

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**O MODELO ANIMAL *QUADRIVISIO* AFF. *LUTZI* (CRUSTACEA,
GAMMARIDEA): ESTUDO DA TOLERÂNCIA A VARIAÇÕES AMBIENTAIS
(SALINIDADE E TEMPERATURA) E CONTRIBUIÇÃO NA PADRONIZAÇÃO
DE BIOENSAIOS**

Helena de Oliveira Souza

Macaé

Março de 2015

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**O MODELO ANIMAL *QUADRIVISIO* AFF. *LUTZI* (CRUSTACEA,
GAMMARIDEA): ESTUDO DA TOLERÂNCIA A VARIAÇÕES AMBIENTAIS
(SALINIDADE E TEMPERATURA) E CONTRIBUIÇÃO NA PADRONIZAÇÃO
DE BIOENSAIOS**

Helena de Oliveira Souza

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Ambientais e Conservação, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Mestre em Ciências Ambientais e Conservação

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-orientador: Moisés Basílio da Conceição

Macaé

Março de 2015.

**O MODELO ANIMAL *QUADRIVISIO* AFF. *LUTZI* (CRUSTACEA,
GAMMARIDEA): ESTUDO DA TOLERÂNCIA A VARIAÇÕES AMBIENTAIS
(SALINIDADE E TEMPERATURA) E CONTRIBUIÇÃO NA PADRONIZAÇÃO
DE BIOENSAIOS**

Helena de Oliveira Souza

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-orientador: Moisés Basílio da Conceição

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Presidente, Profa. Dra. Laura Isabel Weber da Conceição

Membro Titular Interno, Prof. Dr. Albert Luiz Suhett (UEZO)

Membro Titular Externo, Prof. Dr. Manildo M. de Oliveira (IFF)

Membro Suplente Externo, Prof. Dr. Sergio Bolasina (UFRJ)

Membro Suplente Interno, Profa. Dra. Ana Petry (UFRJ)

Macaé

Março de 2015.

Souza, Helena de Oliveira

O modelo animal *Quadrivisio* aff. *lutzi* (Crustacea, Gammaridea): estudo da tolerância a variações ambientais (Salinidade e Temperatura) e contribuição na padronização de bioensaios/Helena de Oliveira Souza - Macaé UFRJ, 2015. xvi, 60 f.: **19** il.; 31 cm.

Orientadora: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-orientador: Moisés Basilio da Conceição

Dissertação (mestrado) – UFRJ/Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2015.

Referências Bibliográficas: f. 52-59

1. Amphipoda. 2. *Quadrivisio*. 3. Salinidade. 4. Temperatura. 5. MMS.

I. Weber, Laura Isabel da Conceição. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação. III. O modelo animal *Quadrivisio* aff. *lutzi* (Crustacea, Gammaridea): estudo da tolerância a variações ambientais (Salinidade e Temperatura) e contribuição na padronização de bioensaios

*Dedico aos meus laços de sangue e coração,
aqueles que estarão incondicionalmente ao meu lado,
minha família, por vocês qualquer esforço vale a pena...*

*“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única
segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de
competência”
(Henry Ford)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção, por ter chegado até aqui e ter permitido conhecer tantas pessoas incríveis e importantes na minha vida, desde minha família até meus amigos. Obrigada por ser o que é: AMOR.

Ao programa PPGCIAC, pela oportunidade de cursar o mestrado. A FAPERJ pelo fomento no projeto e bolsa de incentivo.

A minha querida orientadora Laura Weber (“laurita”) agradeço pela paciência, bom humor, conselhos dentro e fora da vida acadêmica e pela oportunidade e confiança em trabalharmos neste projeto, fiquei muito feliz em me aceitar como sua aluna. Ao meu coorientador Moisés Basílio pela orientação e por encontrar os anfípodas dos bioensaios!.

A professora Ana Petry, pela pré-banca e pelo ótimo exemplo de profissional que tive oportunidade de conhecer na faculdade. Aos professores Manildo Marcião, Albert Suhett, Ana Petry e Sérgio Bolasina por aceitarem o convite para compor a banca e pelas futuras sugestões.

Aos professores Alexandre de Azevedo e Christine Ruta por terem me dado à oportunidade de dar meus primeiros passos na vida acadêmica.

Aos integrantes dos laboratórios integrados de Química, Bioquímica, Limnologia, Biotério, Ciências Morfofuncionais pelo auxílio no uso de equipamentos.

Aos pais Severina e Ednaldo, agradeço muito a Deus por vocês. Obrigada pelo exemplo de responsabilidade com a família, ao amor incondicional e pela prioridade na minha educação, aos meus irmãos Alberto (“beto”, o primeiro da família a me incentivar a ir para Macaé e a convencer meus pais) e Alexandre (“xande”), obrigada por me darem exemplo de responsabilidade, amizade e pelo amor.

A minha cunhada Cleide, por fazer parte da minha família e proporcionar momentos de descontração junto aos meus sobrinhos Alexandra (“xandinha”), Alessandra (“ale”) e Enzo... minha vida ficou mais colorida com a chegada de vocês. Tia Lena ama muito!. Às vezes precisamos abdicar o convívio com quem mais amamos para alçar novos voos... eu fui, mas o meu coração ficou com vocês.

Aos meus queridos “friends” Vagner, Carina, Laís, Letícia, Mariana de Luca, Lígia, Bianca, Rhennã e Matheus, tudo foi muito melhor com vocês. Obrigada por gostarem de mim, simplesmente por eu ser quem sou, não importa o tempo ou a distância, pois, daqui para frente, vocês serão pessoas as quais eu jamais esquecerei.

Gostaria de fazer também um agradecimento especial aos pais dos meus amigos, que tive a oportunidade de conhecer: Nelson, Sueli (“Sócia”), Lindomar, Eduardo, Rosimari e Aldinea. Obrigada pelo carinho e pela educação dada a meus amigos, eu não os teria tal como são, não fosse por vocês.

Aos amigos queridos de laboratório, as estagiárias Carina e Thaís Porto, o meu muito obrigada pela ajuda nos bioensaios, coletas e rotina de laboratório. A “friend” Natália Beraldini, Taine, Arthur Justen e ao mais novo integrante Juan que ajudou antes de passar pela seleção de mestrado. A vocês o meu muito obrigada pela ajuda nas coletas, conversas e pelos momentos de descontração que também foram muito importantes.

A Valdez e Rodolfo pela amizade e oportunidade de trabalharmos juntos durante minha graduação e por mesmo sem saberem influenciarem na escolha de minha área de atuação no mestrado.

A Paulo Romai, que é uma pessoa muito especial, muito obrigada pela companhia, conselhos, paciência e por todo o carinho que eu sei que sente por mim. Você foi muito importante desde a época da graduação e tem um lugarzinho no meu coração.

A todos que direta e indiretamente influenciaram neste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> obtido da lagoa Paulista. Fonte: de L. I. Weber.....	5
Figura 2: Representação dos principais eventos naturais que podem levar à alteração da salinidade nas lagoas costeiras do norte Fluminense. Fonte: Minello (2004).....	7
Figura 3: Mecanismos de transporte de íons pelas brânquias de crustáceos decápodos. Fonte: Romano & Zeng (2012).....	10
Figura 4: Regressão linear da mortalidade acumulada dos anfípodas <i>Q. aff. lutzi</i> durante o Bioensaio I (Piloto) em função do incremento da salinidade no tempo, a cada 48 horas.....	18
Figura 5: Mortalidade acumulada em machos e fêmeas de <i>Q. aff. lutzi</i> no Bioensaio I (Piloto) com o incremento gradual de salinidade ao longo do tempo, a cada 48 h.....	19
Figura 6: Determinação da concentração letal (LC ₅₀) de sal marinho, medida como salinidade da água, para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> como obtido a partir da análise das fêmeas durante o Bioensaio I (Piloto) com incremento gradual da salinidade.....	19
Figura 7: Variação da mortalidade acumulada em função da salinidade em fêmeas e machos de <i>Q. aff. lutzi</i> em 48 h durante o Bioensaio II.....	21
Figura 8: Regressão linear que relaciona a mortalidade acumulada do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> com a salinidade em 48 h durante o Bioensaio II.....	22
Figura 9: Médias da mortalidade acumulada em 48 h, de seis réplicas por gênero de cada tratamento e seus respectivos controles (salinidade de 0,6) em <i>Q. aff. lutzi</i> durante o bioensaio II.....	22
Figura 10: Determinação da concentração letal (LC ₅₀) de sal marinho, avaliada como salinidade, para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> . valor obtido da extrapolação do Probit 5.....	23
Figura 11: Alteração da osmolalidade da hemolinfa do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a diferentes concentrações de sal marinho no meio, avaliado como salinidade. e sua correlação com a variação da osmolalidade do meio.....	25
Figura 12: Mortalidade acumulada do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> na exposição ao incremento e diminuição gradual da temperatura da água a cada 48 h, a partir dos 27°C.....	27
Figura 13: Mortalidade acumulada do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> na interação salinidade e temperatura.....	28
Figura 14: Faixa de tolerância de diferentes espécies de anfípodas. Extraído e modificado de Sumich & Morrisey (2004).	30
Figura 15: Alteração da osmolalidade da hemolinfa do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a diferentes salinidades.....	30
Figura 16: Regressão linear entre mortalidade acumulada do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a diferentes concentrações de MMS.	44

Figura 17: Médias correspondentes aos diferentes tratamentos de MMS.....	45
Figura 18: Extrapolação da concentração letal LC_{50} de MMS para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a partir da função PROBIT.....	45
Figura 19: Mortalidade acumulada do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> nos diferentes meios naturais e artificial.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Condições experimentais realizadas nos bioensaios	13
Tabela 2: Composição de sais e características químicas da água de mar artificial (Natural Ocean, UP-Aqua) para diferentes salinidades a 25° C*	14
Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos controles e nos tratamentos com sal durante o Bioensaio I (Piloto), da tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> ao incremento gradual da salinidade.....	18
Tabela 4: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos controles e nos tratamentos com sal durante o Bioensaio II, da tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> ao incremento não gradual da salinidade.....	20
Tabela 5: Resultados do teste Kruskal-Wallis KW-H na avaliação do efeito da salinidade nas comparações entre controles (C) e tratados (T).....	23
Tabela 6: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos controles e nos tratamentos com sal marinho durante o Bioensaio III, da avaliação da osmolalidade da hemolinfa do anfípodo <i>Q. aff. lutzi</i> em meio com diferentes salinidades.....	24
Tabela 7: Osmolalidade em mmol/Kg do meio e da hemolinfa do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a diferentes salinidades.....	25
Tabela 8: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada durante os Bioensaio IV e V da tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> ao incremento e decrescimento gradual da temperatura. e de sua interação com a salinidade.....	27
Tabela 9: Condições experimentais realizadas nos bioensaios com MMS.....	41
Tabela 10: Componentes do meio básico artificial de acordo com Knie & Lopes (2004).....	42
Tabela 11: Condições experimentais dos bioensaios com meio básico.....	43
Tabela 12: Parâmetros físicos e químicos da água da Lagoa Paulista, utilizadas nos tratamentos da Etapa 1 e 2 antes das concentrações de MMS serem adicionadas.....	43
Tabela 13: Resultados do teste de Mann-Whitney da comparação entre tratamentos de MMS.....	44
Tabela 14: Parâmetros físicos e químicos da água das lagoas (1) Paulista e (2) Carapebus.....	46
Tabela 15: Parâmetros físicos e químicos do meio básico artificial do primeiro (1) e do segundo (2) bioensaio.....	46

RESUMO

O MODELO ANIMAL *QUADRIVISIO* AFF. *LUTZI* (CRUSTACEA, GAMMARIDEA): ESTUDO DA TOLERÂNCIA A VARIAÇÕES AMBIENTAIS (SALINIDADE E TEMPERATURA) E CONTRIBUIÇÃO NA PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS

Helena de Oliveira Souza

Orientador: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-orientador: Moisés Basilio da Conceição

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Invertebrados têm sido amplamente utilizados como modelos animais na área de Ecotoxicologia. A maioria destes organismos são originários de países de clima frio. Informações obtidas com espécies exóticas não permitem fazer previsões para o ambiente local como as espécies nativas. Portanto, o objetivo deste estudo foi contribuir para a padronização e estabelecimento do modelo animal, o anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*, habitante das lagoas costeiras do Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro. Os anfípodas foram coletados nas lagoas costeiras Carapebus e Paulista, localizadas no PARNA Restinga de Jurubatiba/RJ. Os anfípodas foram aclimatados em incubadora a 27°C e fotoperíodo de 12 h, com renovação de água a cada 48 h e alimentados com matéria orgânica vegetal esterilizada e suplemento alimentar comercial. Foram realizados os seguintes bioensaios: 1) de tolerância a diferentes salinidades (0 a 60); 2) a diferentes temperaturas (3 a 39°C); 3) à interação de salinidade de 18 com temperaturas de 27 a 39°C); 4) foi realizado um bioensaio para medição da osmolalidade da água e da hemolinfa dos anfípodas sob diferentes concentrações de sal (salinidades de 0,5 a 39); 5) foi realizado um bioensaio para determinação da toxicidade do controle positivo metil metano sulfonato (MMS); e 6) um para determinar a sobrevivência dos anfípodas em um meio básico artificial. Foram feitas as seguintes análises estatísticas: análises de

regressão linear; ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis para determinar o efeito de salinidade, temperatura, gênero e meio de cultivo; e comparação de médias (Teste de Tukey). Os resultados mostraram que o anfípode é eurialino, tolerando desde 0,2 até 21 de salinidade, com $LC_{50} = 36$; hiper-regulando na faixa de 0,2 a 10 e osmoconformando em salinidades próximas a 21, observando aos 27 de salinidade a perda da homeostase. A faixa de tolerância à temperatura foi de 8°C a 32°C, com maior resistência a temperaturas baixas. No entanto, em salinidade de 18, não houve mortalidade a 35°C, sugerindo interação entre temperatura e salinidade. No bioensaio da avaliação da toxicidade do controle positivo MMS, se obteve que a maior concentração testada sem efeito sobre a mortalidade acumulada do anfípode foi de 10 mg/L, a concentração letal LC_{50} foi de 21,3 mg/L e já em 30 mg/L se observou 100% de mortalidade. A sobrevivência dos anfípodas em meio básico artificial apresentou valores opostos entre anfípodas de diferente procedência. Portanto, não houve resultados conclusivos quanto à utilização do meio básico artificial para cultivo dos anfípodas a longo prazo. Serão necessários maiores estudos para determinar o melhor meio de manutenção dos anfípodas a longo prazo, tais como tempo de aclimação dos anfípodas, alimentação, procedência e composição genética dos anfípodas das diferentes lagoas e sua variação em função das condições ambientais por meio da seleção natural.

Palavras chave: Amphipoda, *Quadrivisio*, Salinidade, Temperatura, MMS.

ABSTRACT

THE ANIMAL MODEL *QUADRIVISIO* AFF. *LUTZI* (CRUSTACEA, GAMMARIDEA): TOLERANCE TO ENVIRONMENTAL CHANGES (SALINITY AND TEMPERATURE) AND A CONTRIBUTION TO BIOASSAY STANDARDIZATION

Helena de Oliveira Souza

Orientador: Laura Isabel Weber da Conceição

Co-orientador: Moisés Basilio da Conceição

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Invertebrates have been widely used as animal models in Ecotoxicology. Most of them corresponds to species from temperate countries. Information about exotic species do not allow doing prediction like local and native species do. Therefore, the aim of this study was to contribute for the standardization and establishment of the animal model, the amphipod *Quadrivisio* aff. *lutzi*, inhabiting the coastal lagoons of the Fluminense North of Rio de Janeiro State. Amphipods were collected from the coastal lagoons of Carapebus and Paulista, localized at the PARNA Jurubatiba/RJ. Amphipods were acclimatized at 27°C and photoperiod of 12 h, with water exchange every 48 h and fed with sterilized vegetal organic matter and commercial food supplement. The following bioassays were performed: 1) amphipod tolerance to different salinities (0 a 60); 2); tolerance to different temperatures (3 a 39°C); 3) interaction of salinity of 18 temperatures from 27 a 39°C); 4) an other bioassay was done for the obtention of the water osmolality and the amphipod hemolymph osmolality at different salinities (salinities of 0,5 a 39); 5) it was performed a bioassay for evaluating the toxicity of the positive control Methyl Methane Sulphonate (MMS); 6) an other bioassay was done for evaluating survival at an artificial basic mean for amphipod maintenance at long term.

The following statistical analysis were performed: linear regression analysis; Non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis to determine the effect of salinity, temperature, gender and medium for culture; mean comparisons (Tukey Test). The results showed that the amphipod is an eurihaline species, tolerating a salinity range from 0.2 to 21, with a lethal concentration of $LC_{50} = 36$; hiperregulating in the salinity range from 0.2 to 10, osmocomforming at salinities close to 21, and loosing homeostasis at a salinity of 27. The temperature range of tolerance of *Q. aff. lutzi* is from 8°C a 32°C, with higher resistance to low temperature in 48 h. Nevertheless, no mortality was observed at temperature of 35°C when salinity was maintained at 18, suggesting an interaction between salinity and temperature. In the evaluation of MMS toxicity, it was obtained that the highest concentration tested without effects on the amphipod was 10 mg/L, with lethal concentration of $LC_{50} = 21,3$ mg/L and 100% mortality at 30 mg/L MMS. The survival of amphipods in artificial basic medium presented opposing values between amphipods from different sources. Therefore, no conclusive results were obtained for the basic artificial medium for long term culture of the amphipods. Further studies will be necessary in order to find the best conditions for long term maintenance of amphipods in the laboratory, such as resolving acclimatization time of amphipods, feeding, origin and genetic composition from different lagoons and their variation in function to environmental condition by means of natural selection.

