

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**REAVALIAÇÃO DE TÉCNICAS
METODOLÓGICAS PARA BIOENSAIOS
TOXICOLÓGICOS COM O COPÉPODO
Acartia tonsa Dana 1849**

LAÍS FERNANDA DE PALMA LOPES

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Oceanografia
Biológica da Universidade Federal do
Rio Grande, como requisito parcial à
obtenção do título de MESTRE

Orientador: Dr. Erik Muxagata

**RIO GRANDE
Março, 2017**

**“NÃO É SOBRE CHEGAR NO TOPO DO MUNDO
E SABER QUE VENCEU.
É SOBRE ESCALAR
E SENTIR QUE O CAMINHO TE FORTALECEU.”
ANA VILELA**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar a minha família, mãe, pai e irmãos, por tudo e por sempre estarem junto comigo e acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Professor Dr. Erik Muxagata pela orientação, pelos ensinamentos e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À Professora Grasiela Lopes Leães Pinho e Sanye Soroldoni e por toda ajuda na área de ecotoxicologia. Aos professores Maurício Camargo e Paul Kinas, por toda a ajuda com as análises estatísticas.

Ao Laboratório de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos e pela disponibilidade do espaço de trabalho e fornecimento de algas e ajuda. À Professora Dra. Virginia Maria Tavano, pelos conselhos, conhecimento e incentivo.

Aos meus colegas do Laboratório de Zooplâncton Danielle Ortiz, Waldemar Amaral, Anette Duarte, Priscila Amaral, Letícia Baldoni, Claus Inck, Renato Nagata, pelo apoio e companhia durante o desenvolvimento desse trabalho. Em especial, à Vanessa Agostini, por toda ajuda em todo o trabalho. A Letícia Figueira, por toda ajuda e ter me acompanhado nesses dois anos.

Aos meus colegas de mestrado e amigos, por todos bons momentos, amizade e carinho durante meu mestrado.

À Estação Marinha de Aquacultura (EMA) e seus funcionários pelo fornecimento de água do mar.

E a todos que de certa forma contribuíram para esse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.2. Objetivo geral	9
1.2.1. Objetivos específicos.....	9
2. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS PARA BIOENSAIOS UTILIZANDO O COPÉPODO <i>Acartia tonsa</i> Dana 1849.....	11
2.1. Introdução.....	12
2.2. Material e Métodos.....	14
2.2.1. Cultivo de <i>Acartia tonsa</i>	14
2.2.1.1. Coleta e isolamento.....	14
2.2.1.2. Cultivo principal.....	16
2.2.1.3. Cultivo temporário.....	17
2.2.1.4. Unidades Experimentais.....	19
2.2.2. Avaliação do potencial de retenção do copépodo <i>Acartia tonsa</i> em diferentes malhas de rede.....	19
2.2.3. Avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com <i>Acartia tonsa</i>	22
2.2.4. Análises estatísticas.....	24
2.3. Resultados.....	28

2.3.1. Avaliação do potencial de retenção do copépodo <i>Acartia tonsa</i> em diferentes malhas de rede.....	28
2.3.2. Avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com <i>Acartia tonsa</i>	31
2.4. Discussão.....	35
2.4.1. Avaliação do potencial de retenção do copépodo <i>Acartia tonsa</i> em diferentes malhas de rede.....	35
2.4.2. Avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com <i>Acartia tonsa</i>	43
2.4.3. Considerações sobre as análises estatísticas empregadas.....	48
2.5. Conclusão.....	49
3. APRIMORAMENTO DOS FUNDAMENTOS DE BIOENSAIOS UTILIZANDO O COPÉPODO <i>Acartia tonsa</i> Dana 1849.....	51
3.1. Introdução.....	52
3.2. Material e Métodos.....	55
3.2.1. Procedimentos gerais.....	55
3.2.1.1. Unidades Experimentais (UE) utilizadas nos tratamentos.....	55

3.2.1.2. Testes de sensibilidade.....	56
3.2.2. Avaliação do tempo de aclimatação pós-coleta para o copépodo <i>Acartia tonsa</i>	57
3.2.3. Análise da sensibilidade entre organismos de <i>Acartia tonsa</i> cultivados e organismos recém-coletados do ambiente.....	59
3.2.4. Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de <i>Acartia tonsa</i>	61
3.2.5. Análises estatísticas.....	62
3.3. Resultados.....	64
3.3.1. Avaliação do tempo de aclimatação pós-coleta para o copépodo <i>Acartia tonsa</i>	64
3.3.2. Análise da sensibilidade entre organismos de <i>Acartia tonsa</i> cultivados e organismos recém-coletados do ambiente.....	67
3.3.3. Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de <i>Acartia tonsa</i>	69
3.4. Discussão.....	71
3.4.1. Avaliação do tempo de aclimatação pós-coleta para o copépodo <i>Acartia tonsa</i>	71
3.4.2. Análise da sensibilidade entre organismos de <i>Acartia tonsa</i> cultivados e organismos recém-coletados do ambiente.....	75
3.4.3. Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de <i>Acartia tonsa</i> expostos a antimicrobianos.....	81
3.4.4. A alimentação durante os bioensaios.....	83

3.5. Conclusão.....	84
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	85
5. LITERATURA CITADA.....	91
APÊNDICES	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais protocolos utilizados para testes de toxicidade aguda com *Acartia tonsa* e as diferenças em seus métodos, as quais serão apontadas no presente trabalho.....9

Tabela 2: Tratamentos utilizados para a avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*.....22

Tabela 3: Tratamentos utilizados para testar a sobrevivência no experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*.....23

Tabela 4: Valores médios e os desvios padrões finais dos parâmetros analisados durante o experimento avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa* : potencial de hidrogênio (pH), salinidade e percentagem de evaporação (%). “NA” indica não aplicável. Os tratamentos utilizados: A₂₅ - UE aberta com 25 mL de meio; A₅₀ – UE aberta com 50 mL de meio; A₁₀₀ - UE aberta com 100 mL de meio; F₂₅ - UE coberta com 25 mL de meio; F₅₀ - UE coberta com 50 mL de meio e F₁₀₀ - UE coberta com 100 mL de meio.....32

Tabela 5: Resultado da análise estatística Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn do experimento avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa* e $X^2 =$ Qui-quadrado resultante do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os tratamentos utilizados: A₂₅ - UE aberta com 25 mL de meio; A₅₀ – UE aberta com 50 mL de meio; A₁₀₀ - UE aberta com 100 mL de meio; F₂₅ - UE coberta com 25 mL de meio; F₅₀ - UE coberta com 50 mL de meio e F₁₀₀ - UE coberta com 100 mL de meio. “ns” indica não significativa, “*” indica significância ao nível de 0,05 e “***” ao nível de 0,01. “-“ indica que não foi possível realizar a análise devido a falta da medição dos parâmetros, já que houve a evaporação de todo o meio no tratamento A₂₅.....33

Tabela 6: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (D) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significativa. Y é Binomial ($n=5$, θ), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. O modelo da função GLM foi “Y~D” com função de ligação “logit”. D= densidade de estocagem (fator em 3 níveis: {D₁, D₂, D₃}). D₁= T₅; D₂= T₁₀; D₃= T₂₀.....34

Tabela 7: Tratamentos utilizados no teste toxicológico agudo de aclimação pós coleta..... 57

Tabela 8: Parâmetros da água marinha da Praia do Cassino adquiridos para o experimento da Avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*: potencial de hidrogênio (pH), Temperatura (T° C) e salinidade..... 58

Tabela 9: Tratamentos utilizados no teste de análise da sensibilidade entre *Acartia tonsa* cultivados e *A. tonsa* recém-coletados do ambiente..... 59

Tabela 10: Parâmetros iniciais adquiridos para o experimento da análise da sensibilidade entre *Acartia tonsa* cultivada e *A. tonsa* recém-coletada do ambiente: potencial de hidrogênio (pH), Temperatura (T° C) e salinidade..... 60

Tabela 11: Tratamentos utilizados na avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa* expostos a antimicrobianos..... 61

Tabela 12: Tratamentos utilizados na avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa* expostos ao DSS..... 62

Tabela 13: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (Trat) e diferentes tempos de aclimação (Tempaclim) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significativa, “*” indica significância ao nível de 0,05 e “***” ao nível de 0,01. Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. O modelo da função GLM foi “ $Y \sim \text{Trat} + \text{Tempaclim} + \text{Trat} \cdot \text{Tempaclim}$ ” com função de ligação “logit”. Trat= controle e tratamento com DSS (fator de 2 níveis: {C,T}). Tempaclim= tempos de aclimação (fator de 3 níveis: {0h, 20h, 30h}). Trat-Tempaclim= o efeito da interação entre os tratamentos controle e tratamentos com DSS e os tempos de aclimação..... 66

Tabela 14: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento de análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (Tratamento) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significativa e “*” indica significância ao nível de 0,05. Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. O modelo da função GLM foi

Y~Tratamento” com função de ligação “logit”. Tratamento= controles e tratamentos com DSS (fator com 4 níveis {C, A, T_c, T_A}).....69

Tabela 15: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa*. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (D) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significativa. Y é Binomial ($n=5$, θ), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. Y~Tratamento” com função de ligação “logit”. O modelo da função GLM foi: Y~Tratamento” com função de ligação “logit”. Tratamento= controles e tratamentos com o contaminante (fator de 4 níveis {TF, TM, TM*, TF*}).....71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia de uma fêmea (A) e um macho (B) de *Acartia tonsa* Dana 1849, utilizado nos experimentos. A seta em A aponta para o urossoma mais curto e largo de fêmeas enquanto em B, a seta indica a geniculação da antênula direita presente nos machos adultos Foto: Vanessa Ochi Agostini.....6

Figura 2: Mapa da região Sul do Brasil onde *Acartia tonsa* é comumente encontrada. No detalhe estão a região do Estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino onde as amostras foram obtidas..... 14

Figura 3: Sequencia dos procedimentos adotados para a separação e identificação de *Acartia tonsa* do restante da comunidade zooplânctônica para o estabelecimento dos cultivos. 1- Separação dos organismos mediante utilização de pipetas e placa de petri; 2- disposição dos organismos em gotículas; 3- identificação dos organismos nas gotículas por visualização em microscópio estereoscópico e 4- estabelecimento do cultivo de *A. tonsa* com os organismos positivamente identificados.....16

Figura 4: Esquema dos procedimentos adotados durante o experimento de avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede. Para a análise, quantidades pré estabelecidas de cada um dos estágios de *A. tonsa* foram identificados sob microscópio estereoscópico e separados em eppendorfs. 1- As réplicas contendo cada um dos estágios identificados foram transferidas para béqueres com 20 mL de meio; 2- filtragem do material de cada uma das réplicas pelas respectivas redes (180, 330 e 500 μm) e 3 – Todo o material que passou e o que ficou retido foram recolhidos e fixados com formaldeído à 4% e mantidos em eppendorfs para contagem.....20

Figura 5: Percentual de retenção de cada um dos estágios de copepodito de *Acartia tonsa* nas malhas de 180, 330 e 500 μm sendo em A o experimento com copépodos vivos e B o experimento utilizando copépodos fixados. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões. Onde: CI = copepodito 1; CII = copepodito 2; CIII = copepodito 3; CIV = copepodito 4; CV = copepodito 5 e CVI = copepodito 6.....29

Figura 6: Sobrevivência média (%) do copépodo *Acartia tonsa* durante o experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *A. tonsa*. Onde: $T_5 = 1$ organismo. 5 mL^{-1} (25 mL); $T_{10} = 1$ organismo. 10 mL^{-1} (50 mL) e $T_{20} = 1$ organismo. 20 mL^{-1} (100 mL). As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões.....34

Figura 7: Foto indicando o tamanho relativo dos diferentes estágios de *Acartia tonsa* em relação a uma malha de rede 180 μm37

Figura 8: Esquema indicando os passos seguidos no experimento de avaliação do tempo de aclimação pós-coleta. 1-Após a coleta foi realizada a separação de *Acartia tonsa* da comunidade zooplânctonica sob visualização em microscópio estereoscópico; 2- Os organismos identificados foram submetidos a aclimação de 0h, 20h ou 30h; 3, 4 e 5 - de acordo com a aclimação, foi realizado o teste de toxicidade aguda com duração de 72 h.59

Figura 9: Sobrevivência média (%) de *Acartia tonsa* no experimento de avaliação do tempo de aclimação pós-coleta. Onde: C_{0h} = Controle com 0 h de aclimação; C_{20h} = Controle após 20 h de aclimação; C_{30h} = Controle após 30 h de aclimação; T_{0h} = Tratamento com DSS com 0h de aclimação; T_{20h} = Tratamento com DSS após 20 h de aclimação e T_{30h} = Tratamento com DSS após 30 h de aclimação. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões. 65

Figura 10: Sobrevivência média (%) do copépodo *Acartia tonsa* durante o experimento da análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente. Onde: C = Copépodos do cultivo, sem DSS; A = Copépodos recém-coletados do ambiente, sem DSS; T_c = Copépodos do cultivo, com DSS e T_a = Copépodos recém-coletados do ambiente, com DSS. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões. 68

Figura 11: Sobrevivência média (%) do copépodo *Acartia tonsa* durante o experimento da avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas expostos a antimicrobianos. Onde: TF = Cultivo de fêmeas sem antimicrobianos; TM = Cultivo de machos sem antimicrobianos; TF* = Cultivo de fêmeas com antimicrobianos e TM* = Cultivo de machos com antimicrobianos. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões. 70

RESUMO

O copépodo Calanoida *Acartia tonsa* Dana 1849, vêm sendo sugerido em protocolos para uso em testes de toxicidade aguda por várias organizações. Entretanto, alguns aspectos metodológicos dos bioensaios com esta espécie ainda devem ser esclarecidos e re-avaliados. Neste estudo o objetivo foi avaliar métodos e procedimentos dos bioensaios. Apresentamos informações no segundo capítulo sobre: a retenção dos estágios de desenvolvimento de *A tonsa* em diferentes malhas de rede e o volume mínimo para ser usado em unidades experimentais (UE); E no terceiro capítulo: o tempo de aclimação pós coleta; a resistência entre copépodos coletados do ambiente e copépodos de cultivos e a sensibilidade de machos e fêmeas de *A. tonsa* expostos a antimicrobianos. Os experimentos foram conduzidos na sala de cultivo do Laboratório de zooplâncton e os resultados demonstraram que nenhuma das malhas testadas (180, 330 e 500 μm) foram eficientes no isolamento de apenas um estágio de desenvolvimento; que as UE necessitam um volume mínimo de 100 mL, e serem cobertas, e que os organismos necessitam de ao menos 30 horas de aclimação antes de serem utilizados nos experimentos. Os outros experimentos não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos quanto ao uso de copépodos de cultivos ou do ambiente ou diferenças de sensibilidade entre machos e fêmeas aos antimicrobianos testados. As informações apresentadas possibilitarão o aprimoramento dos procedimentos e métodos dos estudos e bioensaios de toxicidade aguda utilizando o copépodo *A. tonsa* como bioindicador.

Palavras-chave: Copépodo; *Acartia tonsa*; Testes toxicológicos agudo; Bioensaios; Cultivo.

ABSTRACT

The Calanoid copepod *Acartia tonsa* has been suggested in protocols to be used on acute toxicity tests by many organizations. Nevertheless, some methodological aspects of bioassays using this species needs to be clarified and revised. The aim of this study was to evaluate methods and procedures of bioassays. We present information in the second chapter about: the retention of the developmental stages of *A. tonsa* by different net meshes and the minimum volume to be used on each experimental unit (EU). And in the third chapter we present information about: the acclimation period after collection; the resistance between field and cultivated copepods and the sensitivity of males and females of *A. tonsa* to antimicrobials. The experiments were conducted on the culture room of the zooplankton laboratory and the results demonstrated that none of the meshes tested (180, 330 and 500 μm) could isolate just one developmental stage, the containers need to be covered with a minimum 100 mL and the organisms need an acclimation period of at least 30 hours before being used in experiments. The remaining experiments didn't presented significant differences ($p>0.05$) between cultured or field copepods or any differences of sensitivity between males and females to the antimicrobials tested. The information presented here will enable the improvement of the procedures and methods on studies and bioassays of acute toxicity using the copepod *A. tonsa* as a bioindicator.

Key words: Copepods; *Acartia tonsa*; Acute toxicity tests; Bioassay; Culture.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Copépodos representam o grupo dos crustáceos mais importante do mesozooplâncton devido à sua grande abundância, biomassa e diversidade (Raymont 1983, Mauchline 1998, Ruppert *et al.* 2005). Estes organismos são considerados um importante elo na cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos, não somente desempenhando um papel fundamental como consumidores primários, conectando o fitoplâncton a níveis tróficos superiores (Pane *et al.* 2012), mas também por seu papel na alça microbiana, permitindo que a matéria orgânica dissolvida, utilizada pelas bactérias, chegue ao topo da cadeia alimentar (Kjørboe 2009). Além disso, por abrangerem uma ampla faixa de tamanho durante o seu desenvolvimento, são presas naturais de muitas espécies de peixes em diferentes etapas do seu ciclo de vida (Strøttrup *et al.* 1986). Devido a isso, há um grande interesse no desenvolvimento de cultivos de copépodos para uso tanto na aquicultura, como alimento vivo para larvas de peixes (Buttino *et al.* 2012), quanto em estudos de ecotoxicologia, uma vez que estes organismos são sensíveis, e por isso úteis como bioindicadores (Ihara *et al.* 2010, Gorbi *et al.* 2012) ou como organismos testes em ensaios ecológicos populacionais, com o objetivo de se testar/avaliar diferentes condições físicas, químicas e biológicas que possam influenciar a população (*ie.* variações de temperatura, salinidade e pH assim como a quantidade, qualidade e composição do alimento) (Kjørboe *et al.* 1985).

A subclasse Copepoda é composta por um total de 10 ordens (Huys & Boxshall 1991) de microcrustáceos, com Calanoida, Cyclopoida e Harpacticoida consideradas as ordens dominantes em número de espécies (Bron *et al.* 2011). Estes microcrustáceos podem ser encontrados tanto nos compartimentos pelágicos quanto bentônicos dos ambientes marinhos e estuarinos (Beaugrand

et al. 2003). Os copépodos apresentam um desenvolvimento do ovo ao estágio adulto com doze instares sendo seis formas naupliares e seis estágios de copepoditos, no qual o estágio de copepodito VI é a forma adulta (Marcus & Wilcox 2007). O desenvolvimento dos copépodos é rápido, requerendo de alguns dias a algumas semanas para se tornar sexualmente maturo, sendo o tempo do ciclo de vida dependente da espécie, da temperatura, da salinidade (Devreker *et al.* 2004), da alimentação (Souissi *et al.* 1997) e da densidade populacional (Zhang & Uhlig 1993).

Copépodos Harpacticoidas foram os primeiros a serem utilizados em bioensaios (Barnes & Stanbury 1948) e considerados mais fáceis de serem cultivados do que os Calanoida (Bengtsson 1978, Lassus *et al.* 1984). Entretanto, diversos estudos demonstraram uma maior sensibilidade de copépodos Calanoida em relação a copépodos Harpacticoida a uma variedade de substâncias químicas (Ward & Ballantine 1985, O'Brien *et al.* 1988, Di Toro *et al.* 1991, ANZECC 2000, Stringer 2012).

Desde 1976 a U.S. *Environmental Protection Agency* (EPA) sugere o copépodo Calanoida *Acartia tonsa* (Fig. 1) para uso em testes de toxicidade de pesticidas. Copépodos preenchem todos os requisitos para testes de toxicidade (Van Dam *et al.* 2008) uma vez que são fáceis de cultivar, possuem uma ampla distribuição, elevada sensibilidade, ciclos de vida curtos (Lee 1977, Sosnowski & Gentile 1978, Arnott & Ahsanullah 1979, Girling 1989, Bushong *et al.* 1990, Nipper *et al.* 1993, Kusk & Petersen 1997, Lanzky & Halling-Sørensen 1997) e uma posição chave na cadeia alimentar costeira (Pane *et al.* 2012).

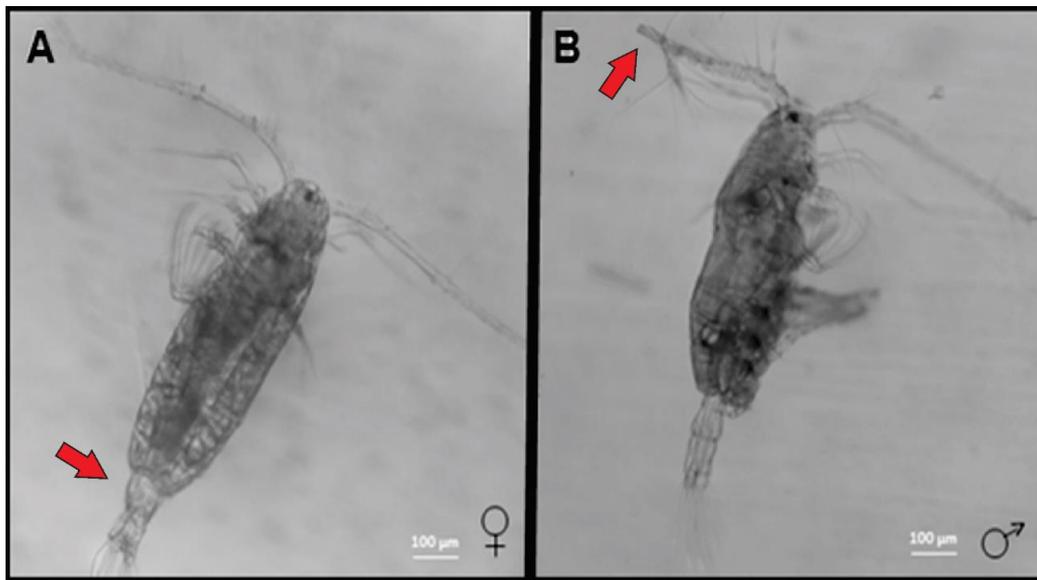


Figura 1: Fotografia de uma fêmea (A) e um macho (B) de *Acartia tonsa* Dana 1849, utilizado nos experimentos. A seta em A aponta para o urossoma mais curto e largo de fêmeas enquanto em B, a seta indica a geniculação da antênula direita presente nos machos adultos
Foto: Vanessa Ochi Agostini.

Em 1999 a *International Organization for Standardization* (ISO) implementou o protocolo ISO 14669 (ISO 14669 1999), no qual *Acartia tonsa* e outras duas espécies de copépodos (*Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco 1972, *Nitocra spinipes* Boeck, 1865) foram indicados para a padronização de bioensaios de toxicidade aguda de substâncias químicas solúveis ou que podem ser mantidas estáveis em suspensão ou em dispersão assim como de efluentes industriais ou de esgotos, tratados ou não tratados em águas marinhas e estuarinas. Desde então, outras organizações, órgãos, agências reguladoras e convenções também reconheceram o potencial e a importância dos copépodos na ecotoxicologia marinha e outros protocolos padronizados para testes de toxicidade com esses organismos foram estabelecidos (ASTM 2004, OECD 2007, OSPAR 2006, ISO 16778 2013).

Estes protocolos foram fundamentais na implementação e utilização de copépodos como organismos indicadores de alterações ambientais. Entretanto, é preciso destacar que algumas questões metodológicas ainda necessitam ser esclarecidas com um melhor detalhamento, pois desde o protocolo estabelecido pela EPA (1976) existe a indicação da utilização de uma malha de rede e uma pipeta para separação dos adultos dos outros estágios. A ISO 14669 (1999) recomenda uma metodologia parecida, porém ao invés de uma malha de 63 μm utiliza uma malha de 180 μm de abertura de malha para separar os adultos dos diferentes estágios de *A. tonsa* sem entrar em maiores detalhes de como é feita a separação dos organismos. Os protocolos da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e *Oslo and Paris* (OSPAR) por sua vez seguem a mesma metodologia da ISO 14669 como protocolo para testes agudos com *A. tonsa*.

O volume mínimo necessário por organismo nos bioensaios seria outra questão que deve ser reavaliada pois tanto a EPA (1976) quanto a ISO 14669 (1999) sugerem volumes ínfimos de 2 a 5 mL por organismo sem apresentar os motivos que levaram à adoção destes volumes. Além disso, tanto a EPA (1976) quanto a ISO 14669 (1999) assim como outros autores (Sosnowski & Gentile 1978, Ward 1995, Kusk & Petersen 1997) ignoraram completamente algumas questões biológicas como diferentes sensibilidades relacionadas ao sexo (Parrish & Wilson 1978, Mauchline 1998, Medina *et al.* 2002) e o estresse causado por uma alta densidade de estocagem (Strøttrup *et al.* 1986, Santos 2005, Peck & Holste 2006).

Da mesma forma, alguns autores utilizam organismos coletados diretamente do ambiente (Kaminski 2004; 2009, Stringer 2012, Finiguerra *et al.* 2013, Agostini 2014, Lopes 2014, Sun *et al.* 2015), contrastando com aqueles que utilizam organismos pré-cultivados (Toudal & Riisgård 1987, Pedroso *et al.* 2007, Ihara *et al.* 2010, Gorbi *et al.* 2012, Pham 2014) conforme proposto pela EPA (1976), ISO 14669 (1999), OSPAR e OECD. Desta forma existe uma necessidade de avaliação das diferentes técnicas utilizadas e de unificação e/ou adequação dos métodos.

Uma vez que testes toxicológicos devem ser padronizados para servirem como ferramenta de avaliação ambiental para demonstrar a possível toxicidade de um determinado poluente (Parrish & Wilson 1978), técnicas e metodologias devem ser testadas e comparadas, para se desenvolver um protocolo bem fundamentado, possível de ser realizado e repetido, já que experimentos padronizados permitem a seleção de um ou mais testes uniformes e úteis para uma variedade de laboratórios.

Deste modo, considerando as questões não detalhadas, assim como aquelas que não foram abordadas/exploradas nos protocolos internacionais, o objetivo principal deste trabalho foi reavaliar os procedimentos utilizados em bioensaios toxicológicos agudos envolvendo o copépodo Calanoida *A. tonsa* para melhorar o desenvolvimento e a confiabilidade dos testes.

A tabela 1 abaixo lista os principais métodos e procedimentos, os quais serão abordados neste trabalho, dos protocolos mais seguidos para bioensaios com o copépodo *A. tonsa*.

Tabela 1: Principais protocolos utilizados para testes de toxicidade aguda com *Acartia tonsa* e as diferenças em seus métodos, as quais serão apontadas no presente trabalho.

Métodos e procedimentos	Protocolos	
	ISO 14669 (1999)	EPA (1976)
Separação dos organismos	Rede de malha 180 μm e uso de pipetas sem detalhamento dos procedimentos.	Rede de malha 63 μm e uso de pipetas sem detalhamento dos procedimentos.
Densidade de estocagem utilizada	1 organismo. 5 mL^{-1} e UE cobertas	1 organismo. 2 mL^{-1} e UE cobertas
Organismos do cultivo ou ambiente	Cultivo	Cultivo
Organismos adultos sem distinção do sexo ou com distinção entre machos e fêmeas	Adultos sem distinção de sexo	Adultos sem distinção de sexo

1.2. Objetivo geral

Para investigar e tentar esclarecer esses pontos, no segundo capítulo desta dissertação serão abordadas questões relacionadas com os métodos e procedimentos dos bioensaios como: avaliar a melhor forma de separação de adultos utilizando redes e o volume mínimo necessário nas unidades experimentais em bioensaios com *A. tonsa*. Já no terceiro capítulo serão investigados tópicos sobre o aprimoramento dos fundamentos dos bioensaios, avaliando o tempo ideal de aclimação de *A. tonsa*; a sensibilidade entre organismos do ambiente frente aos oriundos de cultivos pré-estabelecidos e a diferença na sensibilidade entre machos e fêmeas.

1.2.1. Objetivos específicos

- Testar a capacidade de retenção dos estágios de desenvolvimento (I-VI) do copépodo *Acartia tonsa* (fixados e vivos) em diferentes tamanhos de malhas;

- Testar o volume mínimo necessário para bioensaios com *A. tonsa* e se existe influência da evaporação entre unidades experimentais cobertas e abertas e determinar a melhor densidade de estocagem de *A. tonsa* para uso em bioensaios toxicológicos agudos;
- Avaliar se *A. tonsa* deve ser aclimatada e qual seria o tempo ideal de aclimação para esta espécie de copépodo;
- Testar se há diferença na sensibilidade entre copépodos coletados diretamente do ambiente e copépodos de cultivos pré-estabelecidos;
- Estimar a sensibilidade de machos e fêmeas de *A. tonsa* em testes toxicológicos agudos com antimicrobianos.

**2. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS PARA BIOENSAIOS UTILIZANDO
O COPÉPODO *Acartia tonsa* Dana 1849**

2.1. Introdução

O uso do copépodo Calanoida *Acartia tonsa*, tem sido sugerido para testes de toxicidade e para estudos de poluição marinha desde 1976 (EPA 1976). Por apresentar características como ampla distribuição, ciclo de vida curto, facilidade de cultivo, elevada sensibilidade (ISO 14669 1999) e uma posição chave na cadeia alimentar costeira (Pane *et al.* 2012), *A. tonsa* é uma das espécies recomendadas para bioensaios de toxicidade aguda por diversas entidades internacionais como a U.S. *Environmental Protection Agency* (EPA), *International Organization for Standardization* (ISO) Oslo and Paris Commission (OSPAR) e a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).

Os protocolos da EPA (EPA 1976), e da ISO (ISO 14669 1999) são os mais utilizados e seguidos (Menconi & Cox 1994, Giddings *et al.* 2000, Weideborg *et al.* 2001, Wollenberger *et al.* 2003, Ogle 2005, Environment Agency 2007, Ihara *et al.* 2010, Hansen *et al.* 2014, Wendt *et al.* 2016, Zhou *et al.* 2015) para a execução de bioensaios toxicológicos agudos com a espécie *A. tonsa*. Entretanto, alguns dos pressupostos destes protocolos como a separação dos adultos utilizando redes e pipetas sem detalhamento dos procedimentos, ou a adoção de volumes arbitrários nas unidades experimentais (UE) podem levar a resultados equivocados.

A. tonsa é um copépodo holoplanctônico desovante livre que em condições favoráveis se reproduz continuamente (Raymont 1983, Dussart & Defaye 1995, Marcus 1996, Marcus & Wilcox 2007), ou seja, que desova continuamente na coluna de água onde todos os seus estágios (6 náuplios e 6 copepoditos) se desenvolvem. Por isso muito suscetível à questão de espaço,

ficando estressadas quando sujeitas a altas densidades de estocagem promovendo o canibalismo entre os indivíduos (Strøttrup *et al.* 1986) devido à competição por alimento e por espaço (Santos 2005) e afetando o número de ovos produzidos (Peck & Holste 2006). Por desovarem continuamente, todos os seus estágios se sobrepõem em um cultivo e por possuírem diversos estágios eles abrangem de 110 a 1500 µm de comprimento (Montú & Gloeden 1986, Sabatini 1990, Leandro *et al.* 2006, Marcus & Wilcox 2007). Por isso, a adoção de um tamanho de malha para separação de adultos pode levar a inclusão de estágios iniciais de copepoditos nos experimentos e com isso alterar os resultados de toxicidade e confiabilidade dos testes (Sprague 1995), uma vez que os estágios iniciais são mais sensíveis que os adultos (Hutchinson *et al.* 1998, Mohammed *et al.* 2009).

Sabendo-se da importância de bioensaios padronizados e bem delineados, a reavaliação de técnicas/métodos de experimentos de toxicidade aguda envolvendo o copépodo Calanoida *A. tonsa* é fundamental.

Devido a isto, este trabalho teve como finalidade: (i) avaliar o potencial de retenção dos estágios de desenvolvimento (I-VI) do copépodo *A. tonsa* (fixados e vivos) em diferentes tamanhos de malhas de rede e (ii) testar o volume mínimo necessário para as unidades experimentais utilizadas e se as mesmas devem permanecer cobertas ou abertas.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Cultivo de *Acartia tonsa*

2.2.1.1. Coleta e isolamento

Para iniciar um cultivo de copépodos da espécie *Acartia tonsa* (Fig. 1) no Laboratório de Zooplâncton, os organismos iniciais foram coletados diretamente do ambiente na Praia do Cassino, em frente a Estação Marinha de Aquacultura (EMA), Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil (Fig. 2), utilizando-se uma rede de plâncton cilindro-cônica de 30 cm de diâmetro com malhas de 200 μm , a qual foi arrastada horizontalmente em arrastos sub-superficiais.

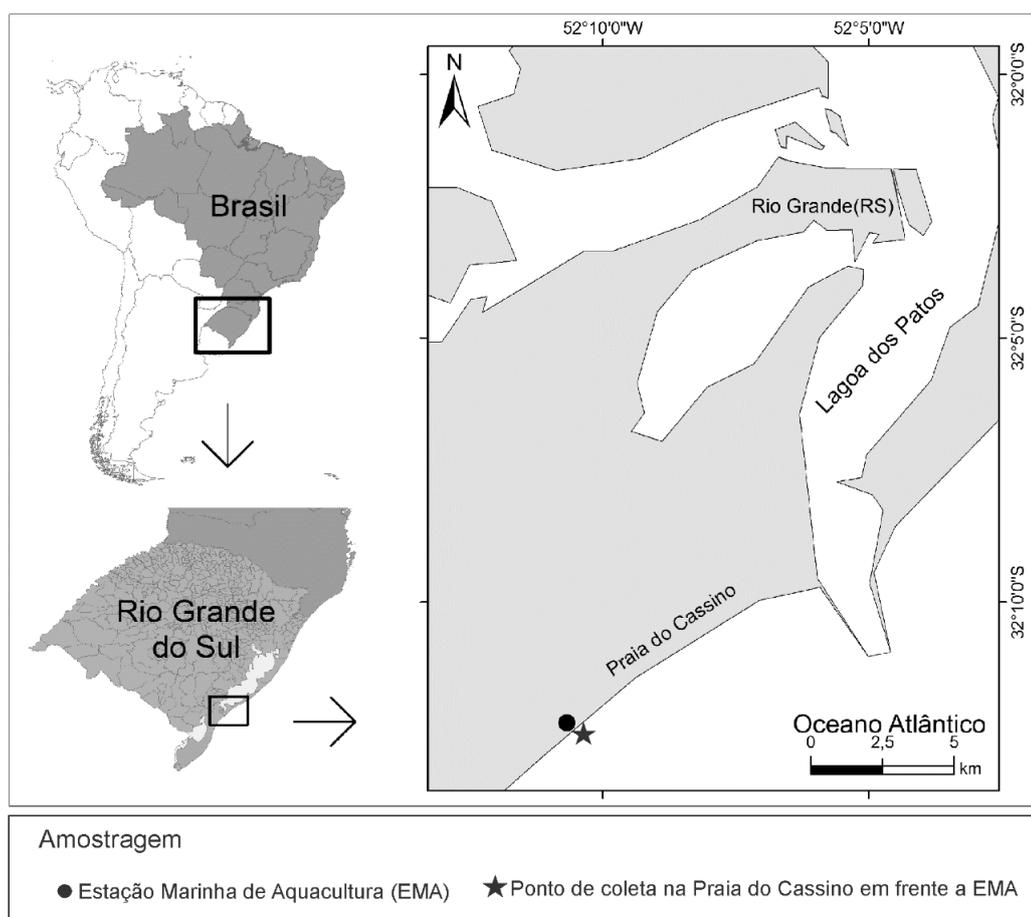


Figura 2: Mapa da região Sul do Brasil onde *Acartia tonsa* é comumente encontrada. No detalhe estão a região do Estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino onde as amostras foram obtidas.

No laboratório, os organismos zooplanctônicos presentes na amostra foram retirados mediante a utilização de pipetas com boca larga (tipo *Pasteur*) (Fig. 3) e depositados em gotículas em uma placa de petri onde, através da observação de cada organismo, sob microscópio estereoscópico (Coleman NSZ-606T) (Fig. 3), a espécie *A. tonsa* foi identificada de acordo com Björnberg (1981) e estagiadas conforme Sabatini (1990), sendo os Adultos (Fig. 1) isolados do restante da comunidade zooplanctônica. *A. tonsa* apresenta o dimorfismo bem marcado (Sabatini 1990), para a identificação de machos e fêmeas (Adultos), os machos possuem urossoma mais estreito, