo que neste houve predominância de areia média (Tabela 4). No entanto, deve-se considerar que os ensaios foram realizados em condições extremas, ou seja, 100% da fração de cada textura analisada, fato que dificilmente ocorre na natureza. Portanto, o resultado obtido no controle, onde há as diversas frações misturadas, demonstra que a espécie *H. nigra* quando não está exposta a condições extremas, apresenta tolerância aos diversos tamanhos de grãos.

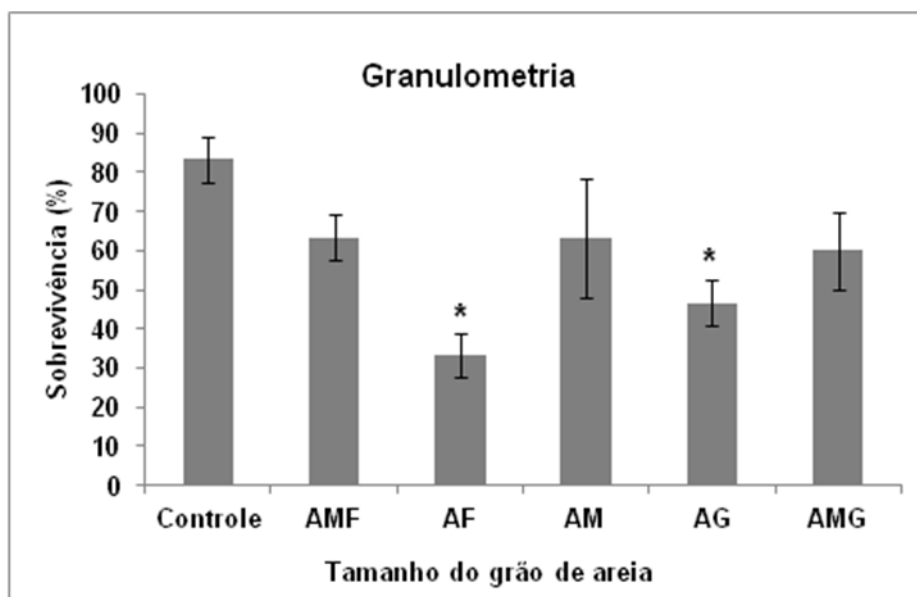


Figura 16. Valores obtidos no ensaio com diferentes granulometrias
(* = diferença significativa com controle)

Tabela 4. Caracterização do sedimento empregado como controle (Ilha das Palmas, Guarujá – SP). AMF – Areia Muito Fina; AF – Areia Fina; AM – Areia Média; AG – Areia Grossa; AMG – Areia Muito Grossa.

Controle								
CaCO ₃ (%)	M. O (%)	U (%)	Granulometria (%)					Lama
			AMG	AG	AM	AF	AMF	
7,29	1,6	22,47	4,48	19,34	62,84	5,93	0,38	2,48

3.2 Sensibilidade dos organismos-teste

3.2.1 Ensaio fase líquida

Os resultados obtidos nos ensaios com as substâncias tóxicas de referência para as espécies *H. nigra* e *H. youngi* estão descritos nas tabelas de 5 a 14 respectivamente. Conforme pode ser observado, ambas as espécies apresentaram sensibilidade constante para as diversas substâncias testadas, sendo que o dodecil sulfato de sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) foi a substância que apresentou menor variação nos resultados de letalidade para espécie *H. nigra*, com um coeficiente de variação de 17%.

Para a espécie *H. youngi* a substância de referência que demonstrou menor variação nos resultados obtidos é o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) com um coeficiente de variação de 10%.

Environment Canada (1999) recomenda que os valores dos coeficientes de variação obtidos em ensaios com substância de referência seja <40%, portanto, a maioria dos resultados obtidos no presente estudo estão dentro deste critério e podem ser observados nas tabelas abaixo.

Com os resultados obtidos observou-se que a espécie *H. nigra* apresenta para as diferentes substâncias testada uma sensibilidade ligeiramente superior quando comparada com a *H. youngi*, exceto para o cloreto de cádmio que apresentou valor médio das CL50 maior para *H. nigra*, conforme demonstra a figura 17.

Os parâmetros de qualidade da água (OD, T° C, salinidade e pH) mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis, conforme demonstrado nos itens anteriores, e conforme as normas empregadas para ensaios com anfípodes, não interferindo nos resultados dos ensaios.

No apêndice VI e VII encontram-se as cartas controle originadas a partir dos ensaios com substâncias de referência em fase líquida com os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi*, respectivamente.

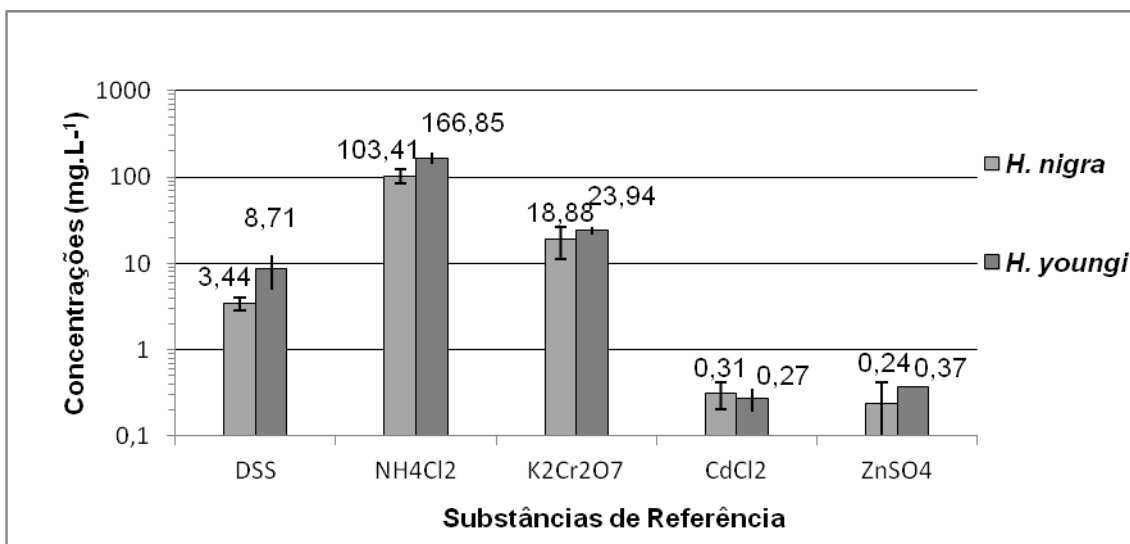


Figura 17. Resultados dos testes de sensibilidade com os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* com as substâncias de referência: dodecil sulfato de sódio, cloreto de amônia, dicromato de potássio, cloreto de cádmio e sulfato de zinco, expressos como valores médios de CL50_{96h} e seus respectivos desvios padrões.

Tabela 5. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale nigra* (mg.L⁻¹) empregando o Cloreto de Amônia como substância de referência.

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Cloreto de Amônia (NH ₄ Cl ₂)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	24/03/2012	82,05	63,10	106,70
02	16/04/2012	124,26	113,93	135,53
03	08/05/2012	103,43	83,31	128,42
04	08/05/2012	118,29	93,40	149,81
05	16/05/2012	89,06	68,39	115,98
MÉDIA		103,42	67,11	139,73
C.V%*		18	D.P**	± 18,15

Tabela 6. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale nigra* (mg.L⁻¹) empregando o Dodecil Sulfato de Sódio como substância de referência.

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Dodecil Sulfato de Sódio (C₁₂H₂₅NaO₄S)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	04/12/2011	4,38	4,02	4,78
02	13/05/2012	3,23	2,66	3,92
03	19/05/2012	2,87	2,51	3,29
04	29/05/2012	3,64	3,28	4,05
05	29/05//2012	3,12	2,81	3,47
MÉDIA		3,45	2,27	4,63
C.V%*		17	D.P**	± 0,59

Tabela 7. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale nigra* (mg.L⁻¹) empregando o Dicromato de Potássio como substância de referência.

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Dicromato de Potássio (K₂Cr₂O₇)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	22/05/2012	18,25	13,08	25,40
02	28/06/2012	19,20	14,03	26,29
03	06/07/2012	11,07	9,26	13,24
04	02/08/2012	30,98	27,41	35,02
05	13/09/2012	14,90	12,50	17,77
MÉDIA		19,88	3,38	36,37
C.V%*		41%	D.P**	±8,25

Tabela 8. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale nigra* (mg.L⁻¹) empregando o Cloreto de Cádmio como substância de referência.

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Cloreto de Cádmio (CdCl₂)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	25/06/2012	0,22	0,16	0,30
02	25/06/2012	0,20	0,13	0,31
03	29/06/2012	0,31	0,24	0,39
04	02/08/2012	0,42	0,33	0,55
05	07/08/2012	0,43	0,29	0,63
MÉDIA		0,32	0,10	0,53
C.V%*		34	D.P**	± 0,11

Tabela 9. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale nigra* (mg.L⁻¹) empregando o Sulfato de Zinco como substância de referência.

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Sulfato de Zinco (ZnSO₄)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	07/08/2012	0,51	0,41	0,62
02	13/08/2012	0,19	0,12	0,31
03	05/09/2012	0,09	0,07	0,13
04	13/09/2012	0,08	0,07	0,10
05	09/10/2012	0,35	0,33	0,38
MEDIA		0,26	-0,12	0,60
C.V%*		75	D.P**	± 0,18

Tabela 10. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale youngi* (mg.L⁻¹) empregando o Cloreto de Amônia como substância de referência
* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Cloreto de Amônia (NH₄Cl₂)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	06/07/2012	150,00	109,67	205,15
02	01/09/2012	183,71	165,16	204,32
MÉDIA		166,86	119,18	214,53
C.V%*		14	D.P**	± 23,84

Tabela 11. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale youngi* (mg.L⁻¹) empregando o Dodecil Sulfato de Sódio como substância de referência
* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Dodecil Sulfato de Sódio (C₁₂H₂₅NaO₄S)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	04/12/2011	5,07	4,60	5,58
02	25/05/2012	12,34	7,98	19,11
03	31/05/2012	7,11	5,89	8,57
MÉDIA		8,17	0,67	16,67
C.V%*		46	D.P**	± 8,20

Tabela 12. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale youngi* (mg.L⁻¹) empregando o Dicromato de Potássio como substância de referência

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Dicromato de Potássio (K₂Cr₂O₇)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	26/05/2012	21,28	17,57	25,77
02	06/07/2012	24,49	19,95	30,07
03	24/08/2012	26,07	20,55	33,07
MÉDIA		23,95	19,07	28,83
C.V%*		10	D.P**	± 2,44

Tabela 13. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale youngi* (mg.L⁻¹) empregando o Cloreto de Cádmio como substância de referência

* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Cloreto de Cádmio (CdCl₂)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	12/06/2012	0.20	0.15	0.27
02	16/06/2012	0.36	0.20	0.64
03	15/09/2012	0.27	0,17	0,43
MÉDIA		0,28	0,12	0,44
C.V%*		29	D.P**	± 0,08

Tabela 14. Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale youngi* (mg.L⁻¹) empregando o Sulfato de Zinco como substância de referência
* C.V% = Coeficiente de variação; ** D.P = Desvio padrão.

Substância de referência: Sulfato de Zinco (ZnSO₄)				
Teste	Data	CL50 -96h	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	01/09/2012	0,37	0,26	0,52

3.3 Ensaio fase sólida (sedimento artificialmente contaminado)

Os resultados dos ensaios com sedimento contaminado com cádmio demonstraram pequena variação na sensibilidade do anfípode *Hyale nigra* (C.V % = 26) e estão descritos na tabela 15 e apêndice III.

No apêndice VIII encontra-se a carta controle originada a partir dos 5 ensaios com sedimento artificialmente contaminado com cádmio.

Tabela 15. Resultados dos ensaios com sedimento contaminado com o anfípode *Hyale nigra* (mg.Cd/kg).

Substância de referência: Cádmio (Cd)				
Teste	Data	CL50 -10d	Lim. Inf. (95%)	Lim. Sup. (95%)
01	29/12/2012	6.46	5.19	8.09
02	25/01/2013	4.90	3.39	7.07
03	28/01/2013	6.17	4.34	8.77
04	01/02/2013	7.51	5.62	10.04
05	04/02/2013	3.59	2.16	5.97
MÉDIA		5.73	1.51	8,75

3.3.1 Comportamento dos organismos-teste

3.3.1.1 Natação

Os resultados obtidos nos ensaios para avaliar o comportamento em relação à natação dos anfípodes da espécie *Hyale nigra* foram analisados a partir da porcentagem de mobilidade. Conforme pode ser observado nas tabelas 16 e 17 houve muita variação nos resultados obtidos, não havendo um padrão de mobilidade nas concentrações testadas, porém embora estatisticamente só tenha indicado diferença significativa em uma ocasião, notou-se um aumento na mobilidade dos organismos expostos na maior concentração em ambos os ensaios tanto na natação horizontal como também na vertical.

Tabela 16. Resultados dos ensaios para avaliar a natação horizontal do anfípode *H. nigra*.
(* diferença significativa, Dunnets).

Concentrações	Percentual de mobilidade (%)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Controle	11,66	33,66
1mg	58,83	52,16
2mg	26,33	46,66
4mg	74,5*	101,83

Tabela 17. Resultados dos ensaios para avaliar a natação vertical do anfípode *H. nigra*.

Concentrações	Percentual de mobilidade (%)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Controle	32,5	42,66
1mg	26,83	53,16
2mg	41,83	38,6
4mg	103,5	96,34

3.3.1.2 Enterramento

Com os resultados obtidos nesta etapa do estudo foi possível observar que não há diferença no comportamento dos organismos-teste em relação ao gradiente de contaminação em que foram expostos, pois os organismos se apresentaram de forma semelhante em todas as concentrações analisadas, incluindo o controle.

Não foram observados hábitos escavadores nos anfípodes da espécie *Hyale nigra* durante os ensaios com sedimento-marcado, sendo assim, foi observado um teste de evitamento (*avoidance test*). Notou-se que os organismos-teste tendem em sua grande maioria (acima de 90% dos indivíduos presentes nos frascos) a permanecer fixados nas telas de *nylon*, e eventualmente encontram-se nadando sobre a coluna d'água (3%) ou sob o substrato (7%).

3.4 Ensaios de toxicidade com amostras ambientais

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com sedimento integral (Fig. 18) e elutriato (Fig. 19) com a espécie *Hyale nigra* comprovaram o potencial desse anfípode para avaliar a toxicidade de sedimentos em diferentes vias de exposição.

O P4 considerado como ponto controle, foi o que apresentou maior percentual de sobrevivência, e o P2 e P3 foram os considerados os pontos mais críticos tanto no ensaio com sedimento integral, como também no tratamento elutriato.

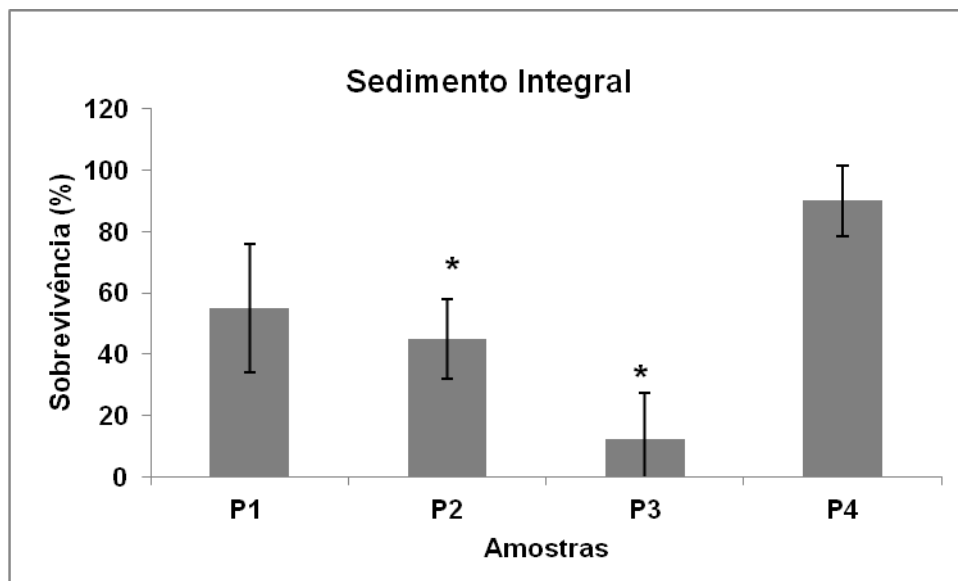


Figura 18. Resultados médios dos ensaios com amostras ambientais
(* = diferença significativa; $p = 0.05$).

Na tabela 18 encontram-se os valores de granulometria, matéria orgânica, carbonato de cálcio e amônia obtidos em cada um dos pontos de amostragem. Nota-se que a quantidade de amônia total do P2 ($1,47 \text{ mg.L}^{-1}$) foi o maior valor encontrado entre os pontos.

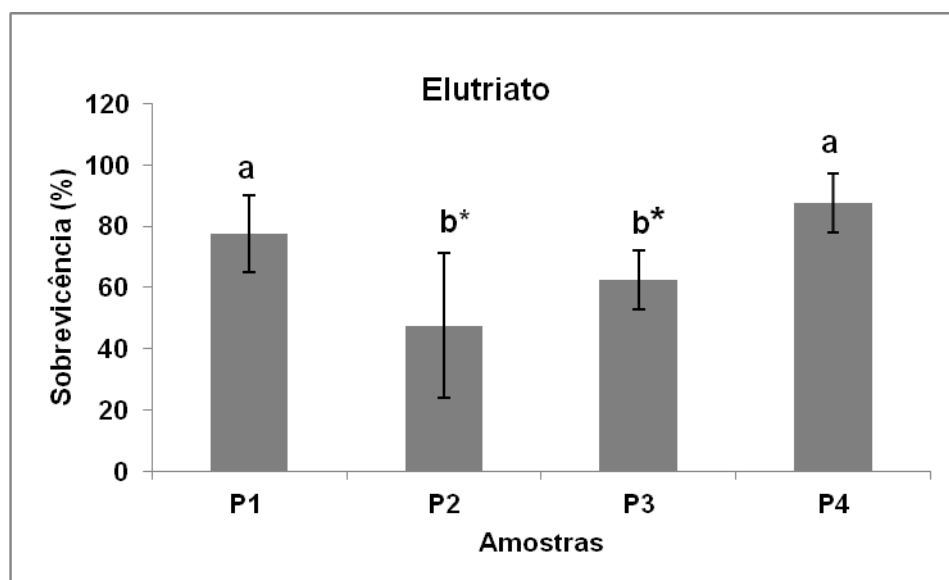


Figura 19. Resultados médios dos ensaios com o tratamento elutriato
(* = diferença significativa; $p = 0,05$). Letras diferentes correspondem diferenças significativas (pTukey $<0,01$).

Tabela 18. Caracterização das amostras de sedimento coletadas no estuário e baía de Santos –SP. AMF – Areia Muito Fina; AF – Areia Fina; AM – Areia Média; AG – Areia Grossa; AMG – Areia Muito Grossa.

Amostras	CaCO ₃ (%)	NH ₄	M. O (%)	Granulometria (%)					
				lama	AMF	AF	AM	AG	AMG
P1	5,58	0,98	11,09	52,57	12,75	6,35	6,17	2,33	3,84
P2	5,03	1,47	8,56	91,40	5,45	0	1,58	0,04	0,09
P3	4,31	0,49	3,5	87,78	5,31	0,80	0,69	0,31	0,33
P4	7,29	0,56	1,6	2,48	0,38	5,93	62,84	17,30	4,01

4. DISCUSSÃO

Os anfípodes são considerados ótimos indicadores da qualidade ambiental, uma vez que estes organismos são sensíveis a diversos tipos de contaminantes presentes nos ambientes aquáticos. Por esse motivo, são frequentemente selecionados como organismos-teste para avaliar a toxicidade de amostras de sedimentos (ANDERSON *et al.*, 2008; BERTOLETTI, 2011; CARRETERO *et al.*, 2012).

Tendo em vista o aumento progressivo das atividades antrópicas que geram impactos aos ecossistemas, destaca-se a necessidade da implementação de programas de monitoramento ambiental que contemple espécies aquáticas nativas destes ecossistemas.

De acordo com Arezon (1996), tal fato reside principalmente em dois aspectos: primeiro no impacto direto ou indireto, que a introdução intencional ou não de uma espécie exótica teria sobre a dinâmica ambiental; segundo, na qualidade da resposta que uma espécie autóctone poderia fornecer, já que em geral, sua condição ideal de cultivo, bem como as condições de realização dos testes, estão próximas das características ambientais. O uso de espécies autóctones, adaptadas às características ambientais, certamente poderia prover resultados muito mais próximos da realidade do que os resultados obtidos com espécies exóticas.

Dessa forma, o desenvolvimento de um protocolo para aplicação em ensaios toxicidade com sedimento empregando anfípodes epibentônicos marinhos (*Hyale nigra* e *Hyale youngi*) permitirá, além de uma maior compreensão da qualidade ambiental dos sistemas litorâneos, em especial àquele influenciados por atividades poluidoras, como também gerará subsídios para as próximas revisões das normas ABNT NBRs 15638/2008; 15470/2007.

4.1 Caracterização dos parâmetros limitantes

Identificar e caracterizar o limiar das espécies em relação aos diversos parâmetros físico-químicos e sedimentológicos é de extrema importância, pois contribui para o entendimento de possíveis fatores que podem interferir na interpretação dos dados (*confounding factors*), e diminuir a possibilidade de falsos-negativos e falsos-positivos na aplicação de ensaios com estes organismos.

Segundo Serejo (2001), anfípodes das espécies *H. nigra* e *H. youngi* encontram-se distribuídos nos estados da Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo, predominantemente associados às macroalgas presentes em costões rochosos. Entre os anos de 1972 a 1997 foi observado um aumento temporário na abundância de espécimes de *Hyale* na região sudeste do Brasil, estando relacionado com a substituição de espécies menos tolerantes por espécies mais generalistas, como *H. nigra* (LEITE *et al.*, 2000). Contudo, essa tolerância relatada pelos autores está relacionada ao comportamento oportunista tipicamente presente em espécies que habitam regiões costeiras, uma vez que estão expostas a variações de pressão das marés, além de choques osmóticos e térmicos.

Dois são os fatores que influenciam na reprodução dessas espécies: 1) temperatura (KINNE, 1961; FISH & PREECE, 1970; BARNETT, 1971); 2) fotoperíodo (WILLIAMS, 1978; STEELE *et al.*, 1977; STEELE, 1981), além da possibilidade da interação destes fatores com outros, como por exemplo a disponibilidade de alimentos e abrigo.

Os resultados prévios obtidos nos ensaios de caracterização dos parâmetros físico-químicos demonstraram que ambas as espécies (*H. nigra* e *H. youngi*) apresentam tolerância às condições ambientais (salinidade, temperatura e pH) correspondente aos valores médios encontrados de forma natural nos ecossistemas litorâneos brasileiros, tipicamente marinhas e tropicais a subtropicais, suportando em geral variações entre 30 a 40 de salinidade, 20°C a 25°C e pH entre 7,5 e 8,5. No entanto, deve-se considerar tanto as

flutuações na ocorrência desses parâmetros de forma natural, como também a adaptação fisiológica das espécies às condições dos ambientes onde vivem.

No caso do anfípode *Rhepoxynius abronius*, presente em toda a costa oeste da América do Norte, a faixa de valores indicados como adequados varia de 25 a 35 de salinidade sob $15^{\circ}\text{C} \pm 2$ (USEPA, 1994). Contudo, em um estudo realizado por Lamberson *et al.*, (1992) foi otimizado para a execução dos ensaios uma temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, o que demonstra que a espécie *R. abronius* possivelmente se adapta às variações de temperaturas presentes nos ambiente onde vivem. A ABNT NBR 15638/2008 cita as condições apropriadas para os ensaios com espécies de anfípodes marinhos ou estuarinos que são padronizadas, dentre elas, destaca-se as espécies que geralmente são empregadas em ensaios de toxicidade no Brasil: *Leptocheirus plumulosus* e *Tiburonella viscana*. Para a espécie exótica *L. plumulosus* a faixa de salinidade adequada varia de 1,5 a 32, já a espécie nativa *T. viscana* não suporta tanta variação, apresentando tolerância entre 26 a 36 de salinidade, sob $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ para ambas as espécies. No entanto, deve-se considerar que *L. plumulosus* são anfípodes encontrados em sedimentos finos de regiões estuarinas da costa leste da América do Norte (BOUSEFIELD, 1973), e não uma espécie que esteja adaptada às condições dos sistemas litorâneos brasileiros.

Para a validação de espécies a serem empregadas em ensaios de toxicidade com sedimentos é de extrema importância que seja observado a tolerância das mesmas aos diferentes tamanhos de partículas granulométricas, pois este fator pode influenciar diretamente nos resultados dos ensaios.

Estudos pretéritos já demonstraram que o coeficiente de variação dos resultados para espécies de anfípodes está fortemente relacionado com as frações de sedimento, principalmente em relação à quantidade de silte+argila presentes na amostra (MELO & NIPPER, 2007; SOUSA *et al.*, 2007; CHOUERI *et al.*, 2009 BERTOLETTI, 2011). Em Bertolletti (2011), há uma extensa discussão quanto a essa influência sobre os resultados de ensaios de toxicidade para algumas espécies de anfípodes e indica como melhor maneira

para avaliar esses resultados, empregar também nas análises estatísticas o coeficiente de determinação (r^2).

Para os anfípodes norte-americano *Leptocheirus plumulosus* e *Eohaustorius estuarius*, por exemplo, este não é um fator que interfere nos resultados obtidos, pois esses anfípodes apresentam tolerância às diversos tamanhos de grãos (USEPA, 1994). No entanto, como resposta a inadequada distribuição dos tamanhos das partículas pode ocorrer uma redução tanto no crescimento como também na sobrevivência em outras espécies (MELO & NIPPER, 2007).

Os resultados prévios dos ensaios com diferentes frações de granulometrias demonstraram que o anfípode *H. nigra* apresenta tolerância à 3 diferentes frações de grãos de areia testados AMF (areia muito fina) AM (areia média) e AMG (areia muito grossa). Contudo, conforme já mencionado, deve ser considerado que as condições empregadas nos ensaios foram de 100% de cada tipo de fração. Sendo assim, no sedimento controle embora tenha sido observado predominância de areia média, houve a presença de 19,34% de AG (areia grossa) e 5,96% de AF (areia fina), o que evidência que a espécie pode apresentar uma boa sobrevivência em sedimentos que apresentam misturas de diferentes frações granulométricas.

Embora não tenham sido realizados ensaios com diferentes concentrações de matéria orgânica, é importante destacar que tal parâmetro sedimentológico é essencial para a validação de espécies a serem empregadas para avaliar a toxicidade de sedimento, pois assim como a granulometria, este fator pode interferir diretamente nos resultados dos ensaios. Segundo Cesar (2003), anfípodes que apresentam tolerância à amônia, como *G. aequicauda*, tendem a suportar elevados teores de matéria orgânica, uma vez que este composto químico é resultado do processo de decomposição e estão diretamente ligados entre si. Dessa forma, cabe ressaltar a possibilidade deste fator também não interferir significativamente nos resultados dos ensaios com os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi*, pois nos valores obtidos nos ensaios de sensibilidade

empregando amônia (NH_4Cl_2) como substância de referência foi observada a tolerância desses organismos a este composto químico.

4.2 Sensibilidade dos organismos-teste (Fase líquida)

A amônia (NH_3 e NH_4) é um composto químico que ocorre de forma natural nos ecossistemas aquáticos, principalmente nos ambientes marinhos e estuarinos. Porém, se em altas concentrações, este agente químico torna-se extremamente tóxico e pode levar a morte de diversos organismos aquáticos. Sendo assim, para excluir a possibilidade de confundir a real causa da mortalidade e/ou comprometimento da reprodução e desenvolvimento de um organismo-teste, é fundamental que se saiba a tolerância do mesmo a este composto.

Com os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade com amônia (NH_4Cl_2), notou-se que os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* apresentaram valores médios das $\text{CL}_{50_{96h}}$ de $103,42 \text{ mg.L}^{-1}$ e $166,86 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, sendo similares aos valores encontrados para as espécies *Eohaustorius estuarius* de $125,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e *Grandidierella japonica* de $148,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (KOHN *et al.*, 1994). No entanto, tais valores demonstraram também uma menor sensibilidade dos organismos empregados no presente estudo (*H. nigra* e *H. youngi*) à amônia quando comparados aos valores encontrados para os anfípodes *Gammarus aequicauda* ($49,68 \text{ mg.L}^{-1}$) *Rhepoxynius abronius* ($78,7 \text{ mg.L}^{-1}$) e *Ampelisca abdita* ($49,8 \text{ mg.L}^{-1}$) (CESAR *et. al.*, 2002; KOHN *et al.*, 1994).

De acordo com Russo (1985), a amônia não ionizada é a principal forma nitrogenada que causa efeitos tóxicos a organismos aquáticos. Dessa forma, a ABNT NBR 15638/2008 recomenda a análise da amônia não ionizada nos ensaios de toxicidade com sedimento integral, a fim de evitar que esse agente químico seja um interferente nos resultados obtidos.

Neste contexto, os resultados obtidos com os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* pode ser vantajoso para aplicação destes organismos-teste em amostras

estuarinas ou com níveis elevados de matéria orgânica, visto que amostras com estas características costumam apresentar altos níveis de amônia, e tal fato não seria um fator interferente para os resultados obtidos com estas espécies.

Para o dodecil sulfato de sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), cloreto de cádmio ($CdCl_2$), e sulfato de zinco ($ZnSO_4$) os valores estimados neste trabalho para os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* também estão dentro das faixas indicadas na literatura para outras espécies, sendo o resultado médio para o surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio com o anfípode *H. nigra* bastante similar com o valor estimado para a espécie nativa *Tiburonella viscana* ($3,41 \text{ mg.L}^{-1}$) (MELO & NIPPER, 2007). Além disso, foi a substância que apresentou menor variação dos resultados de letalidade e se mostrou mais apropriada para avaliar a sensibilidade da espécie *H. nigra*.

A tabela 19 apresenta os resultados das CL50 encontrados em ensaios com substância de referência, tanto na literatura para diferentes espécies de anfípodes, como para as espécies empregadas no presente estudo.

Para o cádmio ($CdCl_2$) os valores médios das CL50 foram de $0,32 \text{ mg.L}^{-1}$ para *H. nigra* e $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$ para *H. youngi*, equivalendo com os valores encontrados para os anfípodes *Corophium multisetosum*, *Corophium insidiosum* e *Gammarus aequicauda* de $0,31 \text{ mg.L}^{-1}$, $0,35 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente (RÉ *et al.*, 2009; PRATO *et al.*, 2006). Entretanto, também foram encontrados valores mais elevados para os anfípodes *Corophium insidiosum* estimado em $1,68 \text{ mg.L}^{-1}$ e *Corophium orientale* em $3,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (PICONE *et al.*, 2008; PRATO & BIANCOLINO, 2006).

Embora o coeficiente de variação dos resultados dos ensaios com cloreto de cádmio para as espécies *H. nigra* e *H. youngi* tenha sido relativamente alto (34% e 29%) quando comparado às outras substâncias empregadas no estudo, os valores das concentrações de efeito foram comparáveis aos de outros anfípodes já padronizados, o que demonstra a eficiência dessa substância para avaliar a sensibilidade das referidas espécies.

Tabela 19. Valores das CL50 obtidos no estudo e reportados na literatura para outras espécies de anfípodes marinhos. a) CL50_{96h}; b) CL50_{48h}.

Espécies	Substâncias de Referência (mg.L ⁻¹)					Autores
	NH ₄ Cl ₂	DSS	CdCl ₂	K ₂ Cr ₂ O ₇	ZnSO ₄	
<i>H. nigra</i> ^{a)}	103,42	3,45	0,32	19,88	0,26	Em estudo
<i>H. youngi</i> ^{a)}	166,85	8,47	0,27	23,95	0,37	Em estudo
<i>T. viscana</i> ^{b)}	-	3,41	-	9,8	0,79	Melo & Nipper, 2007
<i>G. aequicauda</i> ^{b)}	49,68	5,56	0,26	9,52	-	Cesar <i>et al.</i> , 2004
<i>M. gryllotalpa</i> ^{b)}	35,54	2,98	-	6,06		Cesar <i>et al.</i> , 2004
<i>C. multisetosum</i> ^{a)}	-	-	0,31	-	-	Ré <i>et al.</i> , 2009
<i>C. insidiosum</i> ^{a)}	-	-	0,35	-	-	Prato <i>et al.</i> , 2006
<i>C. orientale</i> ^{a)}	-	-	3,3	-	-	Picone <i>et al.</i> , 2008

Atualmente, a fim de evitar possíveis riscos à saúde pública e preservar a integridade dos ecossistemas, a substância tóxica de referência dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) não tem sido comumente indicada para avaliar a sensibilidade de organismos-teste em ensaios de toxicidade, devido à alta toxicidade que o cromo apresenta em sua forma hexavalente. Contudo, esta substância de referência foi intensamente empregada para avaliar a sensibilidade de anfípodes nos últimos anos (ARAUJO, 1996; ABESSA *et al.*, 1998; ABESSA *et al.*, 2003; ABESSA, 2002; CESAR *et al.*, 2002; CESAR *et al.*, 2004).

No presente estudo optou-se em utilizar esta substância de referência para efeito comparativo com resultados das concentrações de efeito encontrados para outras espécies de anfípodes. Conforme já mencionado, os resultados das CL50 obtidas nos ensaios com dicromato de potássio para a espécie *H. youngi* foram os que apresentaram menor variação (CV=10%), com o valor médio de 23,95 mg.L⁻¹, já para a espécie *H. nigra* a média foi estimada em 19,88 mg.L⁻¹.

Para as espécies de anfípodes do Mediterrâneo *Gammarus aequicauda* e *Microdeutopus gryllotalpa* os valores encontrados foram de 5,52 mg.L⁻¹ e 6,06 mg.L⁻¹ respectivamente (CESAR *et al.*, 2002). Já para a espécie nativa *Tiburonella viscana* os valores encontrados apresentam um intervalo de confiança entre 3,27 mg.L⁻¹ e 18,75 mg.L⁻¹. (ABESSA *et al.*, 1998; ABESSA *et al.*, 2003; ABESSA, 2002).

Diante dos resultados encontrados na literatura para outras espécies de anfípodes, nota-se que as espécies *H. nigra* e *H. youngi*, apresentam-se ligeiramente mais tolerantes ao dicromato de potássio. Entretanto, esta constatação não deve interferir na validação dos anfípodes objeto deste estudo, pois o baixo valor do coeficiente de variação demonstra que tal tolerância não influencia na variabilidade e constância dos resultados de sensibilidade.

A maioria dos resultados encontrados na literatura com a substância de referência sulfato de zinco (ZnSO₄), para anfípodes, indica relação entre a bioacumulação deste metal nestes organismos (BAT *et al.*, 1998; CLASON *et al.*, 2004; RAINBOW & LUOMA, 2011; OTHMAN & PASCOE, 2007). Os anfípodes *H. nigra* e *H. youngi* apresentaram resultados das CL50_{96h} de 0,26 mg.L⁻¹ e 0,37 mg.L⁻¹, respectivamente, sendo relativamente próximos ao valor da CL50 reportado na literatura para *T. viscana* estimado em 0,79 mg.L⁻¹ (MELO & NIPPER, 2007).

King *et al.*, (2006), avaliaram a sensibilidade ao zinco das espécies: *Chaetocorophium lucasi*, *Corophium colo*, *Grandidirella japônica*, *Hyale longicornis*, *Melita awa*, *Melita matilda* e *Melita plumulosa*, em fase adulta (10-d) e juvenil (96h), onde observaram o resultado mais sensível para juvenis de *H. longicornis* estimado em $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, e para adultos dessa mesma espécie o valor foi estimado em $0,19 \text{ mg.L}^{-1}$. Entre as espécies estudadas por King *et al.*, (2006) o anfípode *C. colo* apresentou o resultado mais tolerante ao zinco, de $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$, quando comparado com *H. nigra* e *H. youngi*.

Os resultados obtidos demonstraram que ambas as espécies (*H. nigra* e *H. youngi*) apresentam sensibilidade ao sulfato de zinco (ZnSO_4) comparável a encontrada para outros anfípodes marinhos, e indicam mais uma opção de substância tóxica de referência para ser empregada com esta finalidade para as espécies em estudo, além de confirmar a sensibilidade e, portanto, o potencial das mesmas para aplicação em ensaios de toxicidade.

4.3 Sedimento artificialmente contaminado

Para a validação de espécies para serem empregadas em ensaios de toxicidade para avaliar a qualidade dos sedimentos é interessante conhecer a sensibilidade desses organismos a contaminantes presentes nesta matriz ambiental, uma vez que estes estarão sendo aplicados com esta finalidade nos ensaios.

A realização de ensaios de toxicidade empregando a técnica de sedimento artificialmente contaminado tem se mostrado cada vez mais eficaz nos últimos anos, pois através desses ensaios é possível estimar as concentrações de compostos químicos, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, que possam causar algum efeito adverso à biota. Além disso, os resultados obtidos a partir de estudos que aplicam essa técnica podem servir como parâmetro para avaliar se os valores estipulados nos guias orientadores da qualidade dos sedimentos conferem com as concentrações de efeito aos organismos aquáticos.

A média dos resultados das CL50 obtidas com a espécie *Hyale nigra* (5,73 mg Cd/kg) demonstrou similaridade com o valor obtido para o anfípode de água doce *Hyalella curvispina* (5,6 mg Cd/kg) (GIUSTO *et al.*, 2012).

A nova Resolução Conama nº454/2012 (BRASIL, 2012) recomenda avaliar a toxicidade para anfípodes empregando a CL50 (concentração letal a 50% dos organismos expostos) e estabelece valores guias para diversos contaminantes presentes na matriz sedimentar em regiões sujeitas a dragagens e de disposição de sedimento. No entanto, em Abessa *et al.*, 2006 há um questionamento quanto a esses valores guias, já que tais foram baseados seguindo protocolos norte-americanos e canadenses (ENVIRONMENTAL CANADA, 1999; McDONALD *et al.*, 1996), sem a realização de um estudo demonstrando se esses valores são aplicáveis para os sedimentos brasileiros. Seguindo este raciocínio, os resultados obtidos no presente estudo para o anfípode *H. nigra* nos ensaios com sedimento contaminado indicaram uma maior sensibilidade da espécie (CL50_{96h} de 5,73 mg Cd/kg) quando comparado com o limite estabelecido para o cádmio (7,2 mgCd/kg) em Brasil (2012). Portanto, é necessário a realização de ensaios com sedimento-marcado com cádmio com outras espécies aquáticas, a fim de avaliar a sensibilidade das mesmas a este contaminante e rever o valor exigido pela legislação, buscando um valor que condiz com a realidade de organismos nativos de regiões tropicais e os proteja de forma eficaz.

4.4 Comportamento dos organismos-teste

Atualmente, a maioria dos estudos realizados para avaliar a contaminação de sedimentos marinhos estão relacionados à toxicidade aguda, onde a resposta do organismo ao contaminante é muita das vezes irreversível (ANDERSON *et al.*, 1997; CORREIA & COSTA, 2000; CESAR *et al.*, 2006; CESAR *et al.*, 2009; BERTOLETTI *et al.*, 2011). Por outro lado, alguns pesquisadores apresentaram o interesse em avaliar a toxicidade crônica em ensaios com sedimentos marinhos, uma vez que os organismos bentônicos que vivem em sedimentos

contaminados estão expostos a estes agentes tóxicos frequentemente (CLASON *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2010). Dessa forma, empregar ensaios de toxicidade crônico em organismos bentônicos demonstra ser vantajoso no sentido que avaliar efeitos comportamentais, além de ser menos severo, normalmente também apresenta uma situação reversível.

4.4.1 Natação

Avaliar alterações no comportamento de natação de organismos aquáticos pode auxiliar na compreensão do efeito que um contaminante possa estar causando neste ainda em nível fisiológico, e não observando diretamente a mortalidade, onde a situação muitas vezes é irreversível. Segundo Boudrias (1991), mudanças no comportamento de natação vertical e horizontal dos organismos estão relacionadas com a sensibilidade na dinâmica de fluidos e gastos energéticos.

Com os resultados obtidos foi possível observar que os organismos empregados na maior concentração testada (4 mgCd) demonstraram maior mobilidade do que os empregados nas outras concentrações. Entretanto, o anfípode *Gammarus lawrencianus* demonstrou uma queda nos movimentos de natação horizontal e vertical conforme as concentrações de cádmio presentes no tecido dos organismos foram aumentando (WALLACE & ESTEPHAN, 2004). Contudo, foi relatado em alguns trabalhos com peixes e ratos que o cádmio é um contaminante que causa efeitos neurotóxicos (BEAUVAIS *et al.*, 2001; WONG & KLAASSEN, 1982), o que pode explicar os resultados obtidos no presente estudo.

Segundo Beauvais *et al.*, (2001), a avaliação da contaminação neurotóxica de um contaminante esta diretamente relacionada a um conjunto de medidas integradas que podem ser observadas a partir de análises neuroquímicas tais como, a colinesterase (acetil-colinesterase) e, conseqüentemente ocasionando efeitos comportamentais, como o aumento na velocidade da natação.

Portanto, necessita-se de uma maior investigação para essa avaliação, pois o aumento na movimentação da espécie *H. nigra* pode ser resultado da ação neurotóxica do cádmio, inibindo a neurotransmissora acetilcolina, impedindo assim que o neurônio colinérgico retorne a seu estado de repouso após a ativação.

4.4.2 Enterramento

Organismos com hábitos epibentônicos normalmente vivem associados ao fundo oceânico, em contato direto com o substrato, mas também apresentam a capacidade de se mover com facilidade na interface sedimento-água.

Como já mencionado na descrição do organismo-teste (item 2.1), anfípodes da espécie *Hyale nigra* tendem a viver associados às macrófitas da região entre marés do costão rochoso, e estão sujeitas a alterações das pressões de marés diariamente.

Embora não tenham sido observados hábitos escavadores nos ensaios com *H. nigra*, e sim uma tendência dos organismos em permanecerem fixados nas redes de *nylon*, nas coletas de campo eventualmente foram observados espécimes de *H. nigra* enterrados na areia que havia próximo as algas, o que indica que este comportamento pode ocorrer dependendo da situação em que o organismo se encontra.

Empregar um organismo com hábitos epibentônicos em ensaios de toxicidade para avaliar a qualidade de sedimento proporcionará, portanto uma resposta de um possível efeito que um contaminante contido nessa matriz possa causar nesses organismos, uma vez que estão sujeitos as diferentes vias de exposição. Além disso, também podem ser empregados para analisar amostras líquidas, como por exemplo, de efluentes industriais.

Normalmente ensaios de toxicidade empregando anfípodes marinhos são realizados com espécies de hábitos escavadores, como por exemplo,

Tiburonella viscana, *Leptocheirus plumulosus*, *Corophium volutator*, dentre outros (SCHIPPER *et al.*, 1999; MELO & NIPPER, 2007; BERTOLETTI *et al.*, 2011). No entanto, existem outras espécies com hábitos distintos que são padronizadas, como por exemplo, *Gammarus aequicauda*, *Ampelisca abdita*, dentre outras (CESAR *et al.*, 2004; USEPA, 1994).

A norma brasileira ABNT NBR 15470/2007 estabelece um protocolo para a realização de ensaios de toxicidade em sedimento com espécies epibentônicas de hábitos dulcícolas (*Hyalella sp*), a qual a metodologia empregada é basicamente a mesma aplicada no presente estudo, salvo algumas adaptações quanto a quantidade de amostra utilizada e idade dos organismos-teste.

Portanto, da mesma forma que houve a padronização de anfípodes epibentônicos de água doce, o presente estudo demonstra que há a possibilidade de padronizar anfípodes epibentônicos marinhos do gênero *Hyale*, proporcionando como já mencionado anteriormente, novas opções de organismos-teste para serem empregadas em ensaios de toxicidade. Além disso, conclui-se que a principal via de exposição para o anfípode *H. nigra* é o interface sedimento-água, sendo esta uma rota de grande importância em ensaios de toxicidade com sedimento, pois é o local onde ocorrem as trocas dos contaminantes contidos nesta matriz com coluna d'água.

4.5 Ensaios de toxicidade

O Sistema Estuarino de Santos é considerado hoje um dos cenários mais importantes do litoral nacional, não só por abrigar o maior porto da América Latina, mas também por sua relevância ecológica, uma vez que é um ambiente com predominância de vegetação de manguezal e serve de refúgio e abrigo para muitas espécies, tanto de importância comercial, como ecológica.

No entanto, estudos realizados nos últimos anos demonstraram que a região encontra-se ecologicamente comprometida, devido a altos níveis de contaminação presentes na área (LAMPARELLI *et al.*, 2001; ABESSA, 2002 e

CESAR, *et al.*, 2006; 2007; 2009). A maioria dos autores relacionam que o sistema estuarino de Santos é afetado por um conjunto de fontes poluidoras, como: a) a presença de diversas indústrias, tais como, petroquímicas, de aços e fertilizantes; b) o crescimento desordenado da população, que lançam seus efluentes domésticos e esgotos diretamente no estuário, sem o devido tratamento e c) a atividade portuária, o qual faz com que a região seja submetida por processos de dragagem constantemente.

Os pontos escolhidos para o presente estudo foram os considerados mais críticos do Estuário de Santos, exceto o P4, área considerada como ponto controle do estudo. Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade para a espécie *Hyale nigra* tanto com sedimento integral, como com elutriado, corroboram aos obtidos em Abessa (2002) e Cesar *et al.* (2006; 2007 e 2009). para o anfípode *Tiburonella viscana*.

De acordo com Lamparelli *et al.*, (2001), entre os contaminantes que provocaram a toxicidade da área de estudo, destacaram-se: cloro, detergentes, amônia, enxofre e mercúrio, correlacionando em partes com os resultados indicados por Abessa (2002) e Cesar *et al.*, (2009), que atribuíram também a toxicidade para outros metais, como, por exemplo, o arsênio e o cobre.

Prósperi (2002) realizou ensaios nesta mesma área de estudo com água intersticial e interface sedimento-água empregando embriões de *Lytechinus variegatus* para avaliar possíveis efeitos tóxicos. Como resultados obtidos foi observado efeito tóxico próximo aos pontos P2 e P3 nos ensaios com água intersticial, este efeito foi relacionado pela autora com a alta concentração de metais encontrada no local. Já nos ensaios com interface sedimento-água não foram observados efeitos tóxicos em nenhum dos pontos analisados no presente estudo.

Embora os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com *H. nigra* seja similares aos valores reportados na literatura, a espécie estudada demonstrou ser ligeiramente mais tolerante aos contaminantes quando comparada com *T. viscana*. No entanto, essa diferença na sensibilidade das espécies é

insignificante, pois os valores obtidos para *H. nigra* confirmaram os encontrados para *T. viscana*. Além disso, a espécie *H. nigra* por apresentar hábitos epibentônicos, proporciona a possibilidade de ser utilizado para avaliar diferentes vias de exposição, o que foi comprovado no ensaio com elutriato.

As vias de exposição para os organismos bentônicos e epibentônico ocorrem através do contato com a água intersticial, da água localizada logo acima do sedimento, através das paredes do corpo e superfície respiratória ou da ingestão de partículas de sedimento contaminado (ADAMS *et al.*, 1985). Sendo assim, levando em consideração as observações do comportamento de enterramento dos organismos-teste (item 4.4.2) e os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade, conclui-se que o anfípode *H. nigra* pode ser afetado por diversas vias de exposição a um contaminante, como, por exemplo, pela ingestão de uma partícula de sedimento contaminado, ou através da água presente na interface sedimento-água.

A nova Resolução Conama nº454/2012 (www.mma.gov.br/conama) exige em complementação das análises químicas, ensaios de toxicidade com amostras de sedimento integral com anfípodes e interface sedimento-água com equinoides. A validação de um organismo-teste que possa ser exposto nessas duas vias de exposição, como o anfípode *Hyale nigra*, pode, portanto, constituir como uma nova opção a ser considerada nos ensaios de toxicidade contemplados nessa Resolução, uma vez que sua resposta atende aos principais quesitos para a escolha de um bom organismo-teste.

5. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que as espécies nativas *Hyale nigra* e *Hyale youngi* apresentam hábitos tipicamente marinhos e tropicais, com ótimos resultados de sobrevivência variando entre salinidades 30 – 40, 20°C - 25°C de temperatura e 7,5 - 8,5, de pH;
- O anfípode *Hyale nigra* apresenta tolerância aos diferentes tamanhos de frações granulométricas (areia muito fina, areia média e areia muito grossa), contudo apresentou maior sensibilidade nas frações de areia fina e areia grossa;
- Nos ensaios com as substâncias tóxicas de referência, os resultados indicaram que os anfípodes empregados neste estudo possuem sensibilidade aos diferentes compostos testados, comparáveis com outras espécies consideradas sensíveis.
- Para as diversas substâncias de referência avaliadas o anfípode *H. nigra* apresentou sensibilidade ligeiramente maior do que *H. youngi*, exceto para o cloreto de cádmio, que mostrou-se mais tóxico para essa última;
- Ambas as espécies apresentam maior tolerância a amônia (NH_4Cl_2) e ao dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) quando comparadas a outros anfípodes marinhos reportados em outros estudos.
- Os resultados obtidos demonstraram a boa sensibilidade das espécies (*Hyale nigra* e *Hyale youngi*) a todas as substâncias de referência testadas, e conseqüentemente, o potencial de aplicação em ensaios de toxicidade;
- Nos ensaios com sedimento-marcado com cádmio foi possível observar que os resultados obtidos para o anfípode *Hyale nigra* corroboram com o valor encontrado para *Hyalella curvispina*;

- Os resultados dos ensaios de toxicidade com amostras ambientais apresentaram-se semelhantes aos encontrados para outras espécies de anfípodes na literatura;
- Os valores encontrados para *H. nigra* nos ensaios de toxicidade com amostras ambientais comprovam seu potencial como mais uma opção de organismo-teste para ser empregada em ensaios de toxicidade, pois foram similares aos reportados na literatura para esta área de estudo;
- O fato dos anfípodes apresentarem hábitos epibentônicos aumenta as possibilidades de exploração de diferentes abordagens de exposição e, portanto, contribui com o estabelecimento de uma nova metodologia.

6. RESULTADOS ALCANÇADOS

6.1 Trabalhos apresentados em Congresso

Partes das informações originadas neste estudo resultaram também em trabalhos de conclusão de curso de alunos do curso de Ciências Biológicas da Universidade Santa Cecília (UNISANTA), sendo estes apresentados no Congresso Nacional de Iniciação Científica (CONIC), e também no Congresso Brasileiro de Iniciação Científica (COBRIC) nas edições de 2011 e 2012.

Além disso, os resultados dos ensaios com substâncias de referência empregando a espécie *Hyale nigra* foram apresentados no XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia (ECOTOX) em 2012.

6.2 Trabalhos de Iniciação Científica

Os alunos Matheus Salgado e Bruna A. L. Romero, responsáveis pelos trabalhos citados anteriormente, contaram com o auxílio de uma bolsa de iniciação científica do Programa de Iniciação Científica (PIC) da UNSANTA e do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), respectivamente.

6.3 Elaboração de Artigos

Os dados fornecidos no presente estudo estão sendo traduzidos e formatados para submissão em revistas científicas especializadas, tanto em âmbito nacional como internacional, os quais serão submetidos ao decorrer deste ano.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

À continuação evidenciam a partir deste estudo:

- O desenvolvimento de novos métodos eficazes para avaliação da toxicidade em ecossistemas marinhos. Nesta questão, surgirão diferentes resultados de interesse, como a relação entre a contaminação e a resposta tóxica para diferentes abordagens de exposição;
- Os procedimentos descritos no estudo podem também ser aplicáveis para outros anfípodes da epifauna, desde que os efeitos de fatores abióticos naturais sobre a espécie-teste sejam preliminarmente determinados para a correta interpretação das respostas biológicas;
- Modificações nos procedimentos devem ainda ser descritas e adaptadas para a execução de testes crônicos, considerando efeitos subletais, como por exemplo, alteração no comportamento, desenvolvimento e reprodução dos organismos-teste;
- A metodologia descrita no presente estudo, com adaptações adequadas, é capaz de ser empregada em amostras de efluentes das mais diversas origens;
- Vale ressaltar que este estudo inclui a padronização dos parâmetros limitantes, e com a descrição dos parâmetros ótimos de sobrevivência destas espécies de anfípodes definidos, a manutenção e cultivo poderá ser implementada em qualquer laboratório, desde que seja estabelecida uma rotina que permita o devido controle destes parâmetros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D.M.S. (1996) **Testes de toxicidade de sedimentos da região de Santos-SP Brasil, (24S,46W), utilizando o anfípodo escavador *Tiburonella viscana* (Crustacea- Platyischnopidae) Thomas & Barnard (1983).** São Paulo: USP, 1996. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, SP. 1996
- ABESSA, D.M.S.; SOUSA, E.C.P.M.; RACHID, B.R.F. & MASTROTI, R.R. **Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as tool in marine sediments contaminant assessment.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 41(2):225-230. 1998.
- ABESSA, D.M.S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil.** São Paulo: USP, 2002. Tese (Doutorado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.
- ABESSA, D.M.S. & SOUSA, E.C.P.M. **Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* to $K_2Cr_2O_7$.** Brazilian Archives of Biology and Technology, 46(1):53-55. 2003.
- ABESSA, D.M.S.; BICEGO, M.C.; SARKIS, J.E.S.; HORTELLANI, M.A.; SOUSA, E.C.P.M. **Poder predictivo de valores-guias da qualidade de sedimentos para o sistema estuarino de Santos.** Society of environmental toxicology and chemistry. 2006.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com *Hyaella* spp (Amphipoda).** ABNT NBR 15470:2007, 20p. 2007.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Qualidade da água – Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarino com anfípodas.** ABNT NBR 15638:2008, 19p. 2008.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoide).** ABNT/NBR 15350:2011. 2011
- ADAMS, W.J.; Kimerle, R.A. & Mosher, R.G. **Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments.** In: Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 7th Symposium, STP 854, R.D. Cardwell, R. Purdy & R.C. Bahner (eds.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials, p. 429-453. 1985.
- ALLEN, Y.T.; THAIN, J.E.; HAWORTH, S.; BARRY, J. **Development and application of long-term sublethal whole sediment tests with *Arenicola marina* and *Corophium volutator* using Ivermectin as the test compound.** Environment. Pollution. 146, 92–99. 2007.

- ANDERSON, B.S; HUNT, J.W.; HESTER, M. & PHILLIPS, B.M. **Assessment of sediment toxicity at the sediment-water interface**. In: Techniques in Aquatic Toxicology. G.K. Ostrander (ed.), Lewis Publishers, Chapter 33, p. 609-624. 1996.
- ANDERSON, B.S; HUNT, J.W.; PHILLIPS, B.M; TUDOR, S. **Comparasion of marine sediment toxicity test protocols for the amphipod *Rhepoxynius abronius* and the polychaete worm *Nereis* (Neanthes) *Arenaceodentata***. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 17, N° 5, pp. 859 – 866. 1997.
- ANDERSON, B. S; LOWE, S. PHILLIPS, B. M; HUNT, J. W; VORHEES, J. **Relative sensitivities of toxicity test protocols with the amphipods *Eohaustorius estuarius* and *Ampelisca abdita***. Ecotoxicology and Environmental Safety 69, 24–31. 2008.
- APHA; AWWA; WPCP **Standard Methods for the examination of water and wastewater 19th edition**. Washington, DC. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation. 1998.
- ARAÚJO, R. P. A. **Avaliação da toxicidade de sedimentos ao anfípodo de água doce *Hyalella meinerti* Stebbing, 1899 (Crustacea, Amphipoda)**. São Paulo: USP, 1996. Dissertação apresentada ao Departamento de Ecologia Geral da Universidade de São Paulo. 1996.
- AREZON, A. **Biologia e ecologia do peixe anual *Cynopoecilus melanotaenia* (REAGAN, 1912), visando seu uso como organismo-teste de toxicidade (CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE)**. Porto Alegre: UFRS, 1996. Tese (mestrado). Universidade federal do Rio Grande do Sul, 118p. 1996.
- ASTM. (American Society for Testing and Materials). **Guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods**. ASTM 1992 Annual Book of Standards Vol. 13.04, E1367-92, Philadelphia, PA. 1992.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). **Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine invertebrates**. Standard E1367-03 (2008). ASTM International, West Conshohocken, PA, USA. 2008.
- BARNARD, J.L. & KARAMAN, G.S. **The families and genera of marine amphipoda (except marine gammaroids)**. Record of the Australian Museum, Supplement 13, part 1-2: 1-866. 1991.
- BARNETT, P.R.O. **Some changes in intertidal sand communities due to thermal pollution**. *froc. R. Sot. London, il*, Vol.1 77, pp . 353-364. 1971.

- BARJHOUX, I.; BAUDRIMONT, M.; BÉNÉDICTE, M.; LANDE, L.; GONZALEZ, P.; CACHOT, J. **Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)**. Ecotoxicology and Environmental Safety 79, 272–282. 2012.
- BAT, L.; RAFFAELLI, D. **Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina***. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 226, 217–239. 1998.
- BAT, L. **A review of sediment toxicity bioassay approach using the amphipod and polychaetes**. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 5, 119 – 139. 2005.
- BEAUVAIS, S.L.; JONES, S.B.; PARRIS, J.T.; BREWER, S.K.; LITTLE, E.E. **Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. Ecotoxicology and Environmental Safety 49, 84–90. 2001.
- BERTOLETTI, E.; NIPPER, M. G. & MAGALHÃES, N. P. **A precisão de testes de toxicidade com *Daphnia***. Ambiente, 6(1): 55-59. 1992.
- BERTOLETTI, E. **A escolha do anfípodo bentônico para ensaios ecotoxicológicos com sedimentos marinhos**. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 6, n. , 1-7. 2011.
- BOHRER, M.B.C. **Biomonitoramento das Lagoas de Tratamento terciário dos efluentes líquidos industriais (sitel) do pólo petroquímico do sul, triunfo, RS, através da comunidade zooplantônica**. São Carlos: UFSCAR, 1995. Tese de Doutorado em Zoologia e Recursos Naturais, Departamento de Ciências. Universidade Federal de São Carlos. 470p. 1995.
- BOUSFIELD EL. **Shallow-Water Gammaridean Amphipoda of New England**. Cornell University, Ithaca, NY. 1973.
- BOUDRIAS, M.A. **Methods for the study of amphipod swimming: behavior, morphology, and fluid dynamics**. Hydrobiologia 223, 11–25. 1991.
- BRASIL. **Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Diário oficial da união nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. 2005
- BRASIL. **Resolução CONAMA 454, de 01 novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional**. Diário oficial da união – seção 1, pág. 66. 2012.

- CARRETERO, J. A.; RUSO, Y. D.; CASALDUERO, F. G.; LIZASO, J. L. S. **Sensitivity of amphipods to sewage pollution.** Estuarine, Coastal and Shelf Science 96, 129-138. 2012.
- CESAR, A.; VITA, R.; GOMEZ, M.; JIMENEZ, B. & MARÍN, A. **Test de toxicidad con sedimento marino en la Costa Mediterránea empleando anfípodos: *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*.** Ecotoxicología - Perspectivas para o Século XXI, São Carlos, 17-27 p. 2000.
- CESAR, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R.; MARÍN, A. **Sensibilidad de anfípodos y erizos del Mar Mediterráneo a sustancias tóxicas de referencia.** Ciencias Marinas. 28(4): 407-417p. 2002.
- CESAR, A. **Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la Costa de Murcia: El caso de Portmán, Sudeste- España.** Espanha, 2003. Tese de doutorado. Universidad de Murcia – España. 2003.
- CESAR, A.; MARÍN, A.; MARÍN-GUIRAO, L. & VITA, R. **Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay.** Scientia Marina, N° 68 (suppl. 1); 205-213p. 2004.
- CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; SANTOS, A. R.; ABESSA, D. M. S. **Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system – Brazil.** Brazilian Journal of oceanography, 54(1): 55 – 63p. 2006.
- CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; RIBA, I.; MORALLES-CASELLES, M.C.; PEREIRA, C.D.S.; SANTOS, A. R.; ABESSA, D.M.S. E DELVALLS, T.A. **Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system).** Environment International, v. 33 p. 429-435. 2007.
- CESAR, A.; ABESSA, D.M.; PEREIRA, C.D.S.; CHOUERI, R.B.; DEL VALLS, T.A. **Simple approach to integrate ecotoxicological and chemical data for the establishment of environmental risk levels.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52 n.1 p. 233-240. 2009.
- CETESB. **Procedimento para utilização de toxicidade no controle de efluente líquido.** Goldstein, E. G.; Bertoletti, E.; Zagatto, P. A.; Araujo, R. P. A.; Ramos, M. L. L. C. Secretaria do Meio Ambiente, série manuais ISSN 0103-2623 São Paulo 2-5p. 1990.
- CHOUERI, R. B.; CESAR, A.; TORRES, R. J.; ABESSA, D. M. S.; MORAIS, R. D.; PEREIRA, C. D. S.; NASCIMENTO, M. R. L.; MOZETO, A. A.; RIBA, I. & DELVALLS, T. A. **Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil.** Ecotoxicology. and Environment. Safety., 72:1824-1831. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.12.005. 2009.

- COONEY, J.D. Sediment Tests. In: RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Effects, environmental fate and risk assessment. Washington USA: Taylor & Francis. 1995.
- CONLAN, K.E. **Amphipod crustaceans and environmental disturbance: a review**. Journal of Natural History, 28: 519-554. 1994.
- CLASON, B.; LANGSTON, W. J.; ZAUKE, G-P. **Bioaccumulation of trace metals in the amphipod *Chaetogammarus marinus* (Leach, 1815) from the Avon and Tamar estuaries (UK): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models**. 2004.
- CORREIA, A.D; COSTA, M.H. **Effects of sediment geochemical properties on the toxicity of copper-spiked sediments to the marine amphipod *Gammarus locusta***. The Science of the Total Environment 247, pp. 99 - 106. 2000.
- DEWITT, T.H.; DISTWORTH, G.R.; SWARTZ, R.C. **Effects of natural sediment features on survival of the phoxocephalid amphipod, *Rhepoxymius abronius***. Marine. Environment. Res. 25, 99–124. 1988.
- DEWITT, T.H.; REDMOND, M.S.; SEWALL, J.E., SWARTZ, R.C. **Development of a chronic sediment toxicity test for marine benthic amphipods**. Chesapeake Bay Program – Contribution no. N-24 from EPA's Environmental Research Laboratory. 1992.
- DUBIASKI-SILVA, J. **O fitol de *Sargassum cymosum* C. Agardh, 1820 (Phaeophyta - Fucales) e seu papel na dieta de peixes e braquiúros na ponta das Garoupas, Bombinhas, Santa Catarina**. Curitiba: UFPR, 1999. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 1999.
- EDGAR, G. J. **The ecology of south-east Tasmanian phytal animal communities. II. Seasonal change in plant and animal populations**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 70:159-179. 1983.
- ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12, Conservation and Protection, Ottawa, ON. 1990.
- ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediment spiked with a reference toxicant**. Report EPS 1/RM/5. Environmental Technology Centre, Ottawa, ON. 1995.
- FAY, A.A., BROWNAWELL, B.J., ELSKUS, A.A., MCELROY, A.E. **Critical body residues in the marine amphipod *Ampelisca abdita*: Sediment exposures with nonionic organic contaminants**. Environment Toxicology Chemistry 19 (4), 1028–1035. 2000.

- FISH, J. D. & PREECE, G. S. **The annual reproductive patterns of *Barhyporeia pilosa* and *Bathyporeia pelagica* (Crustacea: Amphipoda).** J. Mar. Biol. Assoc. U.K., Vol. 50, pp. 475-488. 1970.
- GIUTSO, A.; SOMMA, A. L.; FERRARI, L. **Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyaella curvispina*.** Ecotoxicology and Environmental Safety 79,163–169. 2012.
- GULLEY, D. **TOXSTAT.** Computer Program, Version 3.5. WEST, INC; University of Wyoming. 1996.
- GUNNILL, F. C. **Growth, morphology and microherbivore faunas of *Pelvetia fastigiata* (Phaeophyta, Fucaceae) at La Jolla, California, USA.** Botanica Marina, 28: 187-199. 1985.
- HIROTA, J. & SZYPER, J. P. **Separation of total particulate carbon into inorganic and organic components.** Limnol, Oceanogr, 20: 896-900. 1975.
- KING, C. K.; GALE, S. A.; HYNE, R. V.; STAUBER, J. L.; SIMPSON, S. L.; HICKEY, C. W. **Sensitivities of Australian and New Zealand amphipods to copper and zinc in waters and metal-spiked sediments.** Chemosphere 63, 1466–1476. 2006.
- KINNE, O. **Die Geschlechtsbestimmung des Flohkrebsses *Gammarus duebeni* Lillj. (Amphipods) ist temperaturabhngig - eine Entgegnung.** Crustaceana, Vol. 3, pp. 56-69. 1961.
- KOHN, N.P.; WORD, J.Q.; NIYOGI, D.K. **Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipod.** Marine Environmental Research 38, 1 – 15. 1994.
- LAMBERSON, J.O.; SWARTZ, R.C. **Use of bioassays in determining the toxicity of sediment to benthic organisms.** In: Evans, M.S. (Ed.), Toxicology Contamination and Ecosystem Health; A Great Lakes Focus. John Wiley and Sons, New York, pp. 257–259. 1988.
- LAMBERSON, J.O.; SWARTZ, R.C. **Spiked-sediment toxicity test approach. In: Sediment Classification Methods Compendium.** USEPA, Criteria and Standards Division, Washington, DC. Lamberson, J.O., Redmond, M.S., Jones, J.K.P., Sewall, J.E., Chapman, J.W., Cole, F.A. 1989.
- LAMBERSON, J. O.; REDMOND, M. S.; JONES, J. K. P. **Development of an amphipod sediment toxicity test for Hawaii.** USEPA, ERL – N ASCI. 1992.
- LAMBERSON, J.O.; DEWITT, T. H.; SWARTZ, R.C. **Assessment of sediment toxicity to marine benthos.** Sediment toxicity assessnebt. G. A. Burton. Jr., Ed. Ann Arbor, MI: Lewis Publishers. PP. 183-211. 1992.

- LAMPARELLI, M.L.; COSTA, M.P.; PRÓSPERI, V.A., **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. Relatório Técnico CETESB. São Paulo, SP. 178p. 2001.
- LEITE, F. P. P.; JACOBUECCI, G. B. & GÜTH, A. Z. **Temporal comparison of gammaridean amphipods of *Sargassum cymosum* on two rocky shores in southeastern Brazil**. Nauplius, 8(2): 227-236. 2000.
- LUCZAK, C., JANQUIN, M. A. & KUPKA, A. **Simple standard procedures for the routine determination of organic matter in marine sediment**. Hydrobiologia, 345: 87-94. 1997.
- MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. In: O Ecologia Brsiliensis. Rio de Janeiro. v.12, n.3, p. 355-381. 2008.
- McCREADY, S.; BIRCH, G.F.; LONG, E.R.; SPYRAKIS, G.; GREELY, C.R. **Predictive abilities of numerical sediment quality guidelines in Sidney Harbour, Australia, and vicinity**. Environment. Int. 32, 638–649. 2006.
- MELO, S. L. R. **Testes de toxicidade com sedimentos marinhos: adequação de metodologia para o anfípodo escavador *Tiburonella viscana***. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, São Carlos, Brasil. 1993.
- MELO, S. L. R.; ABESSA, D. M. S. **Testes de toxicidade com sedimentos utilizando anfípodos**. In: Nascimento, I. A., Sousa, E. C. P. M., Nipper, M. (Eds), Métodos em Ecotoxicologia Marinha – Aplicações no Brasil. Ed. Artes Gráficas e Industrias Ltda., pp. 163 – 178 (in Portuguese). 2002.
- MELO, S. L. R.; NIPPER, M. **Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyschnopidae)**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66, 412 – 420p. 2007.
- MOLISANI, M. M.; COSTA, R. N.; CUNHA, P.; REZENDE, C. E.; FERREIRA, M. I. P.; ESTEVES, F. A. **Acute toxicity with de amphipod, *Grandidierella bonnieroides* S. after exposure to sediments from na urban estuary (Macaé River Estuary, RJ, Brazil)**. Bull Enveron Contam Toxicol. 90:79-84. 2013.
- MUKAI, H. **The phytal animals on the thalli of *Sargassum serratifolium* in the *Sargassum* region, with reference to their seasonal fluctuations**. Marine Biology, 8:170-182. 1971.
- NEBEKER, A. V.; CAIRNS, M. A.; GAKSTATTER, J. H.; MALUEG, K. W.; SCHUYTMA, G. S.; KRAWCZYK, D. F. **Biological methods for determining toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates**. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 3, p. 617-630. 1984.

- NIPPER, M. **The development and application of sediment toxicity tests for regulatory purposes.** In: Wells. P. G., Lee, K., Blaise, C. (Eds), *Microscale Aquatic Toxicology – Advances, Techniques and Practice*. CRC Press, Inc., Boca Rotan, FL. PP. 631 – 643. 1998.
- NYBAKKEN, J. W. **Marine biology: an ecological approach.** 5th Ed. Benjamin Cummings, San Francisco, CA – USA. 516p. 2001.
- OECD – Organization for Economic Co – operation and Development. **Earthworm acute toxicity tests.** Guidelines for the testing of chemicals No. 207. Adopted 4 April. 1984.
- OTHMAN, M. S.; PASCOE, D. **Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyalella azteca*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 29–35. 2007.
- PEREZ, M.H., WALLACE, W.G. **Differences in prey capture in grass shrimp, *Palaemonetes pugio* collected along and environmental impact gradient.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 81–89. 2004.
- PICONE, M.; BERGAMIN, M.; ALESSANDRA, o.N.; NOVENTA, S.; DELANEY, E.; BARBANTI, A., GHIRARDINI, A.V. **Evaluation of *Corophium orientale* as bioindicator for Venice Lagoon: sensitivity assessment and toxicity-score proposal.** *Ecotoxicology Environment. Safety* 70, 174–184. 2008.
- POWER, E.A. & CHAPMAN, P.M. **Assessing sediment quality.** In: **Sediment toxicity assessment.** G. Allen Burton, Jr (ed.), chapter 1, p.1- 18. 1992.
- PRATER, B. L.; ANDERSON, M. A. **A 96-hour sediment bioassay of Duluth and Superior Harbor Basins (Minnesota) using *Hexagenia limbata*, *Asellus communis*, *Daphnia magna*, and *Pimephales promelas* as test organisms.** *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, v. 18, n. 2, p. 159 -169. 1977.
- PRATO, E.; BIANCOLINO, F. ***Monocorophium insidiosum* (Crustacea, Amphipoda) as a candidate species in sediment toxicity testing.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77, 18. 2006.
- PRATO, E.; DI LEO, A.; BIANCOLINO, F.; CARDELLICCHIO, N. **Sediment toxicity tests using two species of marine amphipods: *Gammarus aequicauda* and *Corophium insidiosum*.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 629–639. 2006.
- PRÓSPERI, V. A. **Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos.** São Carlos: UFSCAR, 2002. Tese (Doutorado) apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo. 2002.
- PUSCEDDU, F. H. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento**

- mercado (“spiked sediment”).** São Paulo: USP, 2007. Tese (Mestrado). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares da Universidade de São Paulo. 2007.
- RAINBOW, P. S.; LUOMA, S. N. **Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans.** *Aquatic Toxicology* 105, 455– 465. 2011.
- RE, A.; FREITAS, R.; SAMPAIO, A. M. R.; QUINTINO, V. **Estuarine sediment acute toxicity testing with the European amphipod *Corophium multisetosum* Stock, 1952.** *Chemosphere* 76, 1323 – 1333p. 2009.
- ROAST, S.D., WIDDOWS, J., JONES, M.B. **Impairment of mysid (*Neomysis integer*) swimming ability: an environmentally realistic assessment of the impact of cadmium exposure.** *Aquatic Toxicology* 52, 217–227. 2001.
- SANTOS, L.R.S; OLIVEIRA, C. **Histological aspects and structural characteristics of the tests of *Dendropsophus minutes* (Anura, Hylidae).** *Micron* 39, pp. 1266 – 1270. 2008.
- SARDO, A. M.; SOARES, A. M.V .M. **Mesopodopsis slabberi (Crustacea: Mysidacea): can it be used in toxicity tests?.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 81-86p. 2005.
- SCHIPPER, C. A.; BURGESS, R. M.; VAN DEN DIKKENBERG, B. J. and STRONKHORST, J. **Standard operating procedure, species 01 – Marine amphipod *Corophium volutator* – mortality sediment toxicity test.** National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), 17pp. 1999.
- SEREJO, C.S. **Taxonomy and distribution of the family hyalidae (Amphipoda, Talitroidea) on the brazilian coast.** *Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress*, 1: 591-616. 1998.
- SEREJO, C. S. **Taxonomy and distribution of the family Hyalidae (Amphipoda, Talitroidea) on the Brazilian coast, in Schram F. Vaupel Klein J. C. Von (eds). The Crustaceans and the Biodiversity Crisis.** *Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress*, Amsterdam, The Netherlands. Vol. I. Brill, Leiden: 591-616. 1999.
- SEREJO, C. S. **A new species of amphipod from the Brazilian coast, with redescription of *Hyale spinidactyla* Chevreux, 1925 (Crustacea, Amphipoda, Hyalidae).** *Zoosystema* 23 (3): 479-492. 2001.
- SIMPSON, S.L.; KING, C.K. **Exposure-pathway models explain causality in whole-sediment toxicity tests.** *Environ. Sci. Technol.* 39, 837–843. 2005.
- SOUSA, E. C. P. M.; ABESSA, D. M. S.; RACHID, B. R. F.; GASPARRO, M. R. & ZARONI, L. P. **Ecotoxicological assessment of sediments from the**

- port of Santos and the disposal sites of dredged material. *Braz. J. Oceanogr.*, 55:75-81. doi: 10.1590/S1679-87592007000200001. 2007.
- STEELE, V. J. **The effect of photoperiod on the reproductive cycle of *Gammarus lawrencianus* Bousfield.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Vol 53. pp. 1-7. 1981.
- STEELE, V. J. D. H.; STEELE & B. R. MCPHERSON. **The effect of photoperiod on the reproductive cycle of *Gammarus serosus* Dementieva, 1931.** *Crustaceana*, Suppl. 4, pp. 58-63. 1977.
- SWARTZ, R.C.; DEBEN, W.A.; SERCU, K.A.. AND LAMBERSON, J.O. **Sediment toxicity and the distribution of the amphipods in Commencement Bay, Washington, USA.** *Mar. Pol. Bul.*, 13: 359– 364. 1982.
- SWARTZ, R.C.; W. A. DEBEN, J.K.P.; JONES, J.O.; LAMBERSON, AND F.A. CODE. **Phoxocephalid amphipod bioassay for marine sediment toxicity.** In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 7th Volume.* ASTM STP 854, RD. Cardwell, R. Purdy, and P>C. Bahner, Eds., Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, pp. 284 – 307. 1985.
- TARARAM, A. S. & WAKABARA, Y. **The mobile fauna - especially Gammaridea of *Sargassum cymosum*.** *Marine Ecology Progress Series*, 5: 157-163. 1981.
- THOMAS, J. D. **Biological monitoring and tropical diversity in marine environments: a critique with recommendations, and comments on the use of amphipods as bioindicators.** *Journal of Natural History*, 27: 795-806. 1993.
- TSVENTNENKO, Y. B.; BLACK, A. J.; EVANS, L. H. **Development of Marine Sediment Reworker Tests with western Australian Species for toxicity assessment of drilling mud.** Aquatic Science Research Unit, Muresk Institute of Agriculture, Curtin University of Technology, Suite 3 Enterprise Unit 1, 11 Brodie Hall Drive, Technology Park Bently, 6102 WA, Australia. 2000.
- USEPA **Methods for assessing the toxicity of sediment – associated contaminants with estuarine and marine amphipods.** U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC.EPA/600/R-94/025. 1994.
- USEPA. **Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual.** U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. EPA-823-B-01-002. 2001.
- WALLACE, W.G.; ESTEPHAN, A. **Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a**

gammaridean amphipod *Gammarus lawrencianus*. Aquatic Toxicology 69: 289 – 297. 2004.

WELLS, P.G. **History and practice of biological effects assessment for aquatic protection in Canada: a synopsis.** In Day,; K.E., Ongley, E.D., Scroggins R.P. and Eisenhauer, H.R., (eds.), Biology in the new regulatory framework for aquatic protection. Burlington. NWRI. pp. 25-29. 1989.

WILLIAMS, J. A. **The annual pattern of reproduction of *Tulifrus sulfuror* (Crustacea : Amphipoda : Talitridae).** J. Zool., Vol. 184, pp. 231-244. 1978.

WILLIAMS, J.J.; DUTTON, J.; CHEN, C.Y; FISHER, N.S. **Metal (As, Cd, Hg, and CH₃Hg) Bioaccumulation from water and food by benthic amphipod *Leptocheirus plumulosus*.** Environment toxicology chemistry. 29 (8), pp. 1755- 1761. Doi: 10.1002/etc.207. 2010.

WOODWORTH, J.G.; KING, C., MISKIEWICZ, A.G. **Assessment of the comparative toxicity of sewage effluent from 10 sewage treatment plants in the area of Sidney, Australia using an amphipod and two sea urchin bioassays.** Mar. Pollut. Bull. 39 (1–12), 174–178. 1999.

WONG, K.L.; KLAASSEN, C.D. **Neutotoxic effects of cadmium of young rats.** Toxicology and applied pharmacology. 63. 330 – 337. 1982.

ZAKREWSKI, S. F. **Principles of Environmental Toxicology.** American Chemical society, washington, dc. 270p. 1991.

ZAMPROGNO, C. **Distribuição e hábitos alimentares dos peixes da zona entre - marés de recifes rochosos da praia de Manguinhos, Espírito Santo.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 1989.

APÊNDICE I. Caracterização dos parâmetros limitantes

Resultados dos ensaios com diferentes salinidades e temperaturas com a espécie *Hyale nigra*

Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			T°C: 25 °C:
N° de réplica: 3 a 4			
Efeito observado: mortalidade			
Salinidade	Período de exposição/ total de organismos		% de sobrevivência p/ 10d
	96h	10 dias	
20	2/30	17/30	43%
25	3/20	6/20	70%
30	1/20	5/20	75%
35	2/30	4/30	86%
40	3/30	5/30	83%

Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			T°C: 20 °C:
N° de réplica: 3 a 4			
Efeito observado: mortalidade			
Salinidade	Período de exposição		% de sobrevivência p/ 10d
	96h	10 dias	
20	3/30	9/30	70%
25	4/30	9/30	70%
30	5/30	7/30	76%
35	2/30	4/30	86%
40	3/30	6/30	80%

Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			T°C: 15 °C
N° de réplica: 3 a 4			
Efeito observado: mortalidade			
Salinidade	Período de exposição/ total de organismos		% de sobrevivência p/ 10d
	96h	10 dias	
20	3/30	6/30	80%
25	4/30	13/30	56%
30	2/30	7/30	76%
35	2/30	6/30	80%
40	3/30	6/30	80%

Resultados dos ensaios com diferentes salinidades e temperaturas com a espécie *Hyale youngi*

Organismo-teste: <i>Hyale youngi</i>			T°C: 25 °C:
N° de réplica: 3 a 4			
Efeito observado: mortalidade			
Salinidade	Período de exposição/ total de organismos		% de sobrevivência p/ 10d
	96h	10 dias	
20	1/30	15/30	50%
25	3/30	6/30	80%
30	0/30	4/30	85%
35	2/30	5/30	83%
40	2/30	7/30	76%

Organismo-teste: <i>Hyale youngi</i>			T°C: 20 °C:
N° de réplica: 3 a 4			
Efeito observado: mortalidade			
Salinidade	Período de exposição/ total de organismos		% de sobrevivência p/ 10d
	96h	10 dias	
20	1/30	8/30	73%
25	0/30	10/30	66%
30	2/30	4/30	85%
35	1/30	1/30	95%
40	4/30	9/30	70%

Organismo-teste: <i>Hyale youngi</i>			T°C: 15 °C
N° de réplica: 3 a 4			
Efeito observado: mortalidade			
Salinidade	Período de exposição/ total de organismos		% de sobrevivência p/ 10d
	96h	10 dias	
20	1/30	4/30	86%
25	5/30	10/30	66%
30	0/30	6/30	80%
35	1/30	6/30	80%
40	2/30	3/30	90%

APÊNDICE II. Sensibilidade dos organismos-teste

Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale nigra*

Dodecil Sulfato de Sódio

Teste: 01			Duração: 96h	
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			Data: 04/12/2011	
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	0	1	1
1,2	0	1	1	2
1,8	1	0	3	4
2,7	0	2	1	3
4,05	4	2	3	9
6,07	9	8	8	25
9,11	10	10	10	30

Teste: 02					Duração: 96h
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>					Data:12/05/2012
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S					
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	1	1	0	2
1,2	1	1	2	1	5
1,8	1	2	0	2	5
2,7	0	1		4	5
4,05	5	1	4	2	12
6,07	5	5	5	4	14
9,11	5	5	5	5	15

Teste: 03			Data: 19/05/2012	
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			Duração: 96h	
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	1	0	2
1,2	4	1	0	5
1,8	2	6	1	9
2,7	4	0	6	10
4,05	8	9	8	25
6,07	10	10	10	30

Teste: 04		Data: 29/05/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	2	3	0	5
1,2	1	3	1	5
1,8	2	3	5	10
2,7	4	2	2	8
4,05	4	3	9	16
6,07	10	10	10	30

Teste: 05		Data: 29/05/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	2	1	3
1,2	0	0	1	1
1,8	3	2	2	7
2,7	3	2	3	8
4,05	8	3	8	19
6,07	10	10	10	30

Dicromato de Potássio

Teste: 01
Organismo-teste: *Hyale nigra*
Substância de referência: $K_2Cr_2O_7$

Data: 22/05/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	2	2	5
15,68	4	7	5	16
23,52	9	7	4	20
35,28	4	7	10	21
52,92	10	10	10	30
79,38	10	10	10	30

Teste: 02
Organismo-teste: *Hyale nigra*
Substância de referência: $K_2Cr_2O_7$

Data: 28/06/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	0	0	0
15,68	0	5	3	8
23,52	6	4	2	12
35,28	10	8	8	28
52,92	10	10	10	30
79,38	10	10	10	30

Teste: 03
Organismo-teste: *Hyale nigra*
Substância de referência: $K_2Cr_2O_7$

Data: 08/07/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	0	1	1
10,45	2	3	6	13
15,68	8	10	10	28
23,52	10	10	10	30
35,28	9	9	8	26
52,92	10	10	10	30

Teste: 04			Data: 02/08/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			Duração: 96h		
Substância de referência: K ₂ Cr ₂ O ₇					
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	0	1	1	2
15,68	2	1	1	1	5
23,52	0	1	2	2	5
35,28	3	5	3	3	14
52,92	5	5	5	5	20
79,38	5	5	5	5	20

Teste: 05		Data: 03/08/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: K ₂ Cr ₂ O ₇				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	2	2	1	5
15,68	5	1	0	6
23,52	0	4	2	6
35,28	2	5	2	9
52,92	4	5	5	14
79,38	10	10	10	30

Cloreto de Cádmio

Teste: 01
Organismo-teste: *Hyale nigra*
Substância de referência: ClCd₂

Data: 25/06/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	1	1	2
0,05	0	1	1	2
0,1	1	4	3	8
0,2	5	6	7	18
0,4	4	6	8	22
0,8	8	9	8	25
1,6	10	10	10	30

Teste: 02
Organismo-teste: *Hyale nigra*
Substância de referência: ClCd₂

Data: 25/06/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	1	0	1
0,05	0	2	0	2
0,1	0	3	1	4
0,2	6	6	3	15
0,4	8	10	7	25
0,8	10	10	10	30
1,6	10	10	10	30

Teste: 03		Data: 29/06/2012			
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h			
Substância de referência: ClCd ₂					
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	2	1	1	4
0,05	0	0	1	2	3
0,1	1	2	1	0	4
0,2	4	5	2	1	12
0,4	5	3	2	1	11
0,8	5	5	4	4	18
1,6	5	5	5	5	20

Teste: 04			Data: 02/08/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			Duração: 96h		
Substância de referência: ClCd ₂					
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	0	1	1	2
0,05	0	0	0	0	0
0,1	0	1	1	2	4
0,2	1	0	0	2	3
0,4	3	2	3	3	11
0,8	3	4	3	3	13
1,6	5	5	5	5	20

Teste: 05		Data: 07/08/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: ClCd ₂				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	2	2	1	5
0,05	1	2	3	6
0,1	1	4	3	8
0,2	2	6	4	12
0,4	6	10	4	20
0,8	4	7	7	18
1,6	8	10	10	28

Cloreto de Amônia

Teste: 01 Data: 24/03/2012

Organismo-teste: *Hyale nigra* Duração: 96h

Substância de referência: NH_4Cl_2

Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	0	1	1	2
44,44	0	0	0	0	0
66,66	1	2	1	2	6
100	3	2	2	3	10
150	5	2	2	2	11
225	5	4	5	5	19

Teste: 02 Data: 16/04/2012

Organismo-teste: *Hyale nigra* Duração: 96h

Substância de referência: NH_4Cl_2

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	1	1	3
44,44	0	2	1	3
66,66	1	1	7	9
100	5	1	3	9
150	9	9	5	23
225	9	10	10	29

Teste: 03 Data: 08/05/2012

Organismo-teste: *Hyale nigra* Duração: 96h

Substância de referência: NH_4Cl_2

Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	1	1	2	4
44,44	2	2	1	1	6
66,66	2	3	1	5	11
100	5	3	0	5	13
150	3	2	5	1	11
225	5	5	4	4	18

Teste: 04			Data: 08/05/12		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>			Duração: 96h		
Substância de referência: NH ₄ Cl ₂					
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	2	1	0	1	4
44,44	0	4	2	1	7
66,66	0	1	2	5	8
100	0	3	5	2	10
150	5	1	2	5	13
225	5	5	5	5	20

Teste: 05		Data: 16/05/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: NH ₄ Cl ₂				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	2	2	5
44,44	5	6	4	15
66,66	4	5	4	13
100	9	6	4	19
150	10	9	4	23
225	10	10	10	30

Sulfato de Zinco

Teste: 01 Data: 07/08/2012

Organismo-teste: *Hyale nigra* Duração: 96h

Substância de referência: ZnSO₄

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	2	2	1	5
0,03	2	3	1	6
0,06	3	1	2	6
0,12	0	0	0	0
0,24	2	2	4	8
0,48	5	4	5	14
0,98	10	10	10	30

Teste: 02 Data: 13/08/2012

Organismo-teste: *Hyale nigra* Duração: 96h

Substância de referência: ZnSO₄

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	3	1	4
0,03	0	0	0	0
0,06	1	4	3	8
0,12	8	6	6	20
0,24	9	4	7	20
0,48	5	4	7	16
0,98	9	8	10	27

Teste: 03 Data: 08/09/2012

Organismo-teste: *Hyale nigra* Duração: 96h

Substância de referência: ZnSO₄

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	1	2	4
0,03	1	2	1	4
0,06	5	4	5	14
0,12	7	6	4	17
0,24	10	8	8	26
0,48	10	9	7	26
0,98	10	10	10	30

Teste: 04		Data: 13/09/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: ZnSO ₄				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	2	1	3
0,03	0	2	3	5
0,06	4	5	4	13
0,12	7	5	8	20
0,24	10	10	8	28
0,48	10	10	10	30
0,98	10	10	10	30

Teste: 05		Data: 09/10/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: ZnSO ₄				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	1	1	2
0,03	0	2	3	5
0,06	1	2	2	5
0,12	4	3	0	7
0,24	3	4	3	9
0,48	7	9	8	24
0,98	10	10	10	30

Resultados dos ensaios de sensibilidade com o anfípode *Hyale youngi*

Dodecil Sulfato de Sódio

Teste: 01		Data: 17/05/2011		
Organismo-teste: <i>Hyale youngi</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	1	0	2
3,0	2	2	0	4
3,9	4	5	5	14
5,0	4	4	7	15
6,59	8	6	4	18
8,5	10	10	10	30

Teste: 02		Data: 25/05/2012		
Organismo-teste: <i>Hyale youngi</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	0	0	0
1,2	0	0	0	0
1,8	2	0	0	2
2,7	0	0	1	1
4,05	1	3	5	9
6,07	4	3	3	10
9,11	4	5	6	15
13.66	8	8	4	20

Teste: 03		Data: 31/05/2011		
Organismo-teste: <i>Hyale youngi</i>		Duração: 96h		
Substância de referência: C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S				
Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	1	0	2
2,0	2	2	0	4
4,0	2	0	0	2
8,0	4	4	7	15
16,0	10	10	10	30
32,0	10	10	10	30

Dicromato de Potássio

Teste: 01
Organismo-teste: *Hyale youngi*
Substância de referência: $K_2Cr_2O_7$

Data: 26/05/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	0		1
6,95	1	1	0	2
10,45	3	0	1	4
15,68	4	7	5	16
23,52	4	5	4	13
35,28	4	9	10	23
52,92	10	10	5	25

Teste: 02
Organismo-teste: *Hyale youngi*
Substância de referência: $K_2Cr_2O_7$

Data: 06/07/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	0	0	0	0
10,45	0	0	0	0	0
15,68	0	0	2	0	2
23,52	4	3	4	0	11
35,28	3	4	2	3	12
52,92	1	3	3	4	11
79,38	5	5	5	5	20

Teste: 03
Organismo-teste: *Hyale youngi*
Substância de referência: $K_2Cr_2O_7$

Data: 24/08/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	0	0	2	2
15,68	5	0	1	0	6
23,52	5	1	3	3	12
35,28	3	4	2	3	12
52,92	5	2	5	5	17
79,38	5	5	5	5	20

Cloreto de Cádmio

Teste: 01 **Data: 12/06/2012**
Organismo-teste: *Hyale youngi* **Duração:** 96h
Substância de referência: ClCd₂

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	1	1	2
0,13	1	4	5	10
0,25	3	5	6	14
0,50	4	6	6	16
1,0	10	10	10	30
2,0	10	10	10	30

Teste: 02 **Data: 16/06/2012**
Organismo-teste: *Hyale youngi* **Duração:** 96h
Substância de referência: ClCd₂

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	1	1	2
0,13	1	4	3	8
0,25	7	8	5	20
0,50	8	10	10	28
1,0	10	10	10	30
2,0	10	10	10	30

Teste: 03 **Data: 15/09/2012**
Organismo-teste: *Hyale youngi* **Duração:** 96h
Substância de referência: ClCd₂

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	0	1	2	3
0,05	5	2	2	9
0,1	4	3	2	9
0,2	6	4	4	14
0,4	6	10	6	22
0,8	10	10	8	28
1,6	10	10	10	30

Cloreto de Amônia

Teste: 01
Organismo-teste: *Hyale youngi*
Substância de referência: NH_4Cl_2

Data: 06/07/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	1	1	3
44,44	3	2	1	6
66,66	4	3	5	12
100	2	7	5	14
150	6	5	5	16
225	6	8	10	24

Teste: 02
Organismo-teste: *Hyale youngi*
Substância de referência: NH_4Cl_2

Data: 01/09/2012

Duração: 96h

Conc.	Mortalidade			Total
	R1	R2	R3	
Controle	1	0	1	2
44,44	3	2	1	6
66,66	1	1	2	4
100	5	6	5	16
150	8	3	5	16
225	9	7	8	24

APÊNDICE III. Resultados

Sedimento contaminado

Resultados dos ensaios com sedimento contaminado

Teste: 01		Data: 29/12/2012			
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 10 dias			
Substância de referência: Cd		Total exposto: 40			
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	1	1	2	4
1,0	0	1	2	2	5
2,0	2	4	3	4	13
4,0	5	2	3	3	13
8,0	4	7	8	7	26

Teste: 02		Data: 25/01/2013			
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 10 dias			
Substância de referência: Cd		Total exposto: 20			
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	1	1	2	2	6
1,0	0	1	0	0	1
2,0	0	3	0	1	4
4,0	2	3	3	2	10
8,0	5	4	3	4	16

Teste: 03		Data: 28/01/2013			
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 10 dias			
Substância de referência: Cd		Total exposto: 40			
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	0	2	0	2	4
1,0	2	1	2	2	7
2,0	3	2	2	3	10
4,0	4	6	3	4	17
8,0	8	6	5	6	25

Teste: 04		Data: 01/02/2013			
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 10 dias			
Substância de referência: Cd		Total exposto: 40			
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	2	3	1	2	8
1,0	3	4	2	6	15
2,0	0	1	0	2	3
4,0	5	3	4	2	14
8,0	8	7	7	4	25

Teste: 05		Data: 04/02/2013			
Organismo-teste: <i>Hyale nigra</i>		Duração: 10 dias			
Substância de referência: Cd		Total exposto: 40			
Conc.	Mortalidade				Total
	R1	R2	R3	R4	
Controle	2	4	0	2	8
1,0	4	3	3	6	16
2,0	6	4	3	5	18
4,0	8	7	7	4	26
8,0	8	9	5	6	28

APÊNDICE IV. Sumário e critérios de aceitabilidade

Sumário das condições e critérios de aceitabilidade para ensaios de toxicidade (fração aquosa) com *H. nigra* e *H. youngi*. Tais critérios foram baseados nos resultados dos ensaios de caracterização dos parâmetros físico-químicos.

Parâmetros	Condições
Tipo de teste	Estático
Período de exposição	96 horas
Temperatura	20° C a 25° C
Salinidade	30 a 40
Fotoperíodo	Ensaio (Luz contínua)
Recipiente-teste	Frasco de polietileno de 1 L
Volume da solução teste	400 ml
N° de organismos por réplica	10 organismos
N° de réplicas por tratamento	3 réplicas
Alimentação	Sim
Aeração	Fluxo contínuo suave
Água de diluição	Água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Idade do organismo-teste	Adultos (sem fêmeas ovadas)
Efeito observado	Letalidade (CL50)
Validade do ensaio	Mínimo de 80% de sobrevivência no controle

Sumário das condições e critérios de aceitabilidade para ensaios de toxicidade (fração sólida) com *H. nigra* e *H. youngi*. Tais critérios foram baseados nos resultados dos ensaios de caracterização dos parâmetros físico-químicos

Parâmetros	Condições
Tipo de teste	Semi-estático
Período de exposição	10 dias
Temperatura	20° C a 25° C
Salinidade	30 a 40
Fotoperíodo	Ensaio (Luz contínua)
Recipiente-teste	Frasco de polietileno de 1 L
Volume da amostra	150g
Volume de água	600 ml
Nº de organismos por réplica	10 organismos
Nº de réplicas por tratamento	Mínimo de 3 réplicas
Alimentação	Sim
Aeração	Fluxo contínuo suave
Água de diluição	Água do mar natural filtrada (0,45 µm)
Idade do organismo-teste	Adultos (sem fêmeas ovadas)
Efeito observado	Letalidade (CL50)
Validade do ensaio	Mínimo de 80% de sobrevivência no controle

APÊNDICE V. Cálculos para aplicação da contaminação do sedimento

DESENVOLVIMENTO

Para a determinação das concentrações definitivas a serem empregadas nos ensaios com sedimento artificialmente contaminado foram realizadas análises químicas de 3 amostras. Na primeira foi adicionado 0,40 mg da solução estoque de cádmio, com concentração de 50 mg.L^{-1} ; a segunda $0,60 \text{ mg.L}^{-1}$ e a terceira foi a amostra controle. Os resultados obtidos nessas análises apresentaram valores de 1,9 mg, 1,3 mg e não detectado, respectivamente.

Dessa forma, a partir da equação da reta ($y = ax + b$) foi possível estimar as concentrações reais para serem empregadas nos ensaios.

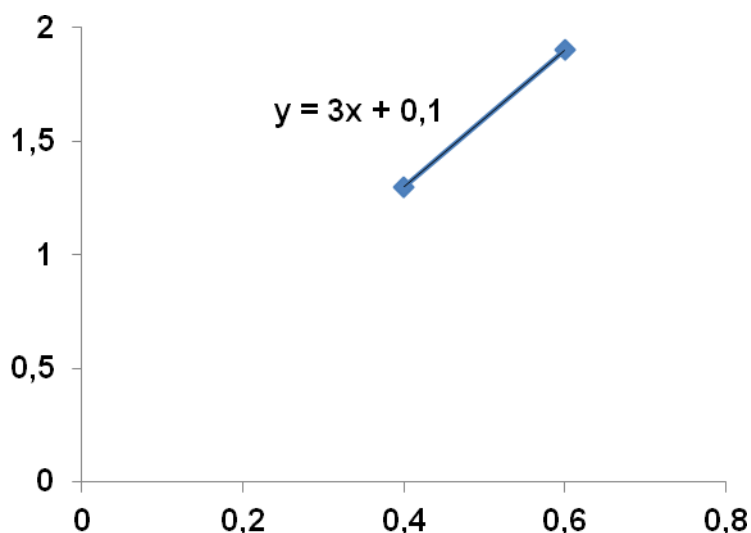


Figura 1. Resultados obtidos nas análises químicas para estimar as concentrações reais a serem empregadas nos ensaios com sedimento marcado com cádmio.

Cálculos:

$$\longrightarrow y = ax + b$$

$$1,3 = a \cdot 0,40 + b$$

$$1,9 = a \cdot 0,60 + b$$

$$(x-1) \rightarrow -1,3 = -a \cdot 0,40 - b$$

$$\longrightarrow 0,6 = a \cdot 0,20$$

$$a = 0,6 / 0,2 \longrightarrow a = 3$$

$$\longrightarrow y = ax + b$$

$$1,3 = 3 \cdot 0,40 + b$$

$$1,3 = 1,2 + b$$

$$\longrightarrow b = 0,1$$

$$\textbf{Portanto : } y = 3x + 0,1$$

$$\downarrow \quad \searrow$$

$$\text{Real} = 3 \cdot \text{Concentração da solução} + 0,1$$

Dessa forma, as concentrações determinadas para serem aplicadas nos ensaios foram: 1mg, 2 mg, 4 mg e 8 mg. Para alcançarmos essas concentrações foram calculados então :

1 mgCd

$$1 = 3 \text{ Conc.Sol.} + 0,1$$

$$3 \text{ Conc. Sol.} = 0,9$$

$$\text{Conc. Sol} = 0,9 / 3 \longrightarrow \mathbf{0,30 \text{ mgCd}}$$

2 mgCd

$$2 = 3 \text{ Conc.Sol.} + 0,1$$

$$3 \text{ Conc. Sol.} = 1,9$$

$$\text{Conc. Sol} = 1,9 / 3 \longrightarrow \mathbf{0,63 \text{ mgCd}}$$

4 mgCd

$$4 = 3 \text{ Conc.Sol.} + 0,1$$

$$3 \text{ Conc. Sol.} = 3,9$$

$$\text{Conc. Sol} = 3,9 / 3 \longrightarrow \mathbf{1,3 \text{ mgCd}}$$

8 mgCd

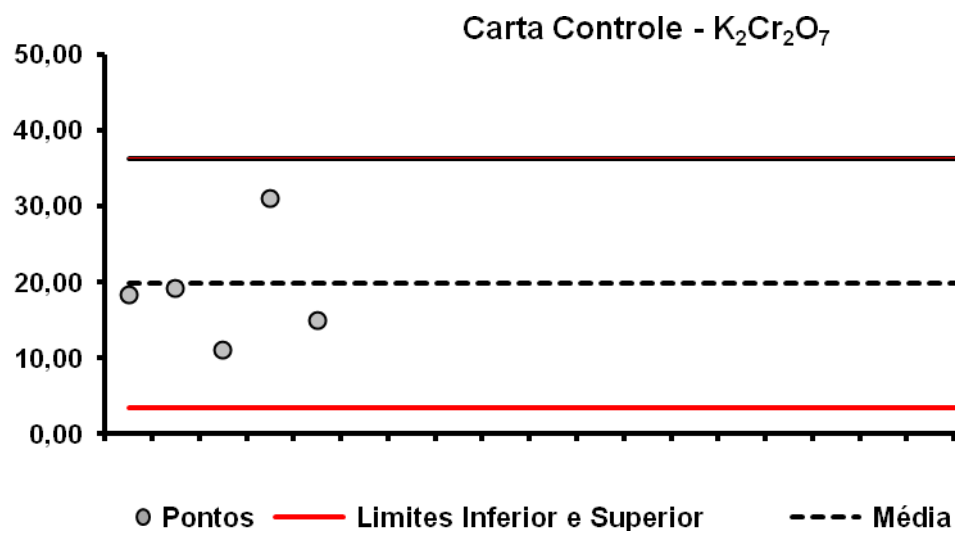
$$8 = 3 \text{ Conc.Sol.} + 0,1$$

$$3 \text{ Conc. Sol.} = 7,9$$

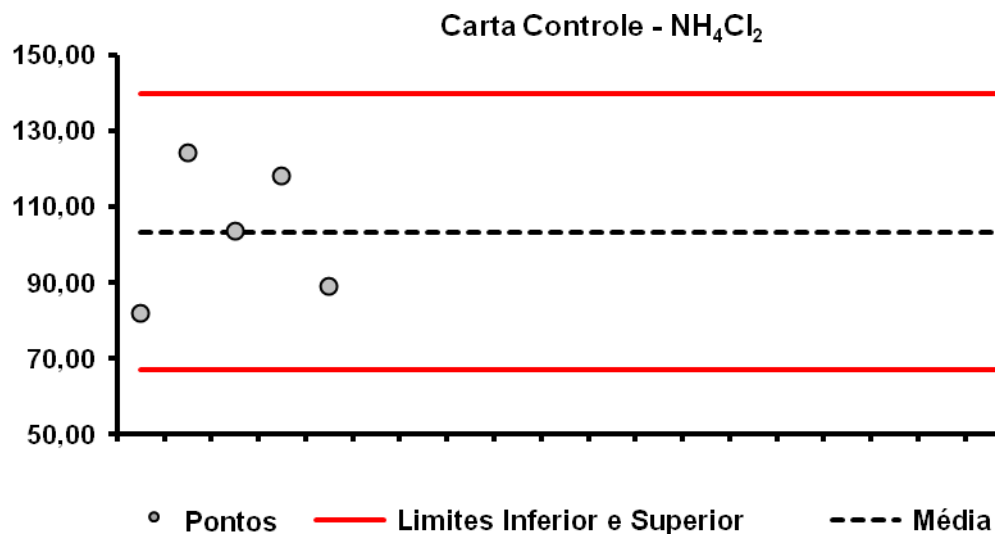
$$\text{Conc. Sol} = 7,9 / 3 \longrightarrow \mathbf{2,6 \text{ mgCd}}$$

APÊNDICE VI. Cartas controle
(*Hyale nigra*) Ensaios fase líquida

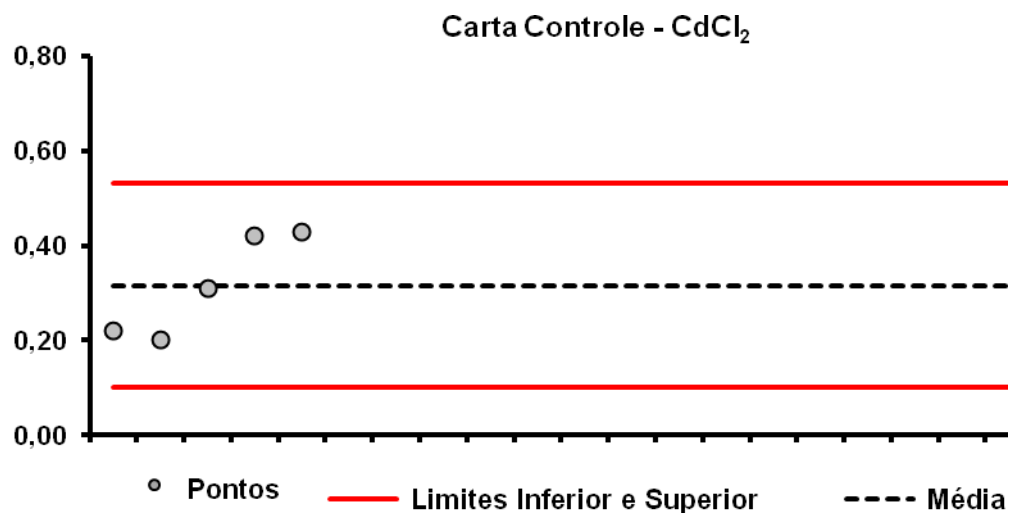
Dicromato de Potássio



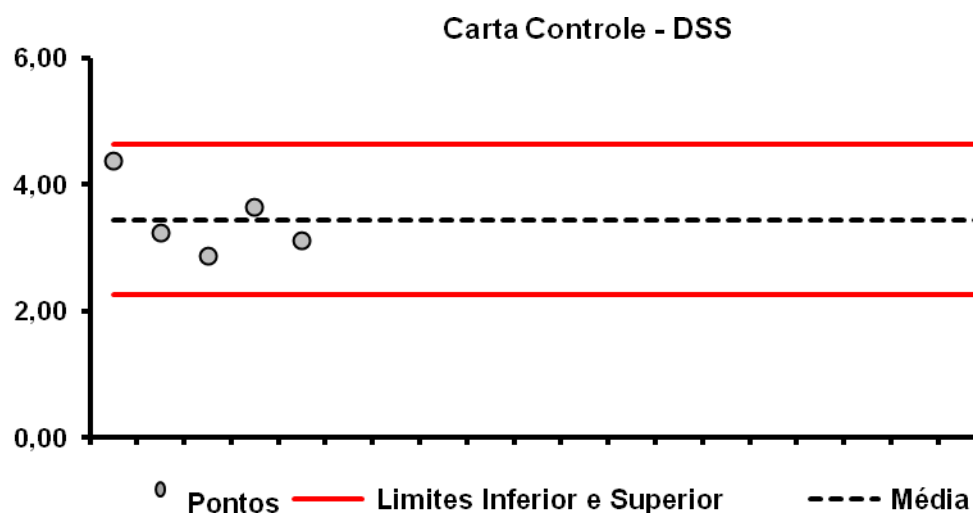
Amônia



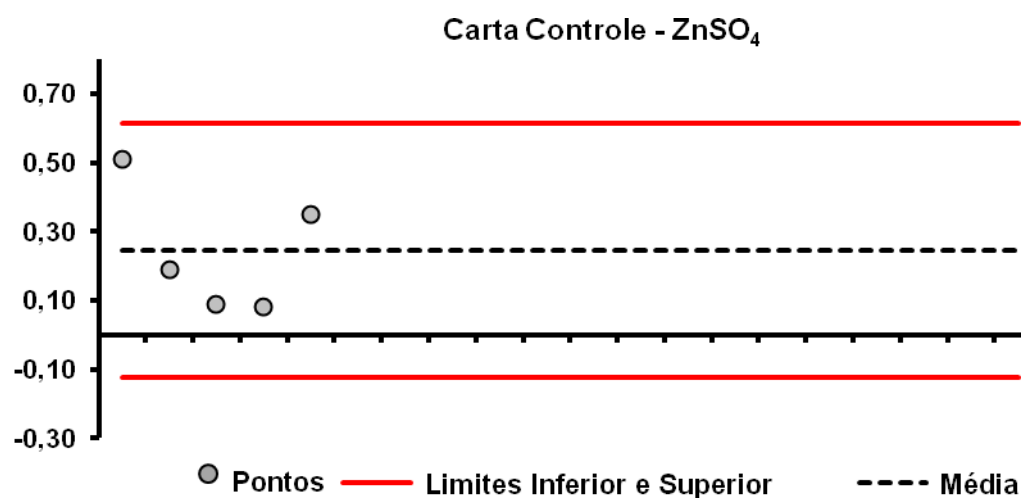
Cádmio



Dodecil Sulfato de Sódio

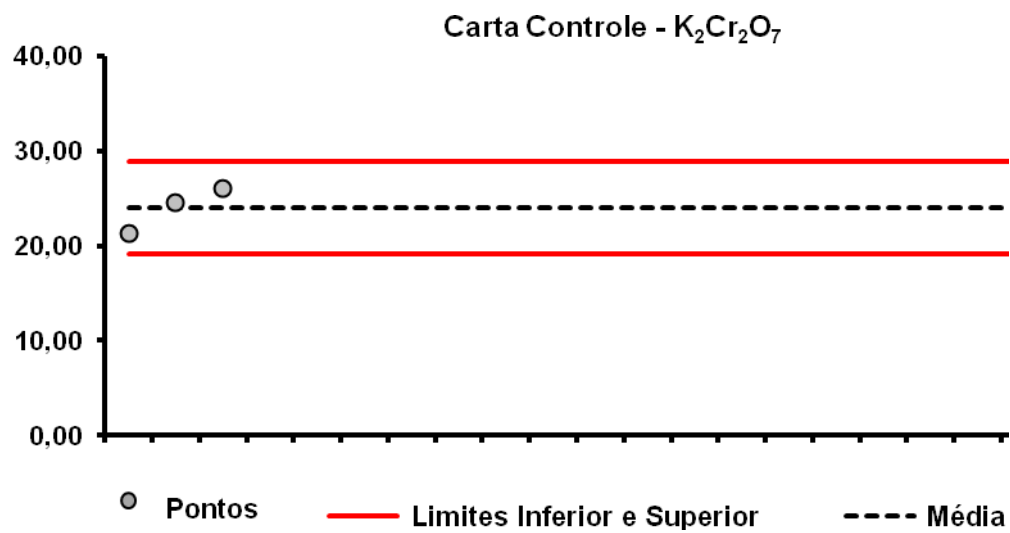


Sulfato de Zinco

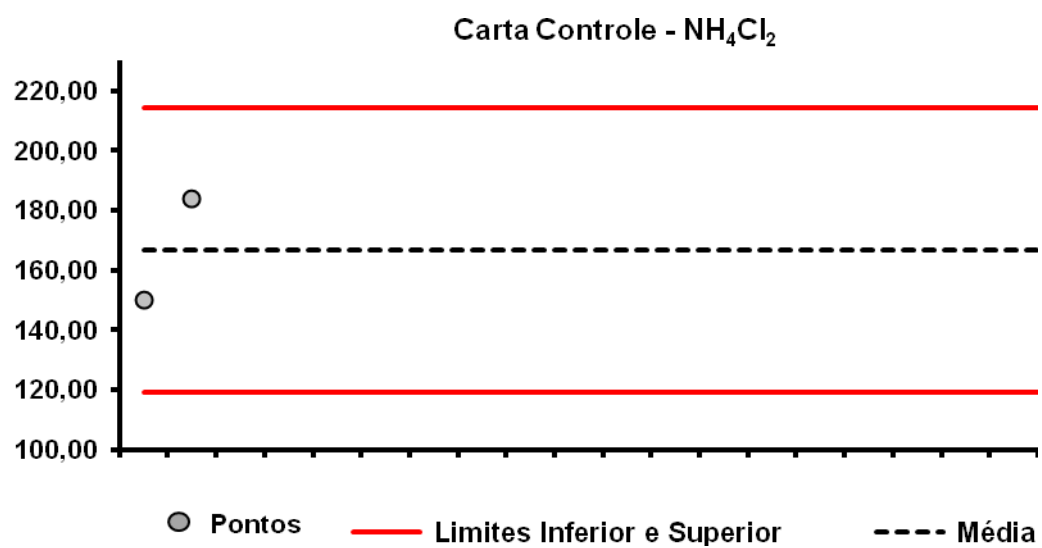


APÊNDICE VII. Cartas Controle
(*Hyale youngi*) Ensaios fase líquida

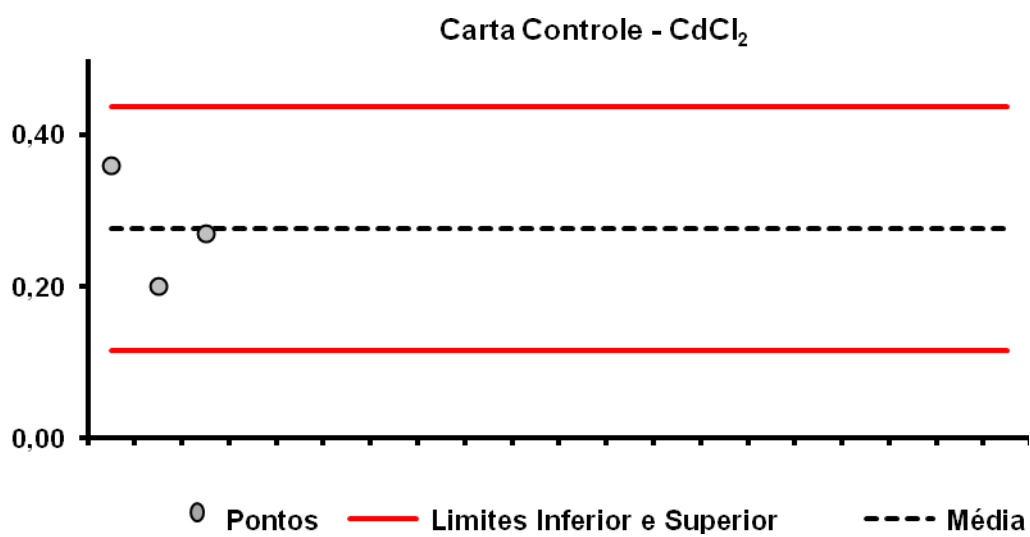
Dicromato de Potássio



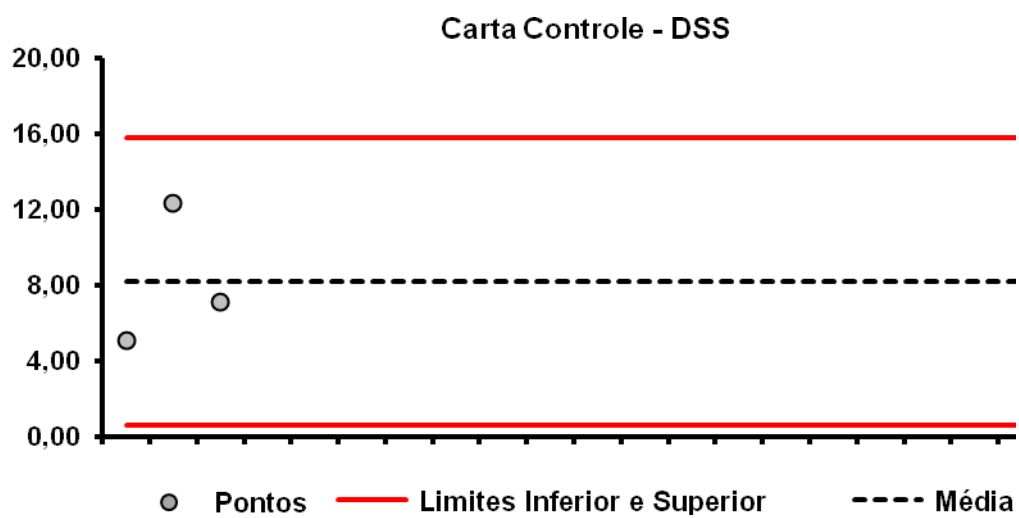
Amônia



Cádmio

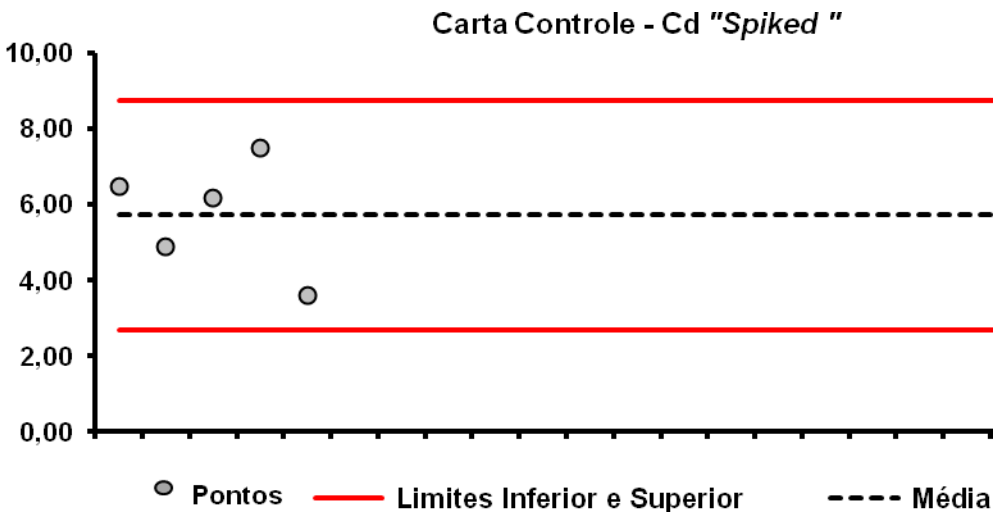


Dodecil Sulfato de Sódio



**APÊNDICE VIII. Carta Controle (*Hyale nigra*)
Sedimento contaminado**

Sedimento-marcado com cádmio



APÊNDICE IX. Modelos de fichas

Caracterização físico-químicas

Departamento de Ecotoxicologia

Ficha de controle – Dados de Mortalidade - Anfípodes

Caracterização dos parâmetros limitantes – Etapa I : Salinidade e T°C

Organismo-teste: <i>H. nigra</i>						T°C: 15°C					
Numero de organismo por réplica: 10						Início:					
Número de réplicas: 3						Término:					
Número de tratamentos: 8											
Alimentação: sim						Responsável: <i>Marina Passarelli</i>					
Sal	1ºd	2ºd	3ºd	4ºd	5ºd	6ºd	7ºd	8ºd	9ºd	10ºd	Total/ mortos
5		30									30/30
10		5		7		1		0		0	13/30
15		6		1		3		0		0	10/30
20		0		1		2		0		1	04/30
25		0		5		1		0		4	10/30
30		0		0		5		1		0	06/30
35		0		0		2		2		2	06/30
40		0		2		0		0		1	27/30

Ensaio de sensibilidade

Departamento de Ecotoxicologia

Ficha de controle – Testes com substância de referência

Sensibilidade - Anfípodes

Organismo-teste: *Hyale nigra*

Teste n°: 1

Substância de referência: NH_4Cl_2

Data de início: 24/03/2012

Hora: 14h10

Data de término: 28/03/2012

Hora: 14h30

N° de orgs por réplica: 5

Resp: Marina Passarelli

Conc. mg.L ⁻¹	R 1				R 2				R 3				R 4			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Controle		0		0		0		1		0		1		0		1
44,44		0		0		0		0		0		0		0		0
66,66		0		1		0		2		0		1		0		2
100		0		3		1		1		0		2		0		3
150		2		3		0		2		0		2		1		1
225		0		5		2		2		3		2		3		2

Análises físico-químicas

Departamento de Ecotoxicologia

Ficha de Controle – Dados Físico-Químicos

Sensibilidade – Anfípodes

Organismo-teste: H. nigra

Teste nº: 04

Substância de referência: DSS

T°C: ± 20

Início: 29/05/12

Hora: 16h30

Término: 02/06/12

Hora: 16h00

Duração: 96h

Responsável: Marina Passarelli

Concentrações mg.L ⁻¹	Físico-químicas Iniciais			Físico-químicas Finais		
	SaL	pH	O.D	SaL	pH	O.D
Controle	36	7,86		36	7,88	
1,2	37	7,83		37	7,86	
1,8	37	7,86		37	7,93	
2,7	36	7,86		37	7,9	
4,05	37	7,88		37	8,03	
6,07	37	7,43		37	7,84	

Observações: Durante o ensaio foi mantido aeração constante em todas as réplicas.

Ensaio de toxicidade

Departamento de Ecotoxicologia

Ficha de Controle – Dados de Mortalidade – Anfípodes

Aplicação em Amostras ambientais

Identificação: Sedimento Controle

Data da coleta: 06/03/2012

Hora: 15h

Organismo-teste: *Hyale youngi*

Nº de organismo por réplica: 10

Nº de réplicas: 3

Tipo de teste: Agudo

Alimentação: sim

T°C: 20°C

Início: 09/03/2012

Término: 19/03/2012

Duração: 10 dias

Responsável: Marina Passarelli

Sedimento Controle	Sobreviventes por réplica (10 dias)			
	R1	R2	R3	(%)
	10	9	9	28/30 - 93%

ANEXOS I. Resultados

Análises Químicas

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 11/4562-0

Contratante: MARINA CUNHA PASSARELLI
Endereço: AV. VICENTE DE CARVALHO, 22 - APTO 1503
Cidade: SANTOS UF: SP
Matriz: Sedimento
Identificação Ecolabor: 649570
Data de entrada na empresa: 22/11/12
Data de emissão do relatório de ensaio: 11/12/12

DADOS DA COLETA

Coletado por: Interessado Local / Identificação: P1
Data: 25/10/2012
Condições: Hora (h): 10:00

RESULTADOS

PARÂMETRO	UNIDADE	LQ	LD	RESULTADOS
Metais				
Cádmio	mg Cd/Kg	0,4	0,1	nd

Obs.

- 1 - LD: Limite de detecção do método
- 2 - LQ: Limite Quantificação do Método.
- 3 - Os resultados encontrados referem-se exclusivamente à(s) amostra(s) enviada(s) pelo interessado.
- 4 - n.d.: - não detectado
- 5 - O plano de amostragem é de responsabilidade do interessado.
- 6 - Padrão de Controle:

Parâmetro	Teórico	Encontrado	Branco	Data Análise
Cádmio	20,0	20,5	nd	3/12/2012

Referências.

- EPA - SW 846

* Registro Conselho Regional de Química - 4ª Região - 9090 - F

* Certificado de Anotação de Responsabilidade - ART - Nº 5916/2012, 2262/2012, 2263/2012, 2264/2012, 2261/2012.

Assinatura: Marina Passarelli - Gerente Geral
CRO 5ª Reg. nº 004036407
Assinatura: Lucas - Gerente Técnico
CRO 5ª Reg. nº 004036407

Este relatório de ensaio só pode ser reproduzido integralmente, a reprodução em parte deve ser somente com autorização prévia por escrito da Ecolabor.

Para obter cópia dos certificados de calibração dos equipamentos, acesse nosso site www.ecolabor.com.br. Os certificados estão disponíveis para download na área de arquivos restritos. Utilize o login "cliente@ecolabor.com.br" e senha "du1ma4".

Este documento foi assinado digitalmente de acordo com a MP nº 2.200-2, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileiras - ICP-Brasil, conferindo presunção de veracidade jurídica em relação aos signatários nas declarações constantes dos documentos em forma eletrônica produzidos com a utilização de processo de certificação disponibilizado pela ICP-Brasil.



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 174562-1

Contratante: MARINA CUNHA PASSARELLI
Endereço: AV. VICENTE DE CARVALHO, 22 - APTO 1503
Cidade: SANTOS **UF:** SP
Matriz: Sedimento
Identificação Ecolabor: 649572
Data de entrada na empresa: 22/11/12
Data de emissão do relatório de ensaio: 11/12/12

DADOS DA COLETA

Coletado por: Interessado **Local / Identificação:** P2
Data: 25/10/2012
Condições: Hora (h): 10:00

RESULTADOS

PARAMETRO	UNIDADE	LQ	LD	RESULTADOS
Metais				
Cádmio	mg Cd/Kg	0,4	0,1	1,3

Obs.

- 1 - LD: Limite de detecção do método
- 2 - LQ.: Limite Quantificação do Método.
- 3 - Os resultados encontrados referem-se exclusivamente à(s) amostra(s) enviada(s) pelo interessado.
- 4 - O plano de amostragem é de responsabilidade do interessado.
- 5 - Padrão de Controle:

Parâmetro	Teórico	Encontrado	Branco	Data Análise
Cádmio	20,0	20,5	nd	3/12/2012

Referências.

- EPA - SW 846

* Registro Conselho Regional de Química - 4ª Região - 9090 - F

* Certificado de Anotação de Responsabilidade - ART - Nº 5916/2012 ,2262/2012 ,2263/2012 ,2264/2012 ,2261/2012.

Sandra Maria Ferreira - Gerente Técnico
CRQ 4ª Reg. nº 004236407
Carlos Alberto Lopes - Gerente Técnico
CRQ 4ª Reg. nº 04327830

Este relatório de ensaio só pode ser reproduzido integralmente, a reprodução em partes deve se dar somente com autorização prévia por escrito da Ecolabor.

Para obter cópia dos certificados de calibração dos equipamentos, acesse nosso site www.ecolabor.com.br. Os certificados estão disponíveis para download na área de arquivos restritos. Utilize o login 'cliente@ecolabor.com.br' e senha 'dufma4'. Este documento foi assinado digitalmente de acordo com a MP nº 2.200-2, que instituiu a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileiras - ICP-Brasil, conferindo presunção de veracidade jurídica em relação aos signatários nas declarações constantes dos documentos em forma eletrônica produzidos com a utilização de processo de certificação disponibilizado pela ICP-Brasil.

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 174562-2

Contratante: MARINA CUNHA PASSARELLI
Endereço: AV. VICENTE DE CARVALHO, 22 - APTO 1503
Cidade: SANTOS UF: SP
Matriz: Sedimento
Identificação Ecolabor: 649573
Data de entrada na empresa: 22/11/12
Data de emissão do relatório de ensaio: 11/12/12

DADOS DA COLETA

Coletado por: Interessado Local / Identificação: P3
Data: 25/10/2012
Condições: Hora (h): 10:00

RESULTADOS

PARAMETRO	UNIDADE	LQ	LD	RESULTADOS
Metais				
Cádmio	mg Cd/Kg	0,4	0,1	1,9

Obs.

- 1 - LD: Limite de detecção do método
- 2 - LQ: Limite Quantificação do Método.
- 3 - Os resultados encontrados referem-se exclusivamente à(s) amostra(s) enviada(s) pelo interessado.
- 4 - O plano de amostragem é de responsabilidade do interessado.
- 5 - Padrão de Controle:

Parâmetro	Teórico	Encontrado	Branco	Data Análise
Cádmio	20,0	20,5	nd	3/12/2012

Referências.

- EPA - SW 846

* Registro Conselho Regional de Química - 4ª Região - 9090 - F

* Certificado de Anotação de Responsabilidade - ART - Nº 5916/2012, 2262/2012, 2263/2012, 2264/2012, 2261/2012.

Sandra Maria Ferreira - Gerente Técnica
CRQ 4ª Reg. nº 004236407
Carlos Alberto Lopes - Gerente Técnico
CRQ 4ª Reg. nº 04327830

Este relatório de ensaio só pode ser reproduzido integralmente, a reprodução em partes deve se dar somente com autorização prévia por escrito da Ecolabor.

Para obter cópia dos certificados de calibração dos equipamentos, acesse nosso site www.ecolabor.com.br. Os certificados estão disponíveis para download na área de arquivos restritos. Utilize o login 'cliente@ecolabor.com.br' e senha 'du1ma4'. Este documento foi assinado digitalmente de acordo com a MP nº 2.200-2, que instituiu a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileiras - ICP-Brasil, conferindo presunção de veracidade jurídica em relação aos signatários nas declarações constantes dos documentos em forma eletrônica produzidos com a utilização de processo de certificação disponibilizado pela ICP-Brasil.



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 174562-0

Contratante:	MARINA CUNHA PASSARELLI		
Endereço:	AV. VICENTE DE CARVALHO, 22 -APTO 1503		
Cidade:	SANTOS	UF:	SP
Matriz:	Sedimento		
Data de entrada na empresa:	22/11/2012		
Data de emissão do relatório de ensaio:	11/12/2012		

PARÂMETROS	MÉTODOS
Cádmio	USEPA SW 846 - Método(s): 3051A e 6010C ITLAB/007

Este relatório de ensaio só pode ser reproduzido integralmente, a reprodução em partes deve se dar somente com autorização prévia por escrito da Ecolabor.
Para obter cópia dos certificados de calibração dos equipamentos, acesse nosso site www.ecolabor.com.br. Os certificados estão disponíveis para download na área de arquivos restritos. Utilize o login "cliente@ecolabor.com.br" e senha "du1ma4".
Este documento foi assinado digitalmente de acordo com a MP nº 2.200-2, que instituiu a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileiras - ICP-Brasil, conferindo presunção de veracidade jurídica em relação aos signatários nas declarações constantes dos documentos em forma eletrônica produzidos com a utilização de processo de certificação disponibilizado pela ICP-Brasil.