Keywords: Amphipoda. *Quadrivisio*, Salinity. Temperature. MMS.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
SUMÁRIO.....	xiv
1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Modelos animais e sua importância	1
1.2 Crustáceos como modelos animais.....	2
1.3 O anfípode <i>Quadrivisia aff. lutzi</i>	3
1.4 OBJETIVO GERAL.....	5
CAPÍTULO I.....	6
2.0 ESTUDO DA TOLERÂNCIA E RESPOSTA DO ANFÍPODE <i>QUADRIVISIO AFF. LUTZI</i> FRENTE A VARIAÇÕES DE SALINIDADE E TEMPERATURA.....	6
2.1 INTRODUÇÃO.....	6
2.1.1 Tolerância dos crustáceos às variações de salinidade.....	6
2.1.2 Adaptações fisiológicas e bioquímicas dos crustáceos às variações de salinidade.....	7
2.1.3 Tolerância dos crustáceos às variações de temperatura.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
2.3 METODOLOGIA.....	12
2.3.1 Coleta e manutenção dos anfípodas.....	12
2.3.2. Bioensaios de tolerância a diferentes salinidades.....	12
2.3.2.1 Preparação de água com diferentes concentrações de sal.....	13
2.3.2.2 Bioensaio I: Determinação da tolerância a salinidade sob incrementos graduais.....	14

2.3.2.3 Bioensaio II: Determinação da faixa de tolerância a salinidade sem incrementos graduais.....	14
2.3.2.4 Bioensaio III: Determinação da osmolalidade do meio e da hemolinfa do anfípode a diferentes concentrações.....	15
2.3.2.5 Bioensaios IV e V: Determinação da faixa de tolerância à temperatura com variações graduais.....	15
2.3.2.6 Bioensaio VI: Determinação da interação da salinidade na tolerância a temperaturas elevadas.....	16
2.3.2.7 Análises estatísticas.....	16
2.4 RESULTADOS.....	17
2.4.1 Bioensaio I (piloto): tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> à salinidade com incremento gradual de salinidade.....	17
2.4.2 Bioensaio II: tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> à salinidade sem incremento gradual....	20
2.4.3 Bioensaio III: Avaliação da osmolalidade da hemolinfa e do meio a diferentes salinidades.....	24
2.4.4 Bioensaio IV e V: Tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> à diminuição e aumento gradual de temperatura.....	26
2.4.5 Bioensaio VI: Avaliação do efeito da interação entre salinidade e temperatura sobre o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i>	27
2.5 DISCUSSÃO	28
2.5.1 Tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a variações de salinidade.....	29
2.5.2 Tolerância do anfípode <i>Q. aff. lutzi</i> a variações de temperatura.....	31
2.6 CONCLUSÕES.....	32
CAPÍTULO II	34
3.0 CONTRIBUIÇÃO PARA A PADRONIZAÇÃO DO ANFÍPODE <i>QUADRIVISIO</i> AFF. <i>LUTZI</i> EM BIOENSAIOS DE ECOTOXICOLOGIA.....	34
3.1 INTRODUÇÃO.....	34
3.1.1 A Toxicologia e Ecotoxicologia.....	34
3.1.2 Testes ecotoxicológicos.....	35

3.1.2.1 Testes ecotoxicológicos em crustáceos.....	36
3.1.3 Substâncias de referência e controles positivos em ensaios ecotoxicológicos.....	36
3.1.3 Metil metano sulfonato (MMS).....	37
3.1.4 Meios artificiais para cultivo de invertebrados.....	38
3.1.4.1 Modelos animais crustáceos e seus meios básicos artificiais.....	39
3.1.5 Padronização de testes com o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i>	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.3 METODOLOGIA.....	40
3.3.1 Determinação do LC ₅₀ do MMS para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i>	40
3.3.2 Determinação de um meio artificial para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i>	41
3.4 RESULTADOS.....	43
3.4.1. Concentração letal LC50 do MMS para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i>	43
3.4.2 Meio artificial para o anfípode <i>Q. aff. lutzi</i>	45
3.5 DISCUSSÃO.....	47
3.6 CONCLUSÕES.....	50
4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO I: NORMAS TÉCNICAS SOBRE ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE	

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Modelos animais e sua importância.

A observação do comportamento e das reações dos organismos no contato com produtos químicos contaminantes, particularmente da água, levou no século XIX a se considerar o emprego de organismos como indicadores de impactos ambientais (Knie & Lopes, 2004). Houve ao passar do tempo o aprimoramento das técnicas em laboratório de manutenção destes organismos. Muitos grupos de animais foram utilizados e se mostraram como organismos com potencial para experimentos. Hoje, existem organismos modelos para cada nível trófico.

Modelos animais são organismos testes utilizados em bioensaios, que permitem determinar os efeitos a diferentes níveis de algum componente físico ou químico. Diversas são as características necessárias para que se estabeleça um modelo padronizado. Um bom modelo animal necessita apresentar uma sensibilidade relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo assim repetir e reproduzir os resultados (Knie & Lopes, 2004; Zagatto & Bertolotti, 2006). Para tanto, são necessários conhecimentos prévios da biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para cultivo quanto para a realização dos testes (Zagatto & Bertolotti, 2006). Quando a espécie apresenta condições, ou possibilidade de manutenção, ou existem técnicas disponíveis em cultivo em laboratório, seu uso se torna altamente recomendável (Knie & Lopes, 2004; Zagatto e Bertolotti, 2008). Além disso, o uso de espécies de pequeno porte e ciclo de vida curto é ideal aos estudos ecotoxicológicos em laboratório. Situam-se neste contexto, os cladóceros como *Daphnia* e *Ceriodaphnia*, cujo cultivo em laboratório está bem estabelecido e não apresenta muitas dificuldades para sua manutenção (Zagatto e Bertolotti, 2008).

Esses organismos modelos são classificados como bioindicadores. O bioindicador apresenta algumas definições. Dentre estas, um bioindicador é tido com um ser vivo utilizado em bioensaios, para determinação do efeito biológico de alguma substância, fator ou condição (Knie & Lopes, 2004), ou como um organismo característico de diferentes estados de poluição da água (Knie & Lopes, 2004). Os bioindicadores são ferramentas importantes no biomonitoramento. O

Biomonitoramento, por sua vez é composto de um sistema de testes para a detecção de substâncias tóxicas nos organismos selecionados (Knie & Lopes, 2004).

Os grupos de animais invertebrados utilizados como modelos animais são variados e encontra-se em diferentes níveis tróficos. Dentre os principais grupos entre os consumidores primários, encontramos os protozoários e rotíferos; entre os consumidores secundários temos os crustáceos, moluscos, anelídeos e equinodermos; entre os consumidores terciários estão os peixes; e entre os decompositores são destacados os fungos e bactérias (Zagatto & Bertoletti, 2006).

1.2 Crustáceos como modelos animais.

Crustáceos tem sido amplamente utilizados como bioindicadores e biomonitores em vários sistemas aquáticos (Rinderhagen *et al.*, 2000). Alguns crustáceos já são considerados como bons modelos de estudo devido a sua sensibilidade, boa manutenção em laboratório, ciclo de vida curto e representatividade significativa devido ser base da alimentação de larvas de peixes e outros crustáceos (Zagatto & Bertoletti, 2006; Ruppert & Barnes, 2005). Os crustáceos apresentam espécies bem estabelecidas como modelos animais. Magalhães & Filho (2008) citam as normas APHA (1998, Anexo I) e USEPA (2002, Anexo I), onde encontram-se os grupos Cladocera (*Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia pulex* e *Daphnia magna*). Na norma ASTM (2000, Anexo I) é citado o grupo Amphipoda (*Hyalella azteca*) e Zagatto & Bertoletti (2006) citam a norma ABNT (2005, Anexo I) onde encontra-se o grupo Mysidacea

Segundo Martins & Bianchini (2011), a maioria dos crustáceos utilizados em bioensaios no Brasil é exótica. As espécies nativas de crustáceos estão representadas por *C. silvestrii* e *D. laevis* em poucos trabalhos, enquanto as exóticas que mais se destacam são: *D. magna*, *D. similis* e *C. dubia*. Estas últimas apresentam características importantes para modelos animais, principalmente pela fácil manutenção em laboratório, fisiologia, genética e comportamentos bastante conhecidos, o que torna os resultados padronizados.

Apesar destas características, trabalhos apontam que espécies de crustáceos nativos podem apresentar sensibilidade semelhante ou até maior em comparações a outros organismos exóticos. No caso dos crustáceos, o estudo de Castro *et al.* (2009),

mostrou que o copépode nativo *Tisbe biminiensis* apresentou maior sensibilidade ao dicromato de potássio, em relação aos exóticos *T. holothuriae* e *Palaemon elegans*.

Abessa *et al.* (1998), através de estudos com o anfípode nativo de estuário da região de Santos, *Tiburonella viscana*, constataram que esta espécie é tão sensível a sedimentos marinhos contaminados quanto outras espécies exóticas já padronizadas como *Rhepoxynius abronius* e *Grandidierella japonica*. A utilização desta espécie nativa, representa vantagens comparando-se com as espécies exóticas, como a não necessidade de gastos na comercialização e manutenção do animal em laboratório para se iniciar um experimento.

1.3 O anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*.

O gênero *Quadrivisio* foi descrito primeiramente por Stebbing (1907) e caracterizado por quatro olhos bem desenvolvidos. Este gênero foi recentemente transferido da família Melitidae para a família Maeridae (Lowry & Hughes, 2009).

Apenas seis espécies são classificadas no gênero (Lowry & Springthorpe, 2005): 1) *Q. bengalensis* Stebbing (1907), a partir do qual o gênero foi descrito pela primeira vez em Port Canning, Lower Bengal, Índia; 2) *Q. lutzi*, descrito para Georgetown, Guyana por Shoemaker (1933) pelo gênero *Pseudoceradocus* e nomeado como *Quadrivisio occidentalis* de Bonaire e Aruba por Stephensen (1933); 3) *Q. aviceps* Barnard (1940), encontrado na confluência das marés com águas fluviais na África do Sul; 4) *Q. bousfieldi* Karaman & Barnard (1979), encontrado no rio Liei da Ilha Manus do arquipélago de Bismark; 5) *Q. lobata* Asari (1983), encontrado na Índia; e 6) *Q. sarina* Lowry & Springthorpe (2005), uma espécie marinha encontrada em Sarina, Austrália. O anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi* foi encontrado nas lagoas costeiras do sudeste do Brasil, no estado do Rio de Janeiro e São Paulo (Leite *et al.*, 1980; Henriques-de-Oliveira *et al.* 2007, Weber *et al.*, 2013).

Q. aff. lutzi (Shoemaker, 1933) (Fig. 1) habita lagoas costeiras no sudeste do Brasil (Leite *et al.*, 1980; Henriques-de-Oliveira *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2013), muitas das quais são ambientes ricos em ácidos húmicos (Leite *et al.*, 1980; Henriques-de-Oliveira *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2013; Suhett, 2007; Esteves 2011). Esta é uma das muitas espécies de crustáceos que colonizaram ambientes de água doce e

apresentam grande importância na cadeia trófica destes ecossistemas. O anfípode *Q. aff. lutzii* é um decompositor de detritos vegetais e consumidor orgânico animal.

Esta espécie é dióica assim como todos os anfípodes. Os machos fertilizam os ovos externamente na bolsa marsupial das fêmeas. A ausência de uma fase larval de vida livre e a incubação do jovem pela fêmea em uma bolsa são características de todos os crustáceos peracáridos (Lincoln, 1979). O dimorfismo sexual é evidente no tamanho do corpo (fêmeas são menores do que os machos) e o tamanho do segundo par de gnatópodos dos machos é maior do que o das fêmeas.

A espécie é encontrada em algumas das lagoas costeiras do sul fluminense, localizadas no PARNA da Restinga de Jurubatiba. Estas lagoas, são ambientes altamente instáveis, com alta variação no influxo de água do mar, através do rompimento (natural ou antrópico) das barreiras de areia que isolam as lagoas do mar (Esteves, 1998). Essas lagoas são adjacentes à bacia marinha de Campos, uma área de produção *off-shore* de petróleo com alto tráfego de navios de petróleo. Algumas das lagoas também estão sujeitas à contaminação com resíduos antropogênicos como por exemplo, esgoto doméstico (Henriques-de-Oliveira *et al.* 2007). Portanto, é importante identificar as espécies locais que possam servir como indicadores de variação ambiental nestes ecossistemas e que permitam avaliações das respostas biológicas aos poluentes. Com este objetivo, o anfípode *Quadrivisia aff. lutzii* foi recentemente identificado como um potencial modelo de invertebrado para avaliar a variação ambiental e poluição nessas lagoas (Weber *et al.*, 2013). Esta espécie apresenta ovos pequenos, com fêmeas que amadurecem a pequenos tamanhos (0,3-0,4 mm comprimento do corpo), alta fecundidade ($20,2 \pm 9,2$ ovos/fêmea) e com iteroparidade como uma adaptação a seu ambiente altamente instável (Medeiros & Weber, submetido).



Figura 1: Exemplar do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi* obtido da lagoa Paulista. Foto de L. I. Weber.

As lagoas costeiras habitadas por estes indivíduos localizadas no PARNA da restinga de Jurubatiba, estão constantemente expostas a variações de salinidade devido entrada da água do mar (natural ou antrópica) ou por períodos de estiagem. As variações de salinidade das lagoas neste local de estudo apresentam valores desde 0,2 a 32,15 de salinidade (Ventura, 2015). A temperatura nestes ambiente também varia durante o dia e entre períodos de estiagem e pluviosidade. Portanto, é de grande interesse conhecer as faixas de tolerância dos parâmetros de temperatura e salinidade do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*.

1.4 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação é contribuir com o conhecimento sobre as faixas de tolerância do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi* frente a fatores ambientais aos quais estes animais estão submetidos constantemente: salinidade e temperatura e gerar avanços na padronização desta espécie como modelo animal para testes de Ecotoxicologia.

CAPÍTULO I

2.0 ESTUDO DA TOLERÂNCIA E RESPOSTA DO ANFÍPODE *QUADRIVISIO* AFF. *LUTZI* FRENTE A VARIAÇÕES DE FATORES AMBIENTAIS (SALINIDADE E TEMPERATURA)

2.1 INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 30 filos de crustáceos, todos de origem marinha (Augusto 2005). Dentre estes, dezesseis filos invadiram a água doce (Lee & Bell, 1999), como é o caso do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*. Testes que envolvem a tolerância de crustáceos à salinidade podem ser importantes para elucidar os mecanismos de sua evolução, bem como para fornecer dados preditivos em um cenário de mudança ambiental.

2.1.1 Tolerância dos Crustáceos às variações de salinidade.

Entende-se por salinidade a concentração de sais minerais dissolvidos em água, que corresponde ao peso, em gramas, dos sais presentes em 1kg de água, destacando-se o cálcio, magnésio, sódio, potássio, bicarbonato, cloreto e sulfato (Esteves, 2011). Segundo a Resolução do CONAMA nº 357, os ambientes são classificados como: dulcícolas, com salinidade igual ou inferior a 0,5; salobros, com salinidade superior a 0,5 e inferior a 30; e marinhos, com salinidade igual ou superior a 30.

A salinização de ecossistemas pelo aumento da concentração de sais ocasionado de forma natural ou antrópica, tem sido diagnosticada como um problema ambiental que irá aumentar ao decorrer do tempo (Williams, 1999). Os ecossistemas de lagoas costeiras, onde habita a espécie de anfípode *Q.* aff. *lutzi*, estão submetidos a mudanças dos valores de salinidade, devido a eventos naturais. São exemplos destes eventos a variação da pluviosidade, da taxa de evaporação, da entrada de água do mar ou percolação pela barra de areia pelas ressacas e pelo “spray” marinho (Minello, 2004). O aumento da salinidade em águas doces pode ser também ocasionado por ações antrópicas como abertura de barra, construção de portos, descargas de fertilizantes

(Silva *et al.*, 2000; Piscart *et al.*, 2005) e utilização de sal para remoção de gelo e neve (Blasius & Merritt, 2002).

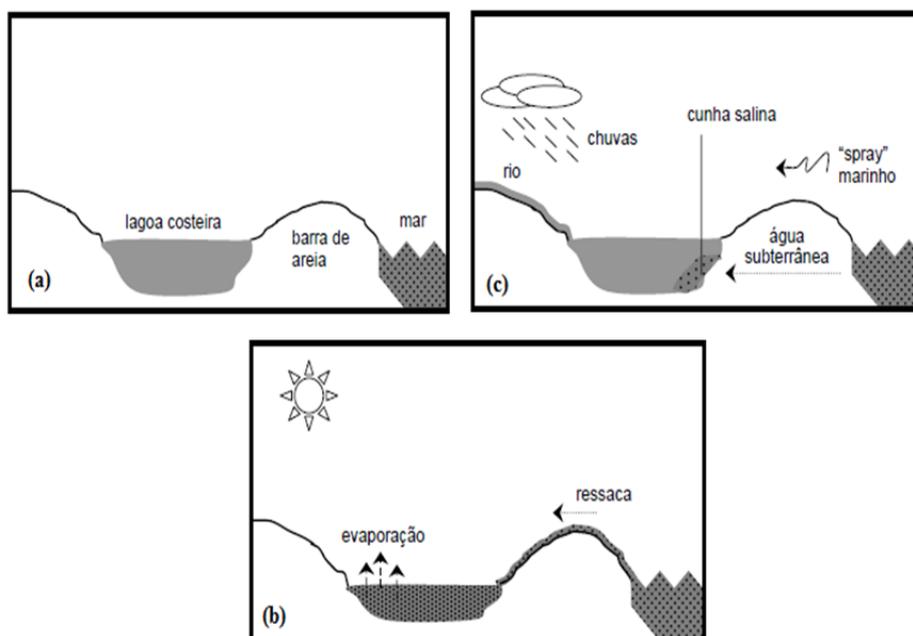


Figura 2: Representação dos principais eventos naturais que podem levar à alteração da salinidade nas lagoas costeiras do norte Fluminense. Extraído e modificado de Minello (2004).

2.1.2 Adaptações fisiológicas e bioquímicas dos crustáceos às variações de salinidade.

Os crustáceos podem ser classificados em função de sua tolerância às variações de salinidade como eurialinos, quando toleram amplas variações de salinidade e como estenoalinos, quando toleram uma faixa estreita de salinidades. Em função de sua capacidade reguladora, podem ser classificados como osmoconformadores, quando a osmolaridade do meio interno se mantém similar à do meio externo; e como osmorreguladores, quando a osmolaridade é mantida constante, mesmo que ocorra variação no meio externo. Os líquidos internos (ex. hemolinfa e da excreção) podem se encontrar em relação ao meio externo em condição isosmótica, com concentração interna igual à do meio; hiposmótica, com menor concentração interna em relação ao meio; ou hiperosmótica, com concentração maior que o meio.

Durante sua evolução os crustáceos desenvolveram uma série de características, as quais permitiram a otimização na sua exploração em diferentes ambientes aquáticos. Entre estas, podemos citar as adaptações fisiológicas (permeabilidade corporal, absorção e reabsorção de sal), morfológicas (estrutura branquial), bioquímicas (aumento ou redução da atividade de enzimas ionotransportadoras), reprodutivas (desenvolvimento larval abreviado) e comportamentais (migração entre água doce e salobra). As adaptações fisiológicas e bioquímicas apresentam grande relevância na conquista do ambiente de água doce, uma vez que participam dos processos de hiper-regulação da osmolalidade da hemolinfa, o que compensa a perda passiva de íons e o ganho osmótico de água, mantendo a osmolalidade da hemolinfa maior que a do meio externo (Augusto, 2005). Segundo Nielsen (2013), a molalidade refere-se a um componente específico de uma solução ou fluido biológico, o que difere da molaridade que refere-se ao volume total dos solutos de uma solução ou fluido biológico (Nielsen, 2013), sem portanto a necessidade do conhecimento de solutos específicos.

Os crustáceos de água doce, salobra e salgada apresentam diferenças na permeabilidade corporal. Os crustáceos de água mais salgada, apresentam uma maior permeabilidade corporal, permitindo o fluxo passivo de íons e água. Já nos crustáceos de água mais doce há a redução dessa permeabilidade, o que proporciona menos gasto de energia, que ocorreria para compensar a redução de sal (Potts & Parry, 1964). Além da permeabilidade corporal, existem dois órgãos responsáveis para esta adaptabilidade: As brânquias e as glândulas antenais. Estes órgãos participam da hiper-regulação da osmolalidade da hemolinfa, característica importante que permitiu a adaptabilidade em água doce. Este mecanismo compensa a constante perda passiva de íons e o ganho osmótico de água, mantendo a osmolalidade da hemolinfa maior que a do meio externo.

A estrutura básica das brânquias inclui células que são separadas da hemolinfa por uma membrana no lado basal e coberta por uma cutícula no lado apical. A superfície baso-lateral possui invaginações associadas a numerosas mitocôndrias, enquanto a superfície apical é normalmente composta por canais e microvilos (Mantel & Farmer, 1983 apud Augusto A. S. 2005). Além da absorção de sais, o tecido branquial participa de trocas gasosa e excreção de resíduos nitrogenados (Taylor & Taylor, 1992; Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2006).

A glândula antenal dos crustáceos participa de mecanismos de reabsorção e excreção de urina menos ou mais concentrada (dependendo do meio). A glândula antenal é composta por um saco celômico (celomosaco), um canal ou poro excretor de comprimento variável entre as espécies e um pequeno duto de saída abaixo da inserção da segunda antena. As paredes do celomosaco apresentam células semelhantes às dos glomérulos de vertebrados e é através delas que ocorre a filtração da hemolinfa para o lúmen do saco terminal. O processamento do filtrado, a secreção seletiva e/ou reabsorção ocorrem dentro do canal excretor (Ruppert & Barnes, 2005,1996; Freire *et al.*, 2006). Há trabalhos que mostram o aumento da produção urinária quando crustáceos são expostos a meios mais diluídos, pelo menos em algumas espécies (Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2006).

Em crustáceos, a regulação se dá por conta de dois processos: fase (1) Regulação Anisomótica Extracelular (RAE), a qual implica na manutenção da osmolalidade (concentração de soluto em mMoles/kg de água) da composição da hemolinfa e fase (2) Regulação Isomótica Intracelular (RII), que consiste na manutenção do volume e composição do meio intracelular (Latterza, 2012).

Os mecanismos de transporte de íons em crustáceos pelas brânquias estão representados na Figura 3. A hiper-regulação se dá pelo mecanismo RAE, através da absorção de sal pelo epitélio das brânquias. Este mecanismo é intermediado por várias enzimas como a Na⁺/K⁺-ATP-ase, V-ATPase e anidrase carbônica. Em crustáceos hiporeguladores a Na⁺,K⁺,2Cl⁻ (Figura 3) que está localizada na base apical, pode transportar íons pra o meio externo, através da atividade da enzima ATPase Na⁺/K⁺ (4) (Augusto, 2005).

Em relação à concentração iônica, estudos mostram que pode haver diferença entre os gêneros masculinos e femininos (Buikema & Benfield, 1979; Sornom, 2010). Anfípodas fêmeas despendem maior gasto de energia durante a oogênese, sendo considerados mais sensíveis que os machos (Buikema & Benfield, 1979).

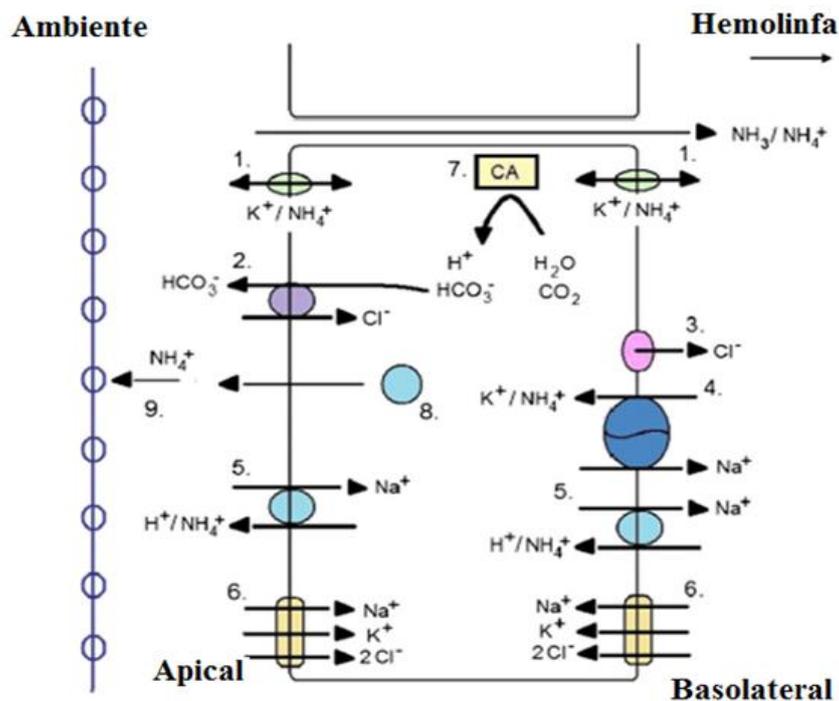


Figura 3: Mecanismos de transporte de íons pelas brânquias de crustáceos decápodos: 1. Canal de potássio; 2. Permutador $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$; 3. Canal de Cloreto; 4. Na^+/K^+ ATPase; 5. Intercambiador Na^+/H^+ ; 6. Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. Extraído e modificado de Romano & Zeng (2012).

2.1.3 Tolerância dos crustáceos às variações de temperatura.

A temperatura pode ser um parâmetro indicador da qualidade da água. Sob temperaturas elevadas, há o aumento de reações químicas que podem diminuir a solubilidade de gases e aumentar a taxa de transferência dos mesmos (Von Sperling, 2005). Além disso, as alterações de temperatura estão associadas também a outro fator abiótico, como a salinidade (Wijnhoven, 2003). Alguns trabalhos mostram que estas interações podem afetar a sobrevivência de anfípodes (Sornom, 2010).

Em relação a temperatura, os organismos podem ser considerados como endotérmicos, quando dependem da produção metabólica de calor (crescimento celular, consumo de O_2 e outras funções fisiológicas coletivamente) para manter suas temperaturas corpóreas (Sumich & Morrissey, 2004), como ocorre em aves e mamíferos

ou ectotérmicos, onde a temperatura corporal, varia e é amplamente controlada pela temperatura do ambiente (Sumich & Morrisey, 2004), como ocorre em peixes, anuros, e na maioria dos invertebrados. Além desta classificação, os organismos podem ser classificados como euritérmicos, sendo capazes de tolerar ampla faixa de variação da temperatura ou estenotérmicos tolerando uma pequena variação (Odum, 2007).

Os invertebrados são animais ectotérmicos (Sumich & Morrisey, 2004). O metabolismo destes animais em temperaturas mais baixas diminui, o que implica no retardo dos movimentos e crescimento. O trabalho feito com o anfípode de águas geladas *Gammarus oceanicus* (Aarset & Zachariassen, 1988), discute que a baixa temperatura diminui a permeabilidade corporal do animal. Esta baixa permeabilidade pode bloquear a interação do organismo retardando danos celulares. Já em temperaturas mais elevadas, há maior taxa metabólica, aumento nos movimentos de hiperventilação (batimentos branquiais) e batimentos cardíacos, nutrição, movimentação e crescimento. Em contrapartida, a menor disponibilidade de oxigênio na água devido à evaporação pode ocasionar a mortalidade de animais. Desta forma, o trabalho pretende determinar as faixas de tolerância à salinidade e temperatura do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar a faixa de tolerância à salinidade do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*.
- 2) Determinar a concentração letal (LC₅₀) de salinidade para o anfípode *Q.* aff. *lutzi*.
- 3) Determinar as fases de resposta fisiológica sob o estresse osmótico do anfípode *Q.* aff. *lutzi*.
- 4) Determinar a faixa de tolerância a temperatura do anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi*.
- 5) Avaliar o efeito da interação entre salinidade e temperatura.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Coleta e manutenção dos anfípodes.

Anfípodes da espécie *Quadrivisio* aff. *lutzi* (Fig. 1) foram obtidos na lagoa Carapebus (22°15'7,4"S e 41°35'3,2"W) e lagoa Paulista (22°13'52,6"S e 41°32'14,2"W), localizadas na planície costeira de origem fluvial do norte do estado de Rio de Janeiro. A formação destas lagoas, ocorreu pela deposição de um banco de areia (barra) por sedimentação, que determinou a separação do oceano (Farjalla *et al.*, 2002; Esteves, 2011). As lagoas Carapebus e Paulista estão localizadas no PARNA da restinga de Jurubatiba e apresentam junto com as demais lagoas desta região, grande relevância ecológica e científica (Esteves, 2011).

Os anfípodes encontram-se associados às raízes de macrófitas aquáticas. Após a coleta, os anfípodes foram acondicionados em caixas plásticas com água e vegetação e transportados até o laboratório. Os anfípodes foram cuidadosamente retirados da água com auxílio de uma pipeta. A água das lagoas também foi coletada (15 L por coleta), sendo a temperatura medida com o auxílio de um termômetro de mercúrio no local da coleta. Durante a triagem, os anfípodes foram separados por sexo e acondicionados em becker de 600 mL com água da lagoa e alimento autoclavado (restos de matéria vegetal seca da lagoa de origem). Eles foram mantidos em incubadora com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 27°C até o início dos bioensaios. Durante o período de aclimação ao laboratório por não menos de 4 dias, a água da lagoa foi gradualmente substituída pela própria água da lagoa, desta vez filtrada com filtro de papel e autoclavada.

2.3.2 Bioensaios de tolerância a diferentes salinidades e temperaturas.

Os bioensaios foram realizados em seis etapas, denominadas: Bioensaio I, ensaio piloto da tolerância ao incremento gradual da salinidade; Bioensaio II, tolerância à salinidade sem aumento gradual; Bioensaio III, avaliação da osmolalidade da hemolinfa e do meio em diferentes salinidades; Bioensaio IV e V, determinação da faixa de tolerância à temperatura com variações graduais; Bioensaio VI, determinação da interação com a salinidade na tolerância a temperaturas elevadas. Os anfípodes foram separados por sexo em grupos de 10 indivíduos e acondicionados em recipientes tipo "fingerbowl" contendo 125 mL de água. A alimentação durante o Bioensaio I consistiu

em disponibilizar 0,140 g/recipiente de matéria vegetal morta, seca e autoclavada e 0,070 g/recipiente no Biensaio II, IV, V e VI. No terceiro bioensaio não foi disponibilizado alimento, pois o objetivo foi verificar a mudança de osmolalidade da hemolinfa dos anfípodes expostos durante 48 h a soluções com a adição de sal marinho artificial. As condições experimentais durante os bioensaios encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Condições experimentais realizadas nos bioensaios.

Bioensaios	Aclimação (h)	Alimento*	Controles	Tratamento (réplicas por sexo)
I - Incremento gradual de sal	96 h	0,140 g	2	12 (2)
II - Sem incremento gradual	96 h	0,070 g	3	4 (3)
III - Osmolalidade	96 h	-	2	4 (2)
IV- T° baixas	96 h	0,070g e ração	2	5 (2)
V- T° elevadas	96 h	0,070g e ração	2	2 (2)
VI- Sal e T° elevadas	96 h	0,070g	2	3 (2)

*Foram utilizadas macrófitas da própria lagoa para a alimentação dos anfípodes. A ração comercial consistiu em 1 *pellet*/anfípode.

2.3.2.1 Preparação de água com diferentes concentrações de sal.

A água com diferentes concentrações de sal foi obtida pela utilização de sal marinho artificial (Natural Ocean, UP-Aqua), cujos componentes estão listados na Tabela 2. A preparação consistiu em pesar a quantidade de sal escolhida, sendo dissolvida durante 4 h em agitador magnético em 1 L de água da lagoa filtrada e esterilizada.

Tabela 2: Composição de sais e características químicas da água de mar artificial (Natural Ocean, UP-Aqua) para diferentes salinidades a 25° C*.

NaCl (Salinidade)	Gravidade Específica	Ca (mg/L)	Mg (mg/L)	Alcalinidade/ KOH (mg/L)	pH
28,5	1,02	370	1170	9,7/3,5	8,35
31,5	1,02	420	1305	10,5/3,8	8,38
35,0	1,03	490	1470	11,8/4,2	8,44

*Informações obtidas do fabricante.

2.3.2.2 Bioensaio I: Determinação da tolerância a salinidade sob incrementos graduais.

A coleta deste bioensaio ocorreu em agosto de 2013 na lagoa Carapebus. O bioensaio piloto teve por objetivo selecionar uma faixa de salinidade para a determinação do LC₅₀ (Concentração letal) no Bioensaio II. Este primeiro bioensaio foi desenvolvido com anfípodes coletados na lagoa Carapebus durante 22 dias com faixas de salinidade crescente a cada 48 h, desde 0 a 60 g/L de sal marinho. Os animais foram separados por sexo e divididos em grupos de 10, os quais foram submetidos em quatro réplicas aos tratamentos com concentrações crescentes de sal (incrementos de 5 mg/L de sal) a cada 48 h. Os controles (sem adição de sal) foram realizados em duas réplicas. Foram avaliados os parâmetros de salinidade, oxigênio dissolvido, condutividade, temperatura e pH da água tanto dos controles quanto dos tratamentos. Para isto foi utilizado um PHmetro modelo mpA 210, condutivímetro modelo YSI-30 e oxímetro modelo YSI-95.

2.3.2.3 Bioensaio II: Determinação da faixa de tolerância a salinidade sem incrementos graduais.

A coleta deste bioensaio ocorreu em novembro de 2013 na lagoa Carapebus. No bioensaio II, os anfípodes coletados da lagoa Carapebus foram aclimatados às condições de 27° C na incubadora por 4 dias em água da lagoa, sendo transferidos imediatamente aos seguintes tratamentos com sal marinho: 0, 20, 40 e 60 mg/L. Estas concentrações foram escolhidas de acordo com o bioensaio I. Os parâmetros físicos e químicos da água utilizada neste bioensaio também foram determinados da mesma forma como descrito no anteriormente.

2.3.2.4 Bioensaio III: Determinação da osmolalidade do meio e da hemolinfa do anfípode a diferentes concentrações de salinidade do meio.

A coleta deste bioensaio ocorreu em dezembro de 2013 na lagoa Carapebus. Devido ao possível efeito da oogênese nos anfípodes fêmeas, neste bioensaio foram utilizados apenas anfípodes machos. Os anfípodes foram coletados na lagoa de Carapebus. Cada grupo de 15 anfípodes machos foi submetido em duplicata aos seguintes tratamentos de sal: 0 mg/L (controle), 10, 20, 30 e 40 mg/L durante 48 h. Após as 48 h, os anfípodes de cada tratamento e réplica foram anestesiados em gelo individualmente para a retirada imediata da hemolinfa. A hemolinfa foi obtida com seringa de insulina alcançando o canal sanguíneo dorsal entre as placas abdominais do terceiro pleosomo e do primeiro urosomo. Foi realizado um *pool* da hemolinfa dos indivíduos de cada tratamento, o qual foi congelado para posterior avaliação da osmolalidade. A análise foi realizada no osmômetro de pressão de vapor VAPRO® da VIESCOR do Departamento de Ciências Morfo-fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FURG). Os parâmetros físicos e químicos da água dos tratamentos bem como os parâmetros e a concentração de íons da água utilizada no controle foram obtidos.

2.3.2.5 Bioensaio IV e V: Determinação da faixa de tolerância à temperatura com variações graduais.

A coleta de anfípodes para este bioensaio ocorreu em Fevereiro de 2014, na lagoa Paulista devido a abertura de barra ocorrida em dezembro de 2013 na lagoa de Carapebus. A lagoa Paulista assim como a lagoa Carapebus, está localizada no PARNA da Restinga de Jurubatiba, em Quissamã, RJ. O experimento consistiu no aumento e redução da temperatura gradualmente a intervalos de 5°C a partir da temperatura de controle de 27°C. As temperaturas elevadas foram de 32°C, 35°C e 39°C. As temperaturas mais baixas seguiram no sentido oposto para 22°C, 18°C, 13°C, 8°C e 3°C. Para esta etapa foram utilizadas apenas fêmeas. A agressividade dos machos em um experimento de longo prazo poderia interferir nos resultados. As fêmeas foram distribuídas em replicata tanto no controle quanto no tratamento, contendo 10 anfípodes em cada réplica, totalizando 60 fêmeas. Devido a abertura de barra ocorrida na lagoa de Carapebus, os anfípodes deste experimentos foram coletados na lagoa Paulista.

2.3.2.6 Bioensaio VI: Determinação da interação da salinidade na tolerância a temperaturas elevadas.

Neste bioensaio foram utilizadas 20 fêmeas (10 fêmeas em replicata) coletadas em fevereiro de 2014 na lagoa de Paulista, nas temperaturas elevadas de 32°C, 35°C e 39°C, com um controle de temperatura a 27°C em água da lagoa durante todo o período da experimentação. Foram estabelecidos dois tratamentos com elevação de temperatura: um em água da lagoa e outro com adição de 20 mg/L de sal artificial.

2.3.2.7 Análises Estatísticas.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Foram utilizadas regressões lineares para relacionar a mortalidade acumulada (ma) ao longo do tempo com o aumento da salinidade e a variação de temperatura. Dado que os resultados não se ajustaram à normalidade foi realizada uma análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) para avaliar o efeito da salinidade, temperatura, sua interação e também de gênero, quando correspondente. Nos casos onde houve efeito significativo da salinidade sobre a ma do anfípode, foi realizado um teste de comparação de médias entre controles e tratados. Estas duas análises permitiram determinar as concentrações de sal marinho, avaliado como salinidade da água, que não tem efeito e a concentração mínima dentre as avaliadas com efeito sobre a sobrevivência do anfípode. A determinação do LC₅₀ de sal marinho foi obtida a partir da extrapolação da regressão linear utilizando a função PROBIT a partir do valor 5, correspondente a 50% de mortalidade. Os valores de Probit foram obtidos a partir de valores tabelados da função. Estes valores foram corrigidos a partir da mortalidade observada no controle como descreve a fórmula abaixo, onde MA representa a mortalidade acumulada do tratamento (trat) e do controle (cont).

$$\text{MA}_{\text{trat}} \% \text{ corr} = \frac{\text{MA trat \%} - \text{MA cont \%}}{100 - \text{MA cont \%}} \times 100$$

A osmolalidade da hemolinfa do anfípode foi relacionada através de uma regressão linear com a osmolalidade do meio nas diferentes salinidades. Esta informação, baseado nas análises estatísticas foi relacionado com os valores de salinidade sem efeito (CENO) e com a mínima salinidade com efeito (CEO) sobre a ma.

Todas as análises foram realizadas no programa STATISTICA for Windows, v. 7.0 (Statsoft, Inc.).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Bioensaio I (Piloto): Tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* à salinidade com incremento gradual da salinidade.

As características da água utilizada neste bioensaio, tanto para os controles quanto para os tratamentos, são apresentadas na Tabela 3. O oxigênio dissolvido no controle foi de 7,36 e nos tratamentos a quantidade de oxigênio tendeu a diminuir, mostrando-se menor para os tratamentos de 20 e 25. No entanto, o tratamento de 30 de sal marinho mostrou o maior valor de oxigênio dissolvido, inclusive maior que do controle. A condutividade mostrou um aumento gradual com o incremento da salinidade e o pH variou entre 7,59 e 8,13. A temperatura registrada na água (Tabela 3) representa apenas a temperatura na qual esta se encontrava no momento da determinação dos parâmetros, já que os Bioensaios foram realizados dentro da incubadora com temperatura constante ($27 \pm 0,5$ °C).

A ma dos anfípodas apresentou uma relação positiva com o incremento do sal (Fig. 4). Neste bioensaio, onde machos e fêmeas foram tratados independentemente, se observou uma mortalidade crescente nos machos desde o início do experimento, o qual não diferiu dos controles.

A alta mortalidade observada desde o início nos machos e nos controles não permitiu a estimativa do LC_{50} da salinidade da água. No entanto, nas fêmeas, foi possível evidenciar o tempo em que a que salinidade se torna crítica para os anfípodas (Fig. 5). Ainda com a ma crescente no tempo foi possível constatar uma pequena porcentagem de sobreviventes a 51,8 de salinidade.

Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos controles e nos tratamentos com sal durante o Bioensaio I (Piloto), da tolerância do anfípode *Q. aff. lutzii* ao incremento gradual da salinidade.

Adição de sal marinho* (g/L)	Parâmetros da água utilizada no Bioensaio I				
	Salinidade	O2 dissolvido (mg/L)	Condutividade (mS)	pH	Temperatura (°C)
0 (controle)	0,5	7,36	1,06	7,59	24,6
5	5,0	7,12	9,10	7,70	25,3
10	9,6	6,75	16,90	7,75	27,0
15	14,2	7,00	23,57	7,84	26,6
20	18,6	5,86	30,06	7,76	26,5
25	22,7	5,92	35,90	7,90	27,4
30	27,0	7,74	43,07	7,84	27,1
35	30,8	6,28	47,60	7,71	27,2
40	35,3	6,71	55,00	7,91	27,4
45	37,9	6,76	57,00	7,91	27,3
50	42,9	6,78	62,90	8,06	26,6
55	47,3	6,70	69,30	7,93	26,4
60	51,8	6,94	77,60	8,13	27,0

*Natural Ocean, UP-Aqua

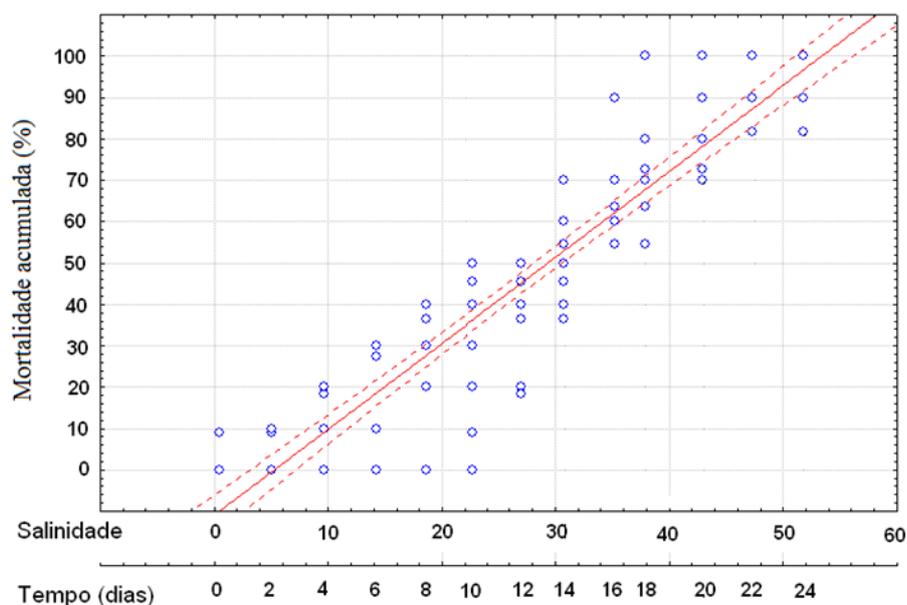


Figura 4: Regressão linear da mortalidade acumulada dos anfípodes *Quadrivisia aff. lutzii* durante o Bioensaio I (Piloto) em função do incremento da salinidade no tempo, a cada 48 h ($r^2 = 0,8656$; $p = 0,0000$; $y = -10,93 + 2,0769 \cdot x$).

Utilizando apenas os dados das fêmeas deste bioensaio foram obtidos os valores de Probit para as mortalidades acumuladas (como média das 4 réplicas) em função da salinidade. A extrapolação do valor de 50 % de mortalidade acumulada (Probit = 5) determinou um valor de 35,9 de salinidade como valor de LC_{50} (Fig. 6) para *Quadrivisia aff. lutzii*.

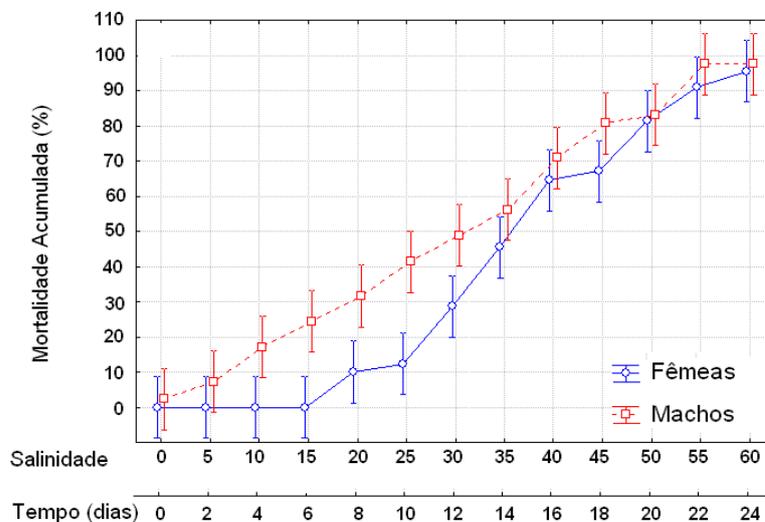


Figura 5: Mortalidade acumulada em machos e fêmeas de *Quadrivisia aff. lutzii* no Bioensaio I (Piloto) com o incremento gradual de salinidade ao longo do tempo, a cada 48 h.

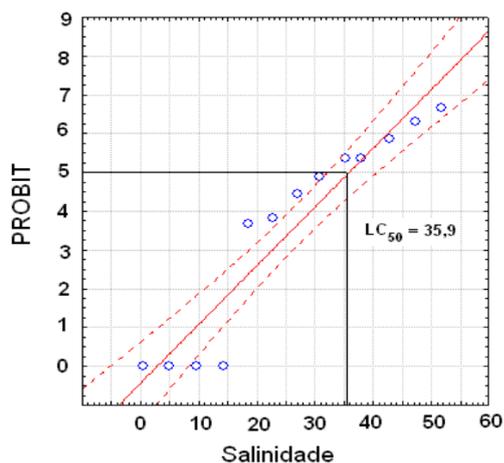


Figura 6: Determinação da concentração letal (LC_{50}) de sal marinho, medida como salinidade da água, para o anfípode *Quadrivisia aff. lutzii* como obtido a partir da análise das fêmeas durante o Bioensaio I (Piloto) com incremento gradual da salinidade.

2.4.2 Bioensaio II: Tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* à salinidade sem incremento gradual.

Neste bioensaio, os indivíduos foram submetidos diretamente aos diferentes níveis de salinidade após o período de aclimação. Os parâmetros da água utilizada neste bioensaio para os controles e tratamentos são apresentados na Tabela 4. A salinidade da lagoa foi 0,6. Observa-se a mesma tendência do bioensaio anterior em relação a estes parâmetros, onde a salinidade foi menor que a quantidade esperada pela pesagem; a condutividade aumentou com o incremento da salinidade, o pH variou entre 7,6 e 8,0; sendo que a temperatura representa apenas a observada no momento das medições. O pH do controle foi o mais básico, com um valor de 7,99, sendo que não houve grandes variações em comparação aos tratamentos, que apresentaram valores entre 7,65 e 7,92. O oxigênio dissolvido se mostrou em níveis menores que no primeiro bioensaio para os mesmos níveis de tratamento. Os maiores valores de oxigênio dissolvido ocorreram no tratamento 20 (6,40 mg/L) e no controle (6,35 mg/L). Os demais valores nos tratamentos foram menores variando entre 4,80 (tratamento de 60) e 5,60 (tratamento de 40). A temperatura do bioensaio se manteve também em $27 \pm 0,5$ °C.

Tabela 4: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos controles e nos tratamentos com sal durante o Bioensaio II, da tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* ao incremento não gradual da salinidade.

Adição de sal marinho* (g/L)	Parâmetros da água utilizada durante o Bioensaio II				
	Salinidade	O ₂ dissolvido (mg/L)	Condutividade (mS)	pH	Temperatura (°C)
0 (controle)	0,6	6,35	1,17	7,99	26,6
20	18,3	6,40	29,68	7,68	25,9
30	26,9	5,17	42,82	7,92	27,1
40	35,2	5,60	53,90	7,47	26,3
60	52,0	4,80	75,00	7,65	26,0

*Natural Ocean, UP-Aqua

Neste bioensaio, cuja duração foi de 48h após o início dos tratamentos em paralelo, ambos os sexos apresentaram ma equivalente. Tanto para machos quanto para fêmeas somente nas salinidades de 35,2 e 52 houve diferenças significativas em relação

à ma dos controles (Fig. 7). Já para a salinidade de 52 a ma atingiu o valor de 100% em ambos os sexos.

A ausência de diferenças nas respostas entre machos e fêmeas (Fig. 7) para nenhum dos níveis de salinidade neste bioensaio, permitiu utilizar os valores médios das réplicas de ambos gêneros para relacionar ma com salinidade (Fig. 8). Ao realizar o teste Kruskal-Wallis para avaliar o efeito da salinidade sobre a sobrevivência *do Q. aff. lutzi*, constatou-se que já a partir da salinidade de 26,9 se começa a observar efeito significativo sobre a ma no anfípode (Tabela 5). No entanto, ao se comparar as médias para esse tratamento (26,9) não foram detectadas diferenças significativas com o controle. Considerou-se o valor de 18 de salinidade como o CENO (maior valor sem efeito observado em 48 h) e o 26,9 como o CEO (menor valor com efeito observado em 48 h) (Tabela 5; Figs. 8-9).

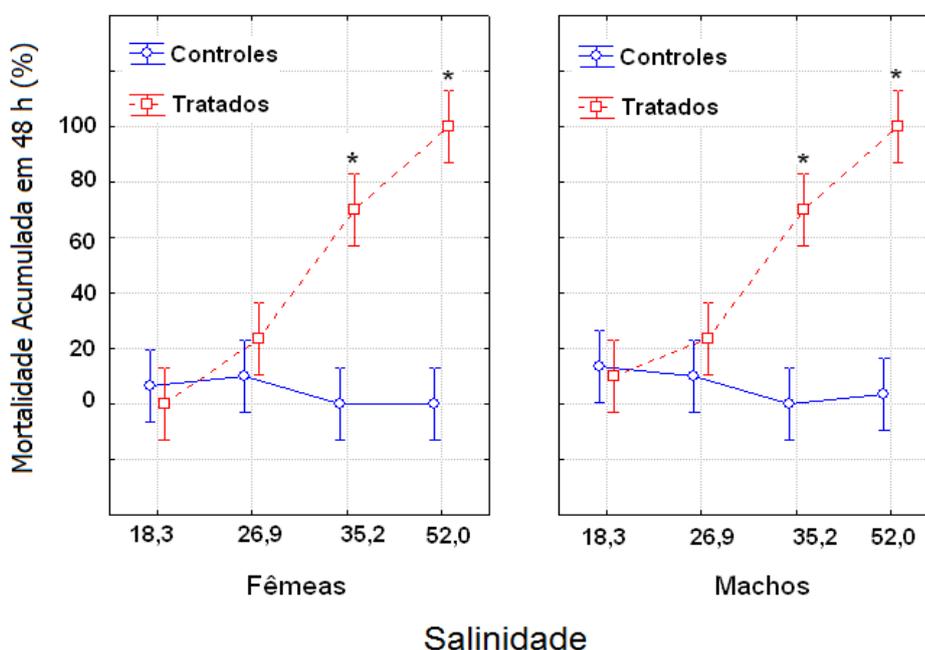


Figura 7: Variação da mortalidade acumulada em função da salinidade em fêmeas e machos de *Q. aff. lutzi* em 48 h durante o Bioensaio II. *Diferenças significativas entre controles e tratados, ($p < 0,05$) de acordo com o testes de kruskal-Wallis (Tabela 4).

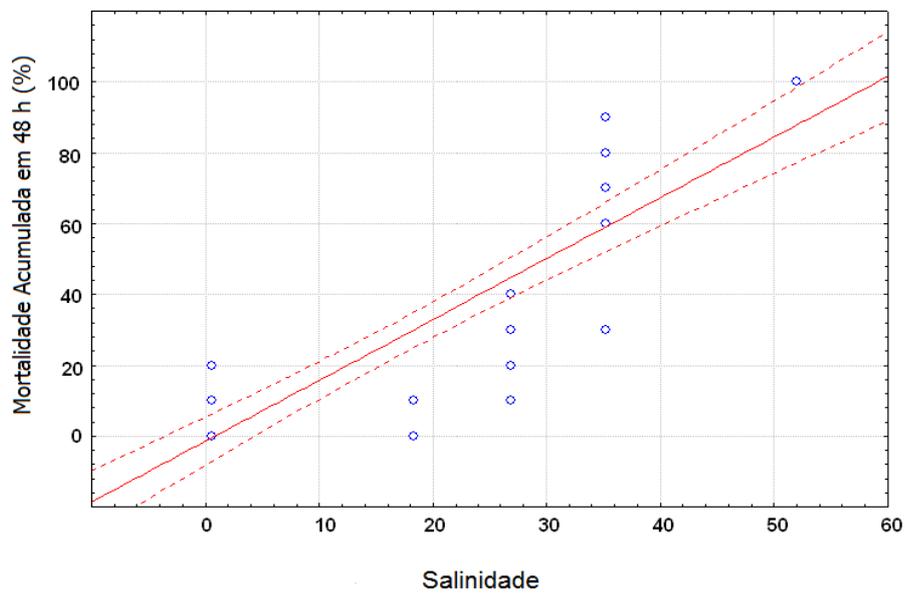


Figura 8: Regressão linear que relaciona a mortalidade acumulada do anfípode *Q. aff. lutzii* com a salinidade em 48 h durante o Bioensaio II ($y = -1,4253 + 1,7166 \cdot x$; $p = 0,000$, $r^2 = 0,7803$).

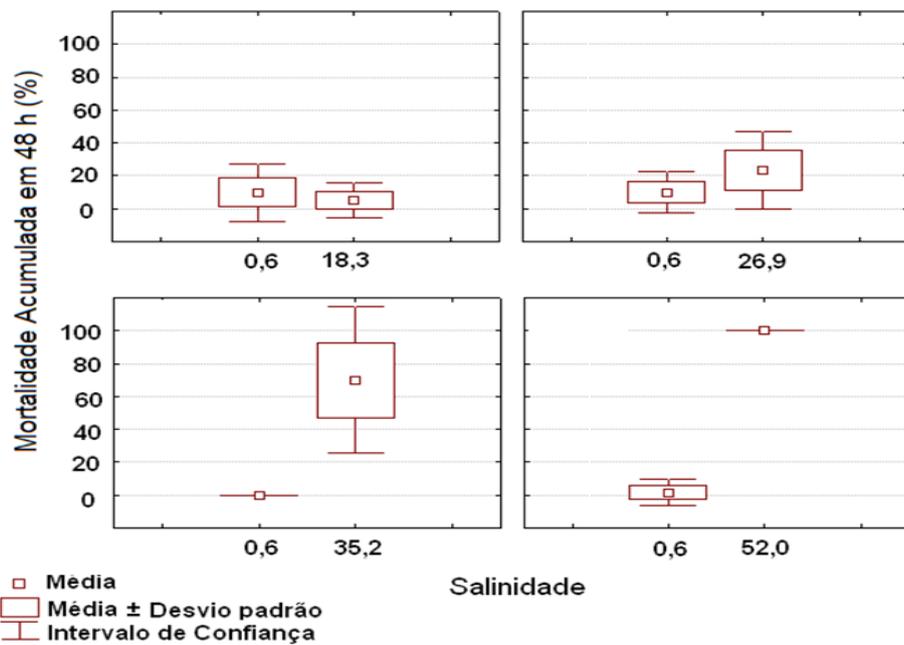


Figura 9: Médias da mortalidade acumulada em 48 h, de seis réplicas de cada tratamento para machos e fêmeas e seus respectivos controles (salinidade de 0,6) em *Q. aff. lutzii* durante o bioensaio II. Considerou-se a salinidade de 18 como o maior valor sem efeito observado (CENO) e 26,9 como a concentração com menor efeito observado (CEO).

Tabela 5: Resultados do teste Kruskal-Wallis KW-H na avaliação do efeito da salinidade nas comparações entre controles (C) e tratados (T). Em vermelho os valores de probabilidade mostrando significância do efeito da salinidade.

C & T	Todos		Fêmeas		Machos	
	KW-H (1;12)	p	KW-H (1;6)	p	KW-H (1;6)	p
0,6 & 18,3	1,08	0,299	1,00	0,317	1,00	0,317
0,6 & 26,9	3,89	0,048	1,82	0,177	2,40	0,121
0,6 & 35,2	9,50	0,002	4,50	0,033	4,35	0,037
0,6 & 52	10,28	0,001	5,00	0,025	4,50	0,034

Com o objetivo de linearizar os dados de ma, estes foram transformados à função PROBIT, utilizando a correção pela ma nos controles. A partir da função PROBIT obteve-se o LC₅₀ de sal marinho, avaliada como salinidade, cujo valor foi de 35,9 para o anfípode *Q. aff. lutzi*, confirmando o valor obtido no bioensaio piloto (Fig. 10).

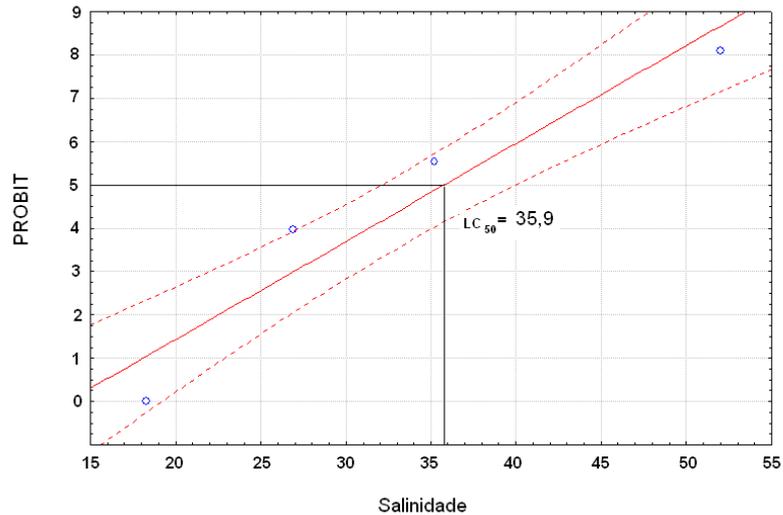


Figura 10: Determinação da concentração letal (LC₅₀) de sal marinho, avaliada como salinidade, para o anfípode *Q. aff. lutzi*. Este valor foi obtido da extrapolação do Probit 5 na função PROBIT.

2.4.3 Bioensaio III: Avaliação da osmolalidade da hemolinfa e do meio a diferentes salinidades.

As características físicas e químicas da água utilizada no bioensaio III para os controles e tratamentos são apresentados na Tabela 6. Diferentemente dos bioensaios anteriores, os valores de salinidades mostraram-se muito mais próximos dos valores adicionados de sal marinho. O oxigênio dissolvido do controle foi o menor observado nos bioensaios, com um valor de 5,10 mg/L, sendo que os valores encontrados nos tratamentos variaram entre 5,20 a 6,42. A condutividade, assim como nos demais bioensaios, aumentou com o incremento da salinidade e foram maiores quando comparadas com os outros bioensaios. O pH da água do controle foi de 6,56 e dos demais tratamentos se afastou um pouco da neutralidade, variando entre 7,38 e 7,86. A temperatura durante o bioensaio manteve-se entre $27 \pm 0,5$ °C.

Tabela 6: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada nos controles e nos tratamentos com sal marinho durante o Bioensaio III, da avaliação da osmolalidade da hemolinfa do anfípodo *Q. aff. lutzi* em meio com diferentes salinidades.

Adição de sal marinho* (g/L)	Parâmetros da água utilizada durante o Bioensaio III				
	Salinidade	O2 dissolvido (mg/L)	Condutividade (mS)	pH	Temperatura (°C)
0 (controle)	0,5	5,10	0,98	6,56	25,60
10	10,3	6,42	18,40	7,38	26,40
20	20,7	6,18	33,30	7,69	27,10
30	29,4	5,55	46,80	7,73	27,00
40	39,1	5,20	60,80	7,86	25,50

Os valores da osmolalidade do meio e da hemolinfa do anfípode *Q. aff. lutzi* a diferentes salinidades são apresentados na Tabela 7 e Figura 11. A salinidade 0,5 (controle, correspondente a salinidade da água da lagoa) a osmolalidade foi de $83,25 \pm 23,92$ mmol/Kg e em 10,3 foi de $274,50 \pm 11,09$ mmol/Kg. A osmolalidade da hemolinfa dos anfípodas ($425,00 \pm 59,16$ mmol/Kg e $485,00 \pm 35,12$ mmol/Kg, respectivamente) se manteve aproximadamente constante a valores mais elevados que do meio (Fig. 11). Quando o meio se encontra numa salinidade de 20,7 ($624,75 \pm 19,96$ mmol/Kg) a hemolinfa apresenta osmolalidade ($657,50 \pm 72,74$ mmol/Kg) próxima ao meio. No entanto já no tratamento com salinidade de 29,4 ($880,50 \pm 21,14$ mmol/Kg), a osmolalidade da hemolinfa do anfípode ($1247,50 \pm 100,79$ mmol/Kg) apresenta valores

elevados e muito além dos valores internos observados durante sua hiper-regulação em meio diluído. Na seguinte salinidade de 39,1 (1188,75 ± 30,14 mmol/Kg) não foi possível obter hemolinfa suficiente dos anfípodes, pois a sobrevivência nesta salinidade foi menor que 50%.

Tabela 7: Osmolalidade em mmol/Kg do meio e da hemolinfa do anfípode *Q. aff. lutzi* a diferentes salinidades.

Salinidade	Osmolalidade (mmol/Kg)			
	Meio		Hemolinfa	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão	Média ± desvio padrão
0,5	63,0 ± 8,5	103,5 ± 2,1	400,0 ± 84,9	450,0 ± 28,3
10,3	268,5 ± 14,8	280,5 ± 2,1	515,0 ± 7,1	455,0 ± 7,1
20,7	609,0 ± 12,8	640,5 ± 6,4	595,0 ± 7,1	720,0 ± 14,1
29,4	871,5 ± 31,8	889,5 ± 2,1	1165,0 ± 49,5	1330,0 ± 28,3
39,1	1182,0 ± 46,7	1195,5 ± 19,1		

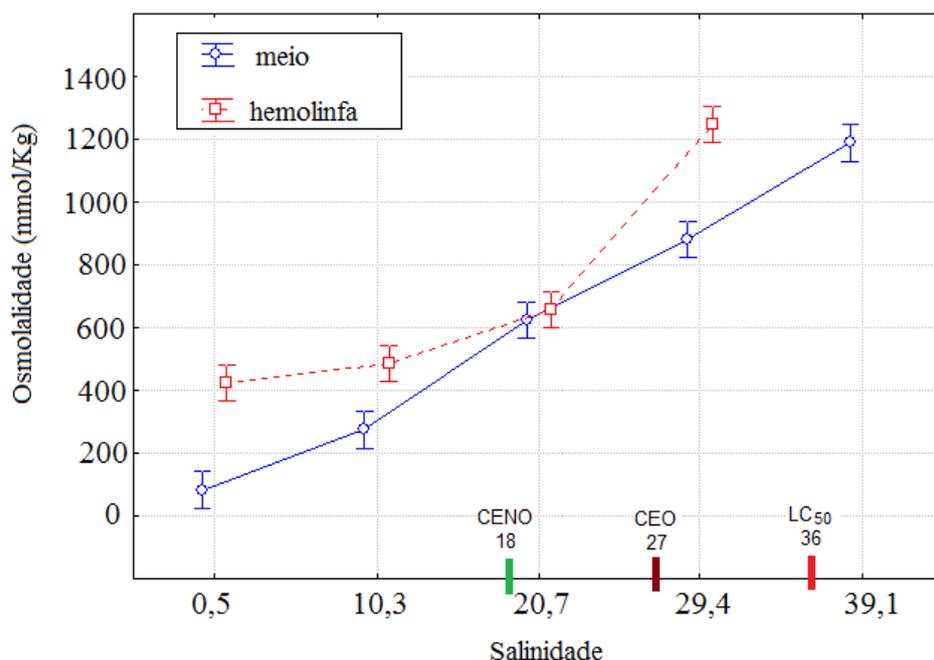


Figura 11: Alteração da osmolalidade da hemolinfa do anfípode *Q. aff. lutzi* a diferentes concentrações de sal marinho no meio, avaliado como salinidade. e sua correlação com a variação da osmolalidade do meio. CENO: maior concentração sem efeito observado em 48 h; CEO: menor concentração com efeito observado em 48 h.

2.4.4 Bioensaios IV e V: Tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* à diminuição e aumento gradual da temperatura.

As características físico-químicas da água utilizada nestes bioensaios de exposição ao incremento e diminuição de temperatura correspondem aos valores observados nos controles dos bioensaios anteriores. Registrou-se salinidade de 0,5; oxigênio dissolvido de 7,65 mg/L; pH de 6,55; condutividade de 1,03 mS e 26,4 °C.

A *ma* foi nula nos tratamentos a 22° C e 8° C e de apenas de 10% nos tratamentos a 18° C e 13° C (Fig. 12). Embora a baixa mortalidade nestas temperaturas, notou-se que a partir de 18°C os anfípodas não se alimentaram ativamente. A partir dos 13° C alguns anfípodas começaram a apresentar apenas movimentos ventilatórios. Esta condição passou a ser observada em todos os anfípodas a partir dos 8° C. Aos 3° C a *ma* foi de 100%.

Os anfípodas sobreviveram a apenas a dois incremento de temperatura neste bioensaio. A *ma* foi de menos de 20% a 32°C, no entanto chegou a 100% de mortalidade a 37° C (Fig. 12).

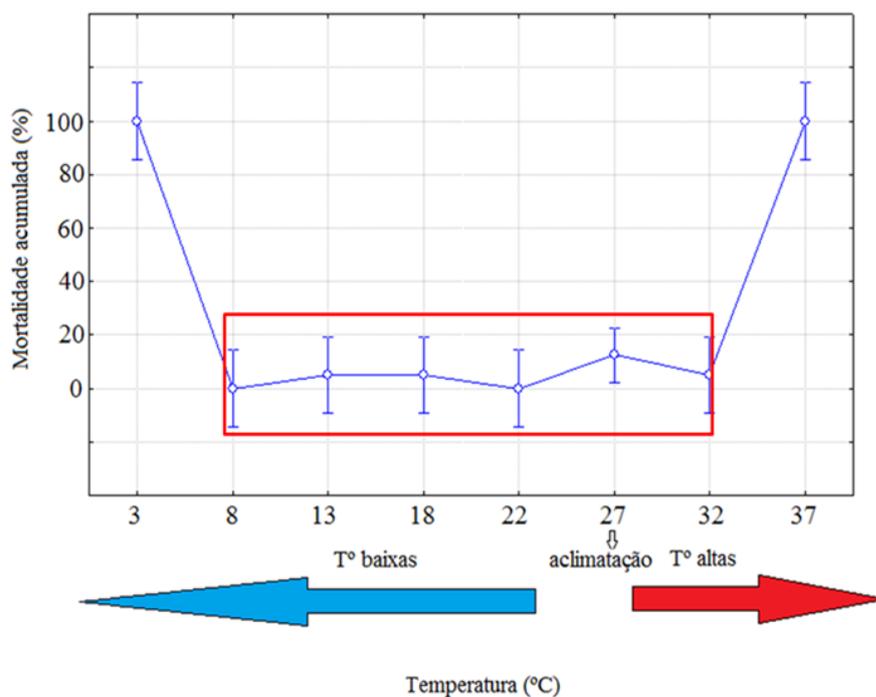


Figura 12: Mortalidade acumulada do anfípode *Q. aff. lutzi* na exposição ao incremento e diminuição gradual da temperatura da água a cada 48 h, a partir dos 27°C.

2.4.5 Bioensaio VI: Avaliação do efeito da interação entre salinidade e temperatura sobre o anfípode *Q. aff. lutzi*.

Os parâmetros físicos e químicos da água utilizada para este bioensaio são apresentados na Tabela 8. Os parâmetros se apresentaram próximos aos dos bioensaios para suas respectivas salinidades.

Tabela 8: Parâmetros físicos e químicos da água utilizada durante os Bioensaio IV e V da tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* ao incremento e decrescimento gradual da temperatura, e de sua interação com a salinidade.

Adição de sal marinho* (g/L)	Parâmetros da água utilizada no bioensaio VI				
	Salinidade	O2 dissolvido (mg/L)	Condutividade (mS)	pH	T° da água (°C)
0	0,5	7,65	1,03	6,55	26,4
20	18,4	5,04	33,09	6,89	25

Na Figura 13 se observam os resultados do experimento de interação entre temperatura e salinidade. No controle, fêmeas sob temperatura constante de 27°C e a salinidade 0,6 mostraram mortalidade abaixo de 20 %. No tratamento do incremento da temperatura sob salinidade de 0,6 a mortalidade inicia a 35°C, chegando a 20% de ma; e 100 % a 39°C (Fig. 12 e 13). Este resultado é consistente com o observado no bioensaio anterior. No tratamento a 18,4 de salinidade, não se observa diferença com o tratamento sem sal, pelo menos no que se refere à mortalidade acumulada a 39°C. No entanto, aos 35°C em salinidade de 18,4 não foi observada mortalidade, estando os anfípodes mais ativos que no tratamento sem sal onde, se observou mortalidade de 20% a esta temperatura.

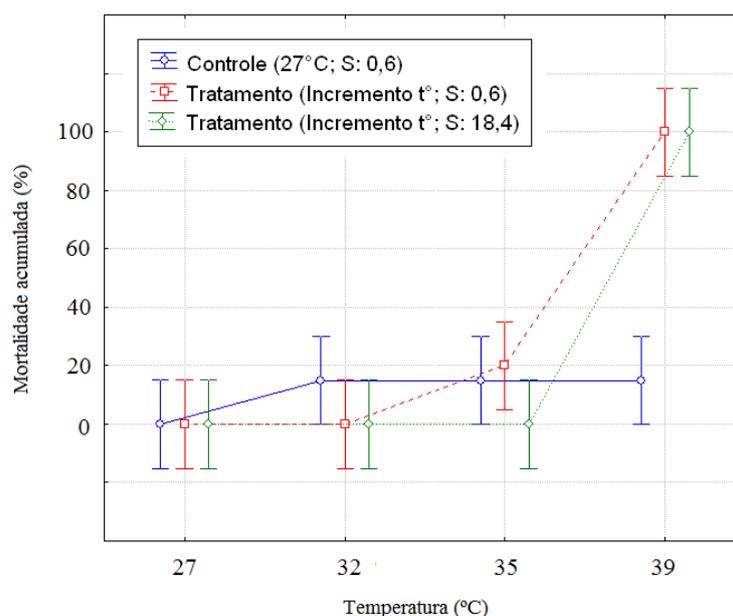


Figura 13: Mortalidade acumulada de fêmeas do anfípode *Q. aff. lutzii* na interação salinidade (S) e temperatura (t°). Não houve diferenças significativas entre o tratamento de incremento de temperatura-S:0,6 e o tratamento de incremento de temperatura-S:18,4, de acordo com o teste de U de Mann-Whitney ($Z_{ajustado} = 0,731$; $p=0,573$).

2.5 DISCUSSÃO

A alta mortalidade observada nos machos durante o primeiro bioensaio, tanto nos controles quanto nos tratamentos, deve-se principalmente a agressividade e ao canibalismo. Este problema foi contornado utilizando machos de tamanhos similares e menores em cada recipiente, mantendo um número máximo de 10 indivíduos por

unidade experimental e adicionando um suplemento alimentar comercial contendo proteína animal.

2.5.1 Tolerância do anfípode *Quadrivisia* aff. *lutzi* a variações de salinidade.

Os resultados deste estudo mostraram que o anfípode *Q.* aff. *lutzi* é um organismo eurialino, tolerando uma faixa ampla de 0 até pelo menos 21 de salinidade. Esta espécie não apresenta a amplitude de tolerância de espécies marinhas como *Gammarus duebeni* (de 0 a 35 de salinidade) e *G. aequicauda* (de 5 a 10 de salinidade) (Fig. 14). No entanto, ao comparar com espécies de água doce, o *Q.* aff. *lutzi* apresenta uma tolerância que lhe permite sobreviver em águas salobras. Substâncias húmicas presentes na água das lagoas onde o anfípode é encontrado podem amenizar alguns dos efeitos ocasionados pela salinidade como demonstrado no cladóceros *Moina macrocopa* por Suhett *et al.* (2011). A capacidade do anfípode *Q.* aff. *lutzi* de tolerar uma faixa maior de salinidades se deve ao fato de ser capaz de hiper-regular, mantendo sua osmolalidade em valores entre 425-485 mmol/Kg, maiores que valores observados em meios de baixa salinidade (Fig. 11). As salinidades próximas de 21, atuam como osmoconformador conseguindo manter uma concentração próxima do seu meio, que parece ser viável para o anfípode nessa faixa de salinidade pois não foi detectada a mortalidade. Nesta faixa de salinidade não foi detectada mortalidade nos experimentos e já foram encontrados no campo indivíduos vivos a salinidade de 18. De fato, têm sido registrados indivíduos vivos em lagoas com salinidade 18. A salinidades mais elevadas, provavelmente, se torna crítica a manutenção da homeostase interna pela incapacidade do anfípode de hipo-regular, determinando mortalidade já a partir de 27 de salinidade, conforme mostram os resultados deste estudo (Fig. 11). A mortalidade dos anfípodas pode estar relacionada a danos celulares como a deterioração do epitélio branquial, que ocasiona o aumento da permeabilidade de água e íons.

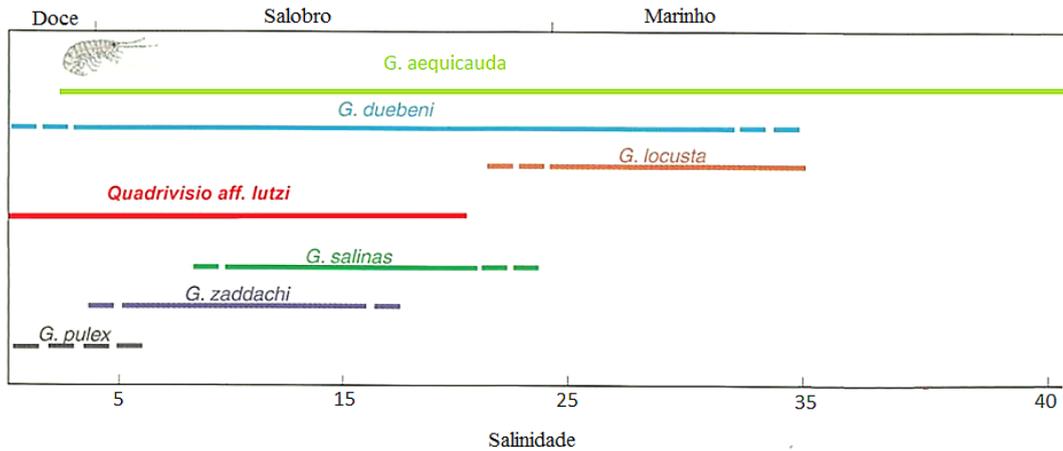


Figura 14: Faixa de tolerância de 7 espécies de anfípodes. Nesta figura foi incluído o anfípode *Quadrivisio aff. lutzi* conforme mostram os resultados do presente estudo. Extraído e modificado de Sumich & Morrissey (2004).

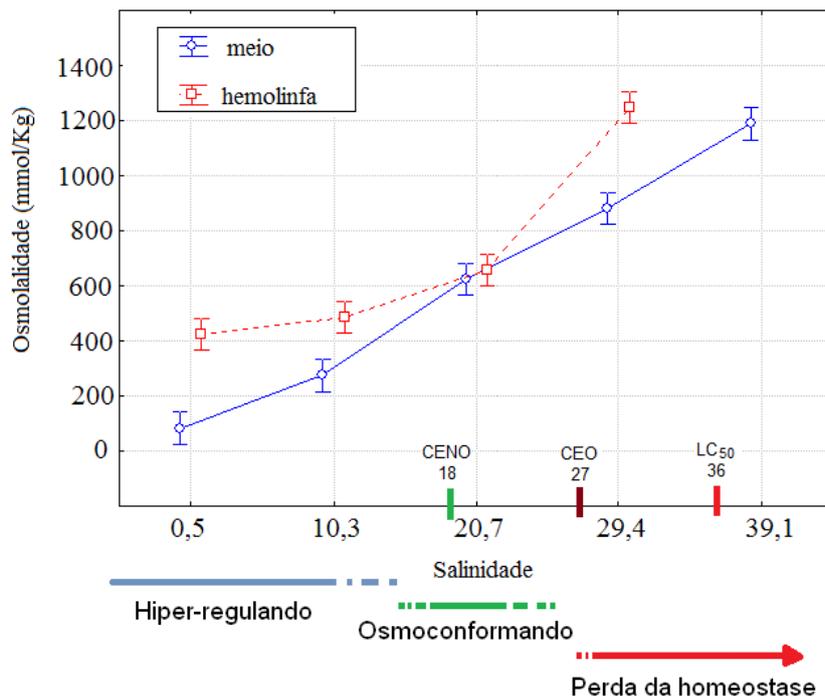


Figura 15: Alteração da osmolalidade da hemolinfa do anfípode *Q. aff. lutzi* a diferentes salinidades, mostrando as faixas prováveis nas quais ele hiper-regula, se comporta como osmoconformador e perde a capacidade de manter seu equilíbrio interno.

O LC₅₀ de sal marinho para o anfípode a partir *Q. aff. lutzi* foi correspondente a uma salinidade de 36, não apresentando diferenças entre os gêneros. Outros anfípodes de água doce, tais como *Gammarus roeseli*, tem mostrado diferenças na mortalidade entre os sexos em um período de 72 h. Fêmeas e machos de *G. roeseli*, apresentaram 50% de ma em 9,8 g/L e 12,24 g/L de NaCl respectivamente (Sornom, 2010).

Trabalhos com anfípodes mostram que com o estresse a salinidade, há um influxo maior de íons de Cl⁻ em machos, e Na⁺ e NaCl em fêmeas (Sornom, 2010). Esta diferença se deve pelo aumento da demanda do metabolismo energético das fêmeas durante a oogênese e incubação de ovos em comparação com o processo de espermatogênese dos machos, que necessita de menor demanda de em termos de energia (Buikema & Benfield, 1979). Sendo assim, as reservas energéticas são alocadas para manter o equilíbrio de íons, não sendo suficiente para manter outras funções do organismo (Sornom, 2010), como fuga de predadores, forragear alimento e busca por parceiros por exemplo.

A aclimação de anfípodes em salinidades crescentes determinou uma maior sobrevivência a altas concentrações (52 de salinidade), ainda que baixa (5-2,5%) quando comparados com aqueles submetidos diretamente a essa salinidade (100% mortalidade). Este resultado é consistente com o encontrado por Delgado *et al.* (2011), que ao aclimatar anfípodes a 34 de salinidade, estes foram capazes de sobreviver e crescer em salinidades de até 40. Em trabalho com o anfípode *Talitrus saltador*, a regulação osmótica e o batimento cardíaco foram correlacionados positivamente com o tempo de exposição a salinidade (Calosi *et al.*, 2005).

2.5.2 Tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* a variações de temperatura.

A partir dos resultados deste estudo, foi possível determinar uma faixa ampla de tolerância do anfípode *Q. aff. lutzi* entre 8° C e 32° C, podendo portanto considerar este como um organismo euritérmico.

Em comparação com os vertebrados, os mecanismos de dormência, e energia reduzida dos invertebrados, contribui com a maior tolerância ao estresse pelo frio (Lagadic & Caquet, 1998). Temperaturas mais elevadas aceleram o transporte de produtos químicos através das membranas celulares, aumentando processos fisiológicos dos organismos (Heugens *et al.*, 2001). Em trabalhos com copépodes, temperaturas elevadas, foram capazes de inativar enzimas celulares, e induzir a síntese de proteínas de choque térmico e defesa antioxidante (Cairns *et al.*, 1975).

Considerando que a espécie em estudo geralmente é encontrada em lagoas com águas de temperaturas entre 27° e 28° C, pode-se considerar como uma espécie

euritêmica, tolerando de 8°C até 32°C. O anfípode se mostrou menos tolerante a temperaturas elevadas. Wijnhoven et al. (2003) explica que o aumento da temperatura induz a hiperventilação e posteriormente a morte do organismo devido ao gasto energético.

Observou-se um leve efeito favorável da salinidade à tolerância do anfípode a temperaturas mais elevadas. Em meio com salinidade de 18,4 não foi detectada mortalidade dos anfípodas. Já Allan *et al.* (2006) tinham indicado que salinidade e temperatura são fatores extrínsecos que podem interagir para modificar a tolerância dos anfípodas a estes fatores, fato corroborado também em *G. roeseli*, onde mortalidade e ventilação foram alterados na interação temperatura e salinidade (Sornom, 2010).

2.6 CONCLUSÕES

O anfípode *Q. aff. lutzii* é um organismo eurialino, capaz de tolerar a faixa de salinidades de 0 a 21.

O LC₅₀ de sal marinho em 48 h para o anfípode *Q. aff. lutzii* é de 36.

O anfípode *Q. aff. lutzii* tolera uma ampla faixa de salinidades, hiper-regulando em meios de baixa salinidade, mantendo a osmolalidade da hemolinfa em 425-485 mmol/Kg; e em salinidades maiores, até provavelmente 21 ou mais, ele passa a osmoconformar, mantendo sua concentração próxima do meio ($657,50 \pm 72,74$ mmol/Kg).

O anfípode começa a perder sua capacidade de manter sua homeostase a salinidades maiores que 21.

O anfípode *Q. aff. lutzii* apresenta uma faixa de tolerância a temperatura desde 8°C a 32°C.

Não houveram diferenças significativa entre a mortalidade acumulada nos bioensaios de interação da salinidade 18 e temperaturas elevadas e os bioensaios isolados de salinidade de 18 e temperaturas elevadas.

O anfípode habita no extremo superior de sua faixa de tolerância a temperatura e sua tolerância é levemente favorecida pelo aumentos da salinidade do meio em níveis toleráveis de salinidade para o anfípode.

CAPÍTULO II

3.0 CONTRIBUIÇÃO PARA A PADRONIZAÇÃO DO ANFÍPODE *QUADRIVISIO AFF. LUTZI* EM BIOENSAIOS DE ECOTOXICOLOGIA

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 A Toxicologia e Ecotoxicologia.

A Toxicologia é definida como a “ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo” (Moraes *et al.*, 2000). Esta ciência apresenta basicamente três ramos: toxicologia forense, clínica e ambiental. Esta última estuda o destino e efeitos dos agentes tóxicos, seus metabólitos e produtos de degradação no ambiente, nas cadeias alimentares, organismos e populações (Costa *et al.*, 2008).

Na década de 1970, estudiosos perceberam que havia algo em comum entre a Ecologia (no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas) e a Toxicologia (em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas) (Plaa, 1982). Assim, houve uma associação entre estas áreas, dando origem à Ecotoxicologia (Zagatto & Bertolotti, 2006). O termo Toxicologia ambiental, é algumas vezes utilizado como sinônimo do termo Ecotoxicologia, porém este último compreende uma sequência de eventos que vai desde a emissão dos contaminantes, destino e comportamento dos químicos aos efeitos sobre os elementos da Biosfera. A Toxicologia ambiental dá ênfase aos efeitos ocasionados em humanos (Costa *et al.*, 2008).

A primeira definição de Ecotoxicologia foi estabelecida em 1969 pelo toxicologista francês René Truhaut, na reunião do *Comité International Scientific Council Unions* (ISCU) na cidade de Estocolmo. A definição desta linha de pesquisa foi dada como “ciência que estuda os efeitos das substâncias sintéticas ou naturais sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (Plaa 1982). Ela surgiu

como uma ferramenta de monitoramento ambiental, sendo desenvolvida inicialmente através de protocolos padronizados de testes de toxicidade, utilizando organismos aquáticos (Magalhães & Filho, 2008). A necessidade do monitoramento decorreu primariamente por pressão pública, devido ao surgimento de indústrias potencialmente poluidoras, que ao passar do tempo geraram novos compostos que muitas vezes foram despejados sem tratamento em uma diversidade de destinos. Dentre os destinos percorridos pelos contaminantes, os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptáculos, de elementos lançados diretamente nos corpos de água, por meio das descargas de efluentes, seja emitidos pelo ar ou depositados nos solos.

3.1.2 Testes Ecotóxicológicos.

Os testes ecotoxicológicos são experimentos conduzidos para estabelecer a causa/efeito de substâncias tóxicas (Martins & Bianchini, 2011). A partir de 1920, muitos testes foram desenvolvidos (Zagatto & Bertoletti, 2006), mas a padronização dos mesmos ocorreu apenas a partir de 1970 (Martins & Bianchini, 2011) em países da Europa e nos Estados Unidos, que utilizavam organismos aquáticos (USEPA 1996, 2002 – Anexo I, OECD 2004 – Anexo 1). No Brasil, a primeira iniciativa de padronização de testes ocorreu em 1975, no Programa Internacional de Padronização de Testes de Toxicidade Aguda com Peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *Internacional Organization for Standardization* (ISO).

Os primeiros testes de Ecotoxicidade, apresentaram como metodologia inicial cálculos do LC₅₀. Neste tipo de teste os efeitos avaliados são em geral severos e rápidos (mortalidade e imobilidade de 50% dos animais testados) e duram geralmente de um a quatro dias (Aragão & Araújo, 2006). Estes testes também são chamados de testes de toxicidade aguda ou de curta duração. Além destes, são analisados também o CEO (menor concentração com efeito) e o CENO. O CEO e o CENO são muito utilizados em testes de toxicidade crônica ou de longa duração. Entre os efeitos subletais de testes agudos, pode-se observar a inibição do crescimento embrio-larval e a inibição ou diminuição da fertilização (Cortez 2011; Lameira, 2012). Estas análises ainda são a base da Ecotoxicologia e tem sido utilizadas até hoje, devido à praticidade e custos menos onerosos.

Os testes de toxicidade padronizados com espécies aquáticas auxiliam em critérios importantes, como o estabelecimento de limites permissíveis de concentrações de contaminantes. Estes se tornam mais úteis quando as espécies são representativas e tem relevância ecológica para o ecossistema local. É importante também a utilização de espécies sensíveis ao poluente selecionado, assegurando assim a proteção de toda a comunidade (Martins & Bianchini, 2011).

3.1.2.1 Testes ecotoxicológicos em crustáceos.

Os microcrustáceos como *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* já tem estabelecidas as normas e procedimentos de utilização, conforme as normas ABNT - NBR 12713 (2004 – Anexo I) e ABNT-NBR 13373 (2005 – Anexo I), citadas por Zagatto & Bertolletti (2006). Estes se destacam entre os organismos recomendados, uma vez que são de fácil manutenção e sensíveis a diferentes grupos de agentes químicos, sendo assim amplamente utilizadas nos testes de toxicidade (Zagatto & Goldstein, 1991). Os testes utilizando microcrustáceos normalmente são testes agudos, com duração aproximada de 48 horas (EMBRAPA, 2010), período durante o qual já são observados alguns efeitos neste grupo de organismos. A sensibilidade (ou resposta) de organismos pode ser variável (Zagatto & Bertolletti, 2006), sendo importante a utilização de diferentes organismos de outros níveis tróficos para a avaliação da toxicidade.

3.1.3 Substâncias de referência e controles positivos em ensaios ecotoxicológicos.

Substâncias de referência e controles positivos, apresentam toxicidade conhecida e determinam danos quando o procedimento utilizado em laboratório está correto. O uso rotineiro destes compostos é feito por programas de garantia de qualidade analítica, em estudos que utilizam testes de toxicidade aguda e crônica.

As características que uma boa substância de referência deve apresentar são as seguintes: ser um contaminante ambiental, ter informações prévias sobre suas características químicas (estabilidade, solubilidade e etc.), ser fácil de analisar quimicamente, estar disponível no mercado com pureza consistente, ser estável, ter toxicidade alta e ter dados ecotoxicológicos básicos disponíveis (Zagatto & Bertolletti., 2006). Porém, estas características nem sempre estão juntas em todas estas substâncias. Apesar de ser necessária a utilização de várias substâncias para verificar a sensibilidade

de organismos testes, esta prática se torna pouco acessível, principalmente pelo custo das análises (Zagatto & Bertoletti., 2006).

O controle positivo é uma substância química de reconhecido efeito sobre os organismos de necessária inclusão em bioensaios ainda que não padronizados, para avaliar se a técnica está sendo capaz de reconhecer os efeitos de um contaminante que se deseja testar. Nem todas as substâncias são adequadas para esta função. Por exemplo, o sulfato de cobre, que precipita facilmente com a presença de compostos orgânicos e inorgânicos na água prejudica os valores da dureza e o pH da água, que desempenham papel fundamental na toxicidade do cobre (Zagatto & Bertoletti, 2006). O cloreto de potássio é pouco indicado por apresentar poucos dados ecotoxicológicos disponíveis (Zagatto & Bertoletti, 2006). O metil metanosulfonato (MMS) é um componente conhecido já utilizado como controle positivo ou tratamentos em outros estudos (Vieira, 2014; Lidzbarsky *et al.*, 2009; Fabbender & Braunbeck, 2013).

3.1.3.1 Metil metano sulfonato (MMS).

O composto metil metanosulfonato é um composto orgânico de fórmula: $C_2H_6O_3S$, que atua como agente alquilante. Esta substância é conhecida como carcinogênica e tem sido utilizada em análises de genotoxicidade (Lacaze *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2013). Este controle positivo induz a metilação na posição N-7 da guanina, na posição N-3 da adenina e na posição O-6 da guanina. Estudos mostram que a metilação na posição N-3 bloqueia a DNA polimerase e impede a replicação das células (Fu *et al.*, 2012) e que a metilação na posição O-6 da guanina leva a incorporação errônea de uma timina ao invés de citosina, gerando, uma mutação (de G/C para A/T) (Kaina, 2004). Este composto também pode ocasionar alterações cromossômicas, tais como indução da troca entre cromátides irmãs e indução de micronúcleos (Kaina, 2004).

3.1.4 Meios artificiais para cultivo de invertebrados.

O meio de cultivo de organismos invertebrados, são produzidos de várias fontes, sendo necessário apenas certos cuidados com os valores de pH, temperatura e dureza da água. Como não há uma legislação específica, os laboratórios podem fazer uso tanto de águas artificiais com água destilada, deionizada, água potável e até mesmo a água do local de origem do animal. Apesar de haver certa flexibilidade, para testes não padronizados o uso destas águas implica vantagens e desvantagens se analisados sob diferentes aspectos.

Alguns autores defendem o uso da água natural do ambiente de origem do animal. Segundo Keating *et al.* (1989) meios naturais são mais completos em relação aos elementos essenciais, sendo seu uso recomendado, sempre que possível de acordo com a disponibilidade. O uso deste tipo de água requer o monitoramento constante dos seus parâmetros físicos e químicos, uma vez que podem oscilar muito em relação às estações do ano além de estarem susceptíveis a contaminação (Knie & Lopes, 2004).

A água de ambiente natural pode estar susceptível a contaminação por esgoto doméstico ou resíduos antropogênicos (Henriques-de-oliveira *et al.* 2007), além disso a análise correta deste tipo de água implica grandes custos, uma vez que são necessárias análises de vários grupos de contaminantes. Com estes contratempos, quando os organismos testes são submetidos a experimentos de longo prazo no laboratório, se torna complexo avaliar a interação entre a variação destas substâncias e dos fatores abióticos em água natural, não sendo possível afirmar o que de fato gerou o resultado do cultivo desses animais. A qualidade da água potável também é submetida a oscilações, resultantes de manutenção de estações de tratamento.

As águas artificiais, quando utilizadas para a finalidade de cultivo, são enriquecidas por um meio básico, contendo sais essenciais e vitaminas, além de complementação alimentar com oferta de alimento animal e ou vegetal. As propriedades físico-químicas destas águas, tendem a permanecer constantes e a contaminação das mesmas torna-se pouco provável. Devido a estes fatores, é possível que os resultados apresentados sejam mais confiáveis.

3.1.4.1 Modelos animais crustáceos e seus meios básicos artificiais.

Os crustáceos mais utilizados em laboratório estão representados pelos microcrustáceos de água doce, *Daphnia magna*, *D. similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Hyalella azteca* e *H. meinerti*, e de água marinha, *Mysidopsis bahia*, *Mysidopsis juniae*, *Leptocheirus plumulosus*, *Tiburonella viscana* e *Artemia salina*.

Os cladóceros *Daphnia spp.* são um grupo já bem estabelecido em cultivos para experimentos. A água de cultivo comprovadamente adequada, que garante boas condições de vida, é composta por um meio básico, que contém os sais essenciais característicos da água natural (Ca, Mg, K, Na) e pelo meio M4, constituído de elementos-traço e vitaminas (Knie & Lopes, 2004). Esse meio foi desenvolvido especialmente para atender às necessidades vitais de *Daphnia* e já vem sendo utilizado há anos em muitos laboratórios com excelentes resultados na cultura destes organismos (Knie & Lopes, 2004).

3.1.5 Padronização de testes com o anfípode *Q. aff. lutzi*.

A recente utilização do anfípode *Q. aff. lutzi* como modelo animal em testes ecotoxicológicos (Weber et al. 2013; Vieira, 2014) tem levado a procurar estabelecer padrões para bioensaios a longo e curto prazo. Com este objetivo foi escolhido o componente MMS como controle positivo para testes ecotoxicológicos no anfípode, já que permite a avaliação de danos em nível de organismo até danos moleculares, como fragmentação do DNA (Weber et al., 2013, Lacaze, 2011) e inibição de mitose (Tin tin Su, 2010). Assim, é necessário estabelecer as concentrações letais (LC₅₀) e subletais (CEO e CENO) de MMS para este organismo. A partir destes valores, concentrações intermediárias poderão ser utilizadas para verificar danos cito e genotóxicos em ensaios futuros. Além do estabelecimento de um controle positivo com efeito conhecido, se faz necessário o estabelecimento de um meio de cultivo artificial que possa ser utilizado para o cultivo do anfípode *Q. aff. lutzi* a longo prazo. As necessidades de proteína vegetal e animal da espécie fazem necessário testar meios que permitam a sobrevivência e saúde destes organismos num longo prazo. Portanto, o objetivo deste estudo é contribuir ao estabelecimento de metodologias aplicáveis de forma padronizada a bioensaios com a espécie de anfípode *Q. aff. lutzi*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a concentração letal LC_{50} de metil metanosulfonato para o anfípode *Q. aff. lutzii* em 48 h.
2. Estabelecer um meio artificial que permita a manutenção e cultivo dos anfípodas sob condições controladas no laboratório.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Determinação do LC_{50} do MMS para o anfípode *Q. aff. lutzii*.

Os anfípodas foram coletados em março e abril de 2014 na lagoa costeira Paulista. No laboratório, os anfípodas foram aclimatados em incubadora com fotoperíodo de 12 h a 28° C, em recipientes com 125 mL de água da lagoa filtrada e autoclavada. Como alimento, foram utilizados restos vegetais secos de macrófitas (da lagoa de origem) e autoclavados e ração comercial (Neon, MEP 200 complex, Alcon) na proporção de 1 *pellet*/anfípode. O experimento consistiu em 2 réplicas por combinação tratamento/gênero. O experimento com MMS ocorreu em duas etapas: A primeira em um ensaio piloto nas concentrações de 0, 50, 100 e 200 mg/L onde foi verificado que a taxa de mortalidade em 48 horas para ambos os gêneros foi de 100%. A segunda etapa compreendeu a faixa de: 0,2, 5, 10, 20 e 30 mg/L para um bioensaio de 48 horas. Houve a cada 24 horas, troca de água e alimento (Tabela 9). Foi utilizado o programa STATISTICA, v. 7 (Statsoft Inc.) para a obtenção da regressão que relaciona a mortalidade (%) e Probit com a concentração de MMS. A análise da variância (ANOVA não paramétrica Kruskal-Wallis) e a comparação de médias (teste de Tukey) também foram realizados com este programa.

Tabela 9: Condições experimentais realizadas nos bioensaios com MMS.

Bioensaios com MMS	Aclimação (h)	Alimento*	Controles (réplicas por sexo)	Tratamento (réplicas por sexo)
I - Primeira etapa	96 h	0,070 g	2	3 (2 em ♀) 3 (1 em ♂)
II- Segunda etapa	96 h	0,070 g	2	4 (2 em ♀ e ♂)

3.3.2 Determinação de um meio artificial para o anfípode *Q. aff. lutzi*.

Neste experimento, foi realizado um primeiro bioensaio (bioensaio 1) utilizando anfípodas da lagoa Paulista coletados em Novembro de 2014 para um bioensaio piloto, a salinidade da água desta lagoa apresentou salinidade de 1.8. Um segundo experimento (bioensaio 2) foi feito com anfípodas da lagoa Carapebus, coletados em Janeiro de 2015 com salinidade de 8.3. Os anfípodas foram acondicionados em caixas plásticas com água e vegetação e transportados até o laboratório. A água das lagoas também foi coletada, sendo a temperatura medida com o auxílio de um termômetro de mercúrio no local da coleta. Durante a triagem, os anfípodas foram separados por sexo e acondicionados em becker de 600 mL com água da lagoa e alimento autoclavado (restos de matéria vegetal seca de macrófitas da lagoa de origem), onde permaneceram em incubadora em fotoperíodo de 12 h, a temperatura de 27° C, por um período de 4 dias antes do início dos bioensaios. Durante o período de aclimação no laboratório, a água da lagoa foi gradualmente substituída pela mesma água, mas desta vez filtrada e autoclavada. Este procedimento ocorreu para que fosse evitado o estresse dos animais às condições laboratoriais.

O meio básico descrito na Tabela 10, foi obtido conforme o protocolo de Knie & Lopes (2004), a partir de 4 soluções. Solução 1 (400 ml): 15,0 g de cloreto de cálcio (CaCl₂); Solução 2 (100 mL): 12,33 g de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O); Solução 3 (100 mL): 0,58 g de Cloreto de Potássio (KCl); e Solução 4 (100 mL): 6,48 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). A solução 4 foi esterilizada por filtro de membrana Nitrocelulose de 0,2 µm. Estas soluções foram estocadas em 10°C.

As quatro soluções foram misturadas conforme a Tabela 8. Após misturadas, foram oxigenadas por agitação em agitador magnético por um período de 24 horas. Logo foram esterilizadas em UV (254 nm) durante 25 min e colocadas na incubadora para atingirem a temperatura de manutenção dos anfípodes que é de 27° C. Após isto seus parâmetros foram medidos.

Tabela 10: Componentes do meio básico artificial de acordo com Knie & Lopes (2004).

Componente	Fórmula	Quantidade para 1 litro (mL)
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	4,0
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Cloreto de Potássio	KCl	1,0
Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	1,0

Foram realizados dois bioensaios de manutenção dos anfípodes durante 7 dias nos diferentes meios:

1) No primeiro, foram utilizados 6 fêmeas e três machos para cada meio e tratados individualmente (Tabela 11). Um meio consistiu na água coletada na Lagoa Paulista com salinidade de 1,8 e o meio artificial com 0,3 de salinidade.

2) No segundo bioensaio, os indivíduos foram mantidos em triplicata em grupos de 10 por gênero (Tabela 11). O meio artificial foi o mesmo que no bioensaio anterior, mas o meio natural desta vez era proveniente da lagoa Carapebus com salinidade de 8,3.

Tabela 11: Condições experimentais dos bioensaios com meio básico.

Bioensaios	Aclimação (h)	Alimento*	Controles (réplicas por sexo)	Trat.* (réplicas por sexo)
I - Lagoa Paulista	96 h	0,070 g e ração	3	1 (6)
II- Lagoa Carapebus	96 h	0,070 g e ração	3	1 (3)

*Trat.: número de tratamentos

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Concentração letal LC₅₀ do MMS para o anfípode *Q. aff. lutzi*.

Os parâmetros físicos e químicos da água da lagoa Paulista antes de se adicionar as concentrações de MMS encontram-se na Tabela 12. Os dados mostram que os parâmetros abióticos foram similares nas duas etapas deste bioensaio.

Como mencionado na metodologia, na faixa de concentrações de 50 a 200 mg/L de MMS todos os indivíduos morreram antes de completar as 48 h. No seguinte bioensaio, nas concentrações entre 0 e 30 mg/L, observou-se um leve aumento da mortalidade aos 20 mg/L, sendo que a 30 mg/L se atingiu rapidamente a mortalidade de 100 % (Fig. 16 e Fig. 17). A maior concentração sem efeito observado (CENO) foi de 10 mg/L MMS (Fig. 17). A média da ma em machos e fêmeas foi similar para todos os tratamentos (Fig. 17). O LC₅₀ tanto em machos como em fêmeas foi de 21,3 mg/L de MMS (Fig. 18).

Os resultados do teste Mann-Whitney (tabela 13), mostra que não houve efeito significativo entre os gêneros com o resultado do z ajustado de -1,066 e valor de p igual a 0,377.

Tabela 12 : Parâmetros físicos e químicos da água da Lagoa Paulista, utilizadas nos tratamentos da Etapa 1 e 2 antes das concentrações de MMS serem adicionadas.

Salinidade	O2 dissolvido (mg/L)	Condutividade (μ S)	pH	Temperatura ($^{\circ}$ C)
(1) 0,6	5,59	1,19	7,21	26,8
(2) 0,6	6,50	4,15	9,6	25

Tabela 13: Resultados do teste de Mann-Whitney da comparação entre tratamentos. $Z_{ajustado}$:-1,066 acima da diagonal; p :0,377 abaixo da diagonal. Valores significativos ($p < 0,5$) em cinza.

Concentrações de MMS (mg/L)	0	5	10	20	30
0	X	- 0,19	0,00	- 0,83	-2,53
5	0,885	X	0,19	- 0,66	-2,53
10	1,000	0,885	X	- 0, 83	-2,53
20	0,485	0,685	0,485	X	-2,53
30	0,028	0,028	0,028	0,028	X

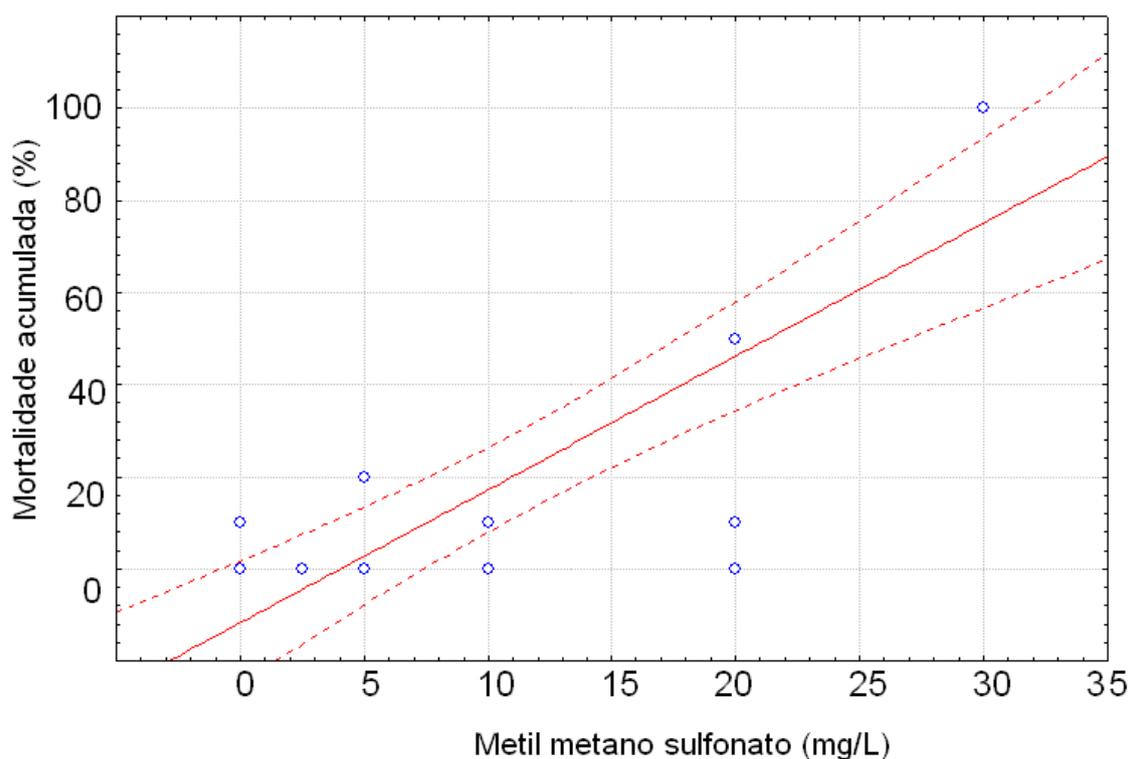


Figura 16: Regressão linear da mortalidade acumulada do anfípode *Q. aff. lutzi* a diferentes concentrações de MMS ($y = -11,713 + 2,893 * x$; $p = 0,000$; $r^2 = 0,686$).

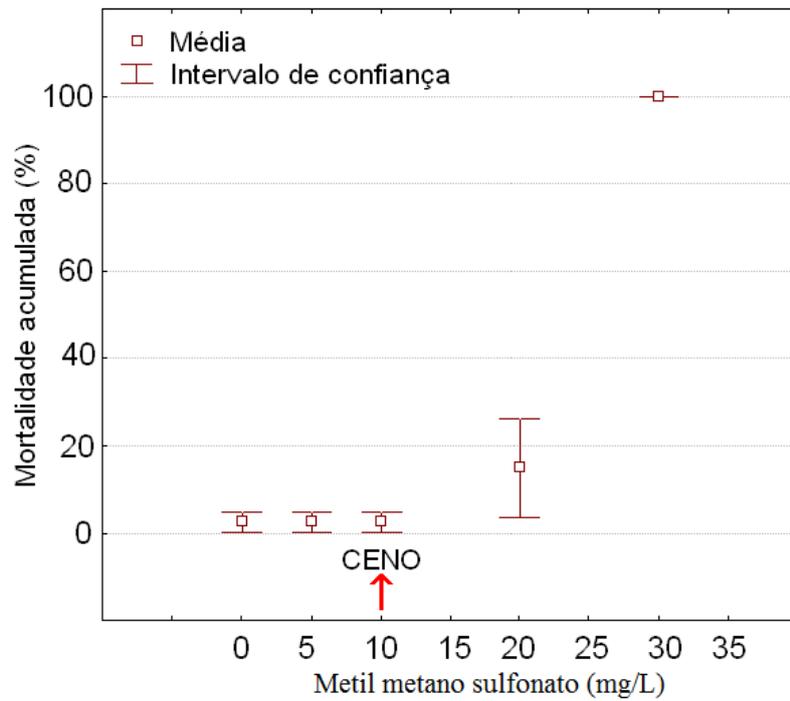


Figura 17: Médias correspondentes aos diferentes tratamentos. CENO: maior concentração sem efeito observado em 48 h. O valor de p significativo: é 0,00.

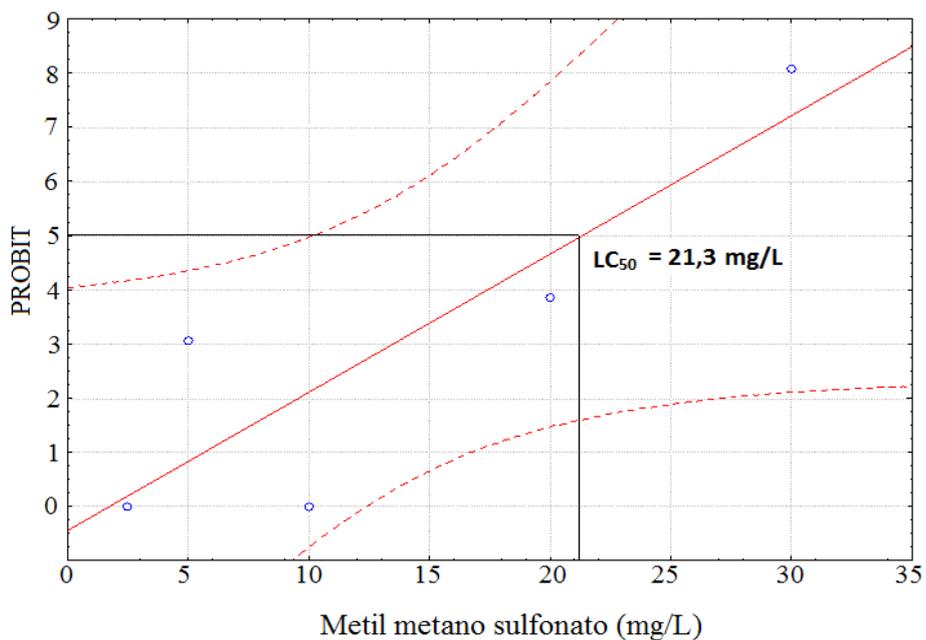


Figura 18: Extrapolação da concentração letal LC_{50} de MMS para o anfípode *Q. aff. lutzii* a partir da função Probit. O Probit 5 correspondente a 50% de mortalidade acumulada (ma).

3.4.2 Meio artificial para o anfípode *Q. aff. lutzi*

Observaram-se grandes diferenças nos parâmetros físicos e químicos da água das lagoas Paulista e Carapebus após a ruptura da barra na segunda lagoa, que levou a um aumento da salinidade. Estas diferenças são observadas na Tabela 14 A água do meio básico (Tabela 15) apresentou valores aproximados para os dois bioensaios, pois provinham do mesmo estoque de soluções.

Tabela 14: Parâmetros físicos e químicos da água das lagoas (1) Paulista e (2) Carapebus.

Salinidade	O2 dissolvido (mg/L)	Condutividade (μ S)	pH	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Dureza
(1) 1,8	5,66	7,06	5,71	20,4	
(2) 8,4	6,67	14,36	8,15	24,7	Muito dura

Tabela 15: Parâmetros físicos e químicos do meio básico artificial do primeiro (1) e do segundo (2) bioensaio.

Salinidade	O2 dissolvido (mg/L)	Condutividade (μ S)	pH	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Dureza
(1) 0,3	11,23	555 μ S	8,30	26,7	Branda
(2) 0,3	8,20	649 μ S	8,20	25,7	Branda

Os resultados observados de ma do anfípode *Q. aff. lutzi* quando mantido em meio artificial e em meio natural (água da lagoa) são apresentados na Figura 19. Observaram-se resultados contraditórios quanto à ma no meio artificial nos anfípodas após 7 dias, dependendo de sua lagoa de procedência. Os anfípodas procedentes da lagoa Paulista com salinidade de 1,8 mostraram uma baixa ma no meio artificial de 0, 3 de salinidade (11%) menor que seu meio natural (55%); e os anfípodas procedentes da lagoa Carapebus com salinidade de 8,4 mostraram uma alta ma no meio artificial (67%) e uma baixa mortalidade no seu meio natural (12%) (Fig. 19).

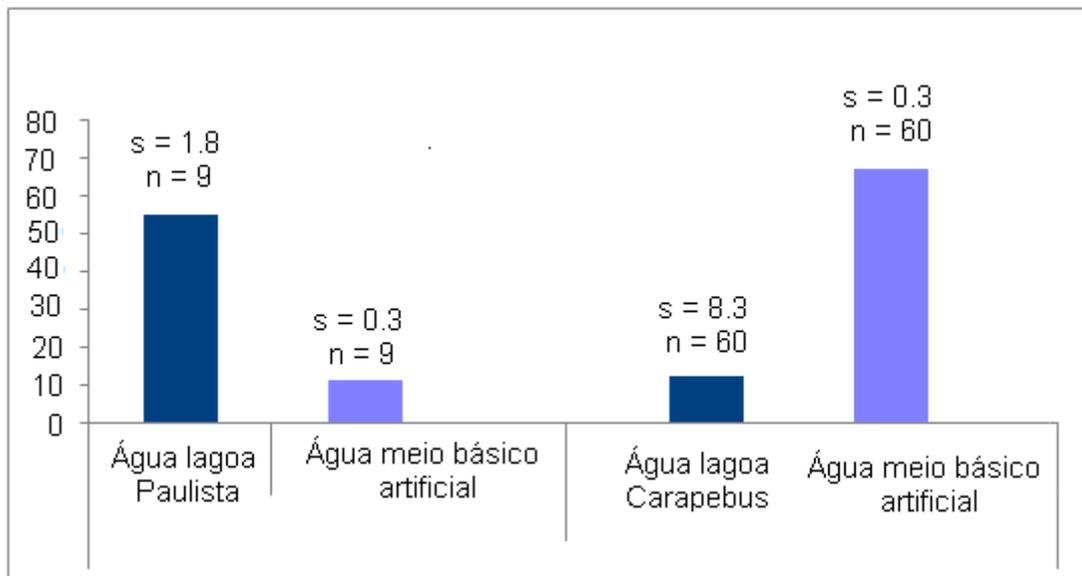


Figura 19: Mortalidade acumulada do anfípodas *Q. aff. lutzii* nos diferentes meios naturais e artificial. s = salinidade; n= número de anfípodas

3.5 DISCUSSÃO

A padronização das condições de manutenção em laboratório do anfípodas *Q. aff. lutzii* e a determinação de um controle positivo de efeito conhecido para a espécie são alguns dos vários fatores a serem alcançados para estabelecer este anfípodas como um modelo animal reconhecido. Trabalhos anteriores já mostraram o efeito do petróleo sobre a espécie (Weber *et al.* 2013; Vieira, 2014), mostrando que é possível realizar testes ecotoxicológicos e obter resultados consistentes. A biologia reprodutiva desta espécie também já foi estudada (Medeiros & Weber, submetido).

O presente estudo conseguiu avançar na padronização deste modelo animal, identificando sua faixa de tolerância aos fatores ambientais de salinidade e temperatura e permitiu reconhecer, através da osmolalidade da hemolinfa, suas limitações para tolerar altos valores de salinidade, caracterizando-se como uma espécie dulcícola e de águas salobras. Em relação à sua tolerância térmica, este se mostrou euritérmico, mas como um organismo que vive próximo ao extremo superior de sua tolerância a temperatura.

Este estudo permitiu determinar as concentrações de MMS, como controle positivo, o que será de grande importância para futuros estudos de genotoxicidade. O MMS tem sido amplamente utilizado em testes de genotoxicidade e em vários grupos animais de vertebrados e invertebrados, principalmente através da técnica do ensaio do cometa. Estes, são ensaios sensíveis que podem detectar danos mesmo quando submetidos a exposições de baixas concentrações. Embora, no presente estudo, a mortalidade dos anfípodes tenha sido quase nula nas concentrações de 2,5 até 10 mg/L de MMS, é possível que danos geno ou citotóxicos já estejam ocorrendo no organismo. Weber *et al.* (2013) observaram em 48 h danos genotóxicos (ensaio do cometa) elevados em hemócitos de machos e fêmeas de *Q. aff. lutzi* na concentração de 10 mg/L MMS, quando usado como controle positivo. Lacaze (2011) observou índices crescentes de dano genotóxico (ensaio do cometa) ao longo do tempo (2 a 21 dias) em concentrações de 0,8 a 7 mg/L de MMS em células germinativas do anfípode *Gammarus fossarum*. Outro estudo (Tin tin Su, 2010) mostrou que o MMS em uma concentração de 9 mM, inibe a mitose de embriões do cnidário *Hydractinia echinata*. Também, foi observado que embriões do ouriço do mar *Sphaerechinus granularis* expostos a concentrações de metil metano sulfonato, apresentam efeitos drásticos sobre a atividade da síntese de proteínas, e no nível de fatores de conversão, integridade e modificações pós-traducionais, com indução da apoptose em concentrações de 10 mM a apoptose (Bouffant, 2008).

Em relação ao estabelecimento do meio artificial para o anfípode, serão necessários maiores estudos para atingir este objetivo. Este bioensaio foi realizado após a abertura da barra da lagoa de Carapebus, levando a mudança nas características físico-químicas da lagoa e alterando por tanto a abundância da espécie. Além disso, a estiagem observada a seguir na região das lagoas do PARNA da restinga de Jurubatiba, ocasionou variações dos fatores físico-químicos das lagoas onde os anfípodes são coletados.

A diferença de salinidade das lagoas nas quais se encontravam os anfípodes poderiam explicar em parte os resultados contraditórios de ma do anfípode observada no meio básico artificial. No primeiro bioensaio, os anfípodes submetidos ao meio básico podem ter sobrevivido em uma maior taxa, devido às características da água da lagoa onde foram coletados estarem mais próximas a salinidade do meio artificial, ao

contrário do que ocorreu com anfípodes procedentes da lagoa Carapebus. A procedência diferenciada dos anfípodes também pode ser um fator importante, pois as diferenças nas condições físico-químicas da lagoa podem indicar linhagens de anfípodes diferentes, procedentes de recolonização ou restabelecimento populacional com composição genética alterada em relação à população originária e estável prévia a entrada de águas marinhas pela ruptura da barra. Indivíduos com diferentes graus de susceptibilidade, pelas condições alteradas do meio, podem também ter sido coletados.

3.6 CONCLUSÕES

O CENO e o LC₅₀ de MMS em 48 h para o anfípode *Q. aff. lutzi* é de 10 mg/L e 21,3 mg/L, respectivamente.

Os resultados da utilização do meio básico artificial para o cultivo do anfípode *Q. aff. lutzi* não se mostraram conclusivos. No entanto, a baixa mortalidade observada no primeiro bioensaio, com indivíduos provenientes da Lagoa Paulista, sugere que outros fatores, como a mudança drástica provocada pelo rompimento da barra arenosa, podem ter afetado a baixa sobrevivência no meio básico artificial dos anfípodas de Carapebus.

4.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições de aclimação do anfípode em água da lagoa de origem com 0,2 a 0,6 de salinidade foram bem estabelecidas em incubadora a 27° C, foto período de 12 horas com ração comercial e restos vegetais com trocas parciais a cada 48 horas e troca total em uma semana.

Não foi possível observar o desenvolvimento dos juvenis provenientes da reprodução e da coleta até a fase adulta.

Os anfípodes machos são indicados para bioensaios de curto prazo e caso necessário experimentos de longa duração sugere-se individualizá-los devido a agressividade.

Fêmeas são indicadas para ensaios de curta e longa duração em um número de 10 a 12 anfípodes por potes de 125 ml.

Os anfípodes toleraram amplas variações de salinidade e temperatura nos bioensaios. No entanto, é provável que a tolerância seja diminuída frente a variações drásticas dos fatores abióticos.

O LC₅₀ encontrado de 36 corresponde aproximadamente a salinidade do mar. Considerando eventos de abertura de barra, este dado torna-se preocupante, uma vez que há a entrada brusca de água salina nas regiões próximas a barra, onde comumente os anfípodes são abundantes.

O fato dos anfípodes se encontrarem no seu habitat natural a temperaturas próximas ao seu limite de tolerância é preocupante e pode ser agravado em períodos de estiagem.

Neste estudo foi possível estabelecer a toxicidade do composto MMS a nível de organismo (para esta espécie) numa ampla faixa de concentrações permitindo a escolha de concentrações adequadas de MMS em bioensaios de curta e longa duração (agudo/crônico).

Novos ensaios que avaliam o meio básico aqui testado e complementos alimentícios deverão ser realizados futuramente para estabelecer as melhores condições de meio artificial de manutenção em laboratório do anfípode *Q. aff. lutzi*.

Os resultados contraditórios observados na manutenção dos anfípodes *Q. aff. lutzi* no meio básico artificial, quando utilizados anfípodes de diferente procedência (diferentes lagoas), sugere que provavelmente as condições fisiológicas dos anfípodes e sua composição genética podem estar influenciando a sobrevivência destes no laboratório.

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarset A. V., Zachariassen K. E. 1988. Low temperature tolerance and osmotic regulation in the amphipod *Gammarus oceanicus* from Spitsbergen waters. *Polar Research*, 6: 35-41 p.
- Abessa D. M. S., Sousa E. C. P. M., Rachid B. R. F., Mastroti R. R. 1998. Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a tool in marine sediments contamination assessment. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41: 225–230 p.
- Allan E.L., Froneman P.W., Hodgson A.N., 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337: 103–108 p.
- Aragão M. A., Araújo R. P. A. 2006. in: Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. Zagatto P. A. , Bertoletti E. 2008 .E. São Carlos: RiMa, 117-147 p.
- Asari K. P. 1983. On two new species of gammarids (Amphipoda, Crustacea) from Andaman and Nicobar islands, India. *Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris 2*: 641-649 p.
- Augusto A. S. 2005. A invasão da água doce pelos crustáceos: o papel dos processos osmorregulatórios. Tese de doutorado em Ciências, área de Biologia comparada. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, 123 p.
- Barnard K. H., 1940. Contributions to the crustacean fauna of south Africa. XII. Further additions to the Tanaidacea, Isopoda and Amphipoda, together with keys for the identification of the hitherto recorded marine and freshwater species. *Annals of the South African Museum*, 32: 381-543 p.
- Blasius B.J., Merritt R.W., 2002. Field and laboratory investigations on the effects of road salt (NaCl) on stream macroinvertebrate communities. *Environmental Pollution*, 120: 219–231 p.

- Bouffant R., Boulben S., Cormier P., Mulner-Lorillon O., Bellé R., Morales J. 2008. Inhibition of translation and modification of translation factors during apoptosis induced by the DNA-damaging agent MMS in sea urchin embryos. *Experimental cell research*, 314(5): 961-968 p.
- Buikema, A.L., Benfield, E.F., 1979. Use of macroinvertebrate fauna and water quality of saline river system in south-western Australia. *Hydrobiologia*, 248: 143–160 p.
- Calosi P., Ugolini A., Morritt D. 2005. Physiological responses to hyposmotic stress in the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142 (2005): 267-275 p.
- Cairns J. Jr., Heath A. G., Parker B. C. 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia*, 47:135–171 p.
- Castro C. M. V. C., Santos L. P. S., Torreiro A. G. A. G., Garcia K. S. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57(1): 33–41 p.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357/05. 2005. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, SEMA.
- Cortez F. S. 2011. Avaliação ecotóxica do fármaco triclosan para invertebrados marinhos. Dissertação de Mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, 196 p.
- Costa C. R. , Olivi P., Botta C. M. R., Espindola E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 7: 1820-1830 p.
- Delgado L., Guerao G., Ribera C. 2011. Effects of different salinities on juvenile growth of *Gammarus aequicauda* (Malacostraca: Amphipoda). *International Journal of Zoology*, 2011: 1-6 p.

- EMBRAPA , 2010 – Importância de estudos ecotóxicológicos com invertebrados do solo. ISSN 1517-8498. Rio de Janeiro. 36 p.
- Esteves, F. A., 1998. Lagoas costeiras: origem, funcionamento e possibilidades de Manejo. Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil: 63-87 p.
- Esteves F. A. 2011. Do índio Goitacá à Economia do Petróleo: Uma viagem pela história e Ecologia da maior restinga protegida pelo Brasil. Rio de Janeiro: Editora Essentia, 225 p.
- Fabbender C.; Braunbeck T. 2013. Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 91 n. 1: 89-95 p.
- Farjalla V. F., Farias B. M., Esteves F. A. 2002. The relationship between DOC and planktonic bacteria in tropical coastal lagoons. Archiv für Hydrobiologie, 16: 97-119 p.
- Freire C., Cavassin F., Rodrigues E., Torres A., McNamara J.C. 2006. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. Comparative Biochemistry and Physiology, 136(A): 771-778 p.
- Fu D., Calvo J. A., Samson L. D. 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nature Reviews Cancer, 12(2): 104-120 p.
- Henriques O. C., Baptista D. F., Nessimian J. L. 2007. Sewage input effects on the macroinvertebrate community associated to *Typha domingensis* Pers in a coastal lagoon in southeastern Brazil. Brazilian Journal of Biology, 67: 73-80 p.
- Heugens E. H. W., Hendriks A. J., Dekker T., Van Straalen N. M. , Admiraal W. 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. Critical Reviews in Toxicology, 31: 247-284 p.
- Kamran, G. S. & J. L. Barnard, 1979. Classificatory revisions in Gammaridean

- Amphipoda (Crustacea). Part 1. Proceeding of the Biological Society of Washington, 92: 106-165 p.
- Kaina B. 2004. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long Road traveled still a far way to go. Cytogenetic and genome research Basel, 104:77-86 p.
- Keating, K. I., Caffrey, P. B., & Schultz, K. A. 1989. Inherent problems in reconstituted water. Aquatic toxicology and hazard assessment, 12: 367-378 p.
- Knie J. L.W., Lopes E. W. B. 2004 .Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289 p.
- Lacaze E., Geffard O., Bony S., Devaux A. 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 700(1): 32-38 p.
- Lagadic L., Caquet T. 1998. Invertebrates in testing of environmental chemicals: Are they alternative?. Environmental health perspectives, 106: 593- 611 p.
- Lameira V., 2012 Estudo dos efeitos ecotóxicológicos dos fármacos paracetamol e dipirona sódica para organismos aquáticos. Tese de doutorado em Ciências em tecnologia nuclear – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 96 p.
- Latterza J. O. 2012. Sobrevivência e crescimento dos camarões marinhos da família peneidae testados em diferentes salinidades: uma revisão bibliográfica. Monografia curso de Oceanografia. Universidade Federal do Maranhão. 43 p.
- Lee C., Bell M. 1999. Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. Trends in Ecology and Evolution, 24 (7): 284-288 p.
- Leite F. P. P., Tararam A. S. , Wakabara Y. 1980. Composição e distribuição da fauna de Gammaridea na região da Enseada da Fortaleza - Ubatuba, Estado de São Paulo. Boletim do Instituto de Oceanografia, São Paulo, 29: 279-299 p.
- Lincoln R. J. 1979. British Marine Amphipoda: Gammaridea. British Museum (Natural History). Northumberland Press Ltd., London, U.K.: 658 p.
- Lidzbarsky G.A.; Shkolnik T.; Nevo E. 2009. Adaptive response to DNA-damaging

- agents in natural *Saccharomyces cerevisiae* populations from “Evolution Canyon”, Mt. Carmel, Israel. *Plos One* v. 4 n. 6: 5914 p.
- Lowry J. K., R. T. Springthorpe, 2005. New and Little-known Melitid amphipods from Australian waters (Crustacea: Amphipoda: Melitidae). *Records of the Australian Museum*, 57: 237-302 p.
- Lowry, J. K., L. Hughes. 2009. Maeridae, the Elasmopus Group. *Zootaxa*, 2260: 643-702 p.
- Magalhães D.P., Ferrão F. A. S. 2008. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12 (3): 355-381 p.
- Mantel L., Farmer L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. *The biology of Crustacea*. D E Bliss, Ed.geral, 161 p. apud Augusto A. S. 2005. A invasão da água doce pelos crustáceos: o papel dos processos osmorregulatórios. Tese de doutorado em Ciências, área de Biologia comparada. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, 123 p.
- Martins S. E. & Bianchini A., 2011. Toxicity tests aiming to protect brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *Journal of Monitoring*, 13: 1866-1875 p.
- Medeiros T. B., Weber L. I., (submetido). Reproductive strategy of the freshwater/brackish amphipods *Quadrivisio* aff. *Lutzi* (Crustacea, amphipoda, gammaridae) at unstable costal lagoon environment of sals weastena Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*.
- Minello M. 2004. Metanogênese sob a variação de salinidade em lagoas costeiras do Norte Fluminense: implicações nas condições osmóticas e na competição por substratos. Dissertação de Mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 66 p.
- Moraes R. B. C., Pfeiffer W. C., Guimarães J. R. D., Borges A. L. N. 2000. Development of sediment toxicity test with tropical penaeid shrimps. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(7): 1881–1884 p.

- Nielsen S. K. 2013. Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente. Santos: Editora Santos, 611 p.
- Odum E. P. 1988. Fundamentos de Ecologia. Rio de Janeiro : Guanabara 7ª ed., 434 p.
- Plaa G. L. 1982. Present status: toxic substances in the environment. Canadian Journal of physiology and pharmacology, 60: 1010-1016 p.
- Péqueux A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. J. Crust. Biol., 15: 1 – 60 p.
- Piscart C., Lecerf A., Usseglio-Polatera P., Moreteau J.C., Beisel J.N. 2005. Biodiversity patterns along a salinity gradient: the case of net-spinning caddisflies. Biodiversity and Conservation, 14: 2235–2249 p.
- Potts W. T. W., Parry G. 1964. Sodium and chloride balance in the prawn *Palaemonetes varians*. J. Exp. Biol, 41: 591-601 p.
- Rinderhagen M. J., Ritterhoff G. P., Zauke A. G. 2000. Biomonitoring of polluted water-Reviews on actual topics in Environ Res Forum, 9: 161-194 p.
- Romano N., Zeng C. 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications to aquaculture productivity, methods for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. Aquaculture, 334-337: 12-23 p.
- Ruppert E., Barnes, 2005, R.D. 1996. Zoologia dos Invertebrados. 6ª ed., Roca Ed., São Paulo. 1029 p.
- Ruppert E., Barner R. D. 2005. Zoologia dos Invertebrados. 7ª Ed. São Paulo: Editora Roca, 1168 p.
- Shoemaker C. R., 1933. Amphipoda from Florida and The West Indies. American Museum Novitates, 598: 1-24 p.
- Silva E.I.L., Shimizu A., Matsunami H. 2000. Salt pollution in a Japanese stream and its effects on water chemistry and epilithic algal chlorophyll-a. Hydrobiologia, 437: 139–148 p.
- Sornom P., Felten V., Médoc V., Sroda S., Rousselle P., Beisel N.J. 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli*

- (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environmental Pollution*, 158: 1288-1295 p.
- Stebbing T. R. R. 1907. The fauna of brackish ponds at Port Canning, Lower Bengal. Part V.- Definition of a new genus of amphipoda, and description of the typical species. *Records of the Indian Museum*, 1: 159-162 p.
- Stephensen, K., 1933. Fresh and brackish water Amphipoda from Boanire, curaçao and aruba *Zoologische Ergebnisse einer Reise nach Bonaire*, *Zoologische Jahrbücher*, 64: 437-446 p.
- Su, T. T. 2010. The effect of a DNA damaging agent on embryonic cell cycles of the cnidarian *Hydractinia echinata*. *PloS one*, 5(7): 11760 p.
- Suhett A. L., Steinberg C. E., Santangelo J. M., Bozelli R. L., Farjalla V. F. 2011. Natural dissolved humic substances increase the lifespan and promote transgenerational resistance to salt stress in the cladoceran *Moina macrocopa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(6): 1004-1014 p.
- Sumich J.L., Morrissey J. F. 2004. *Introduction to the Biology of marine life*. Editora: Jones and Bartlett Published, Mississauga, 449 p.
- Taylor H., Taylor E. W. 1992. *Gills and lungs: the exchange of gases and ions in*
- Augusto A. S. 2005. A invasão da água doce pelos crustáceos: o papel dos processos osmorregulatórios. Tese de doutorado em Ciências, área de Biologia comparada. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, 123 p.
- Ventura L. C., 2015 O efeito da salinidade em *Poecilia vivípara* Bloch & Schneider 1801 (Poeciliidae): explorando as variações no provisionamento materno e outras táticas reprodutivas. Dissertação de mestrado em Ecologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro RJ, 80 p.
- Vieira P. N., 2014. Resposta ao estresse oxidativo na exposição ao petróleo: Escolha de um gene de referência e análise da expressão do gene da catalase no anfípode *Quadrivisio* aff. *lutzi* (Crustacea, gammaridae). Dissertação de mestrado em

- Ciências Ambientais e Conservação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 65 p.
- Von Sperling, M. 2005. Princípios do Tratamento Biológico de Águas residuárias. 3 ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFGM, Belo Horizonte, MG, 2005 p.
- Williams, W.D., 1999. Salinisation: a major threat to water resource in the arid and semi-arid regions. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 4:85–91 p.
- Weber L., Carvalho L., Sá N., Silva V., Beralдини N., Souza V., Conceição M. 2013. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/fresh water amphipod *Quadrivisia* aff. *lutzi* (Gammaridea) as assessed using the comet assay. *Ecotoxicology*, 22: 642-655 p.
- Wijnhoven S., Van R. ,Van Riel M.C., Van Der Velde G. 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology* , 37: 151–158 p.
- Zagatto, P. A., Bertoletti E. 2006. *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos: Editora Rima, 464 p.
- Zagatto, P. A., Goldstein E. G. 1991, Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. *Ambiente*, 5: 13-20 p.

ANEXO I – NORMAS TÉCNICAS SOBRE ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

- ABNT-Associação brasileira de normas técnicas. 2008. Qualidade de água, determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarinos com anfípodos, Norma, ABNT-NBR.15638.
- ABNT-Associação brasileira de normas técnicas. 2004. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp. Norma ABNT-NBR 12713 21p.
- ABNT-Associação brasileira de normas técnicas. 2005. Ecotoxicologia aguda – Método de ensaio com misidáceos (*Crustacea*). Norma ABNT-NRB 15308, 17 p
- APHA 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association, American water works association, water environmental federation, 20 ed. Washington. 541 p.
- ASTM 2000. Standard test method for measuring the toxicity of sediment – associated contaminants. Philadelphia: American society for testing and materials. 117 p.
- OECD (organization for economic cooperation and development). 2004. OECD Guidelines for testing chemicals – fish, prolonged toxicity test: 14-day study. Guideline, 294, 9 p.
- USEPA, Environmental protection agency. 1996. EPA 712-c-96-114. Aquatic invertebrate toxicity test, freshwater daphnids: ecological effect test guidelines. Washington.USA
- USEPA, Environmental protection agency. 2002. EPA-821-R-01-1. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving Waters to freshwater and marine organisms. 5th ed. Washington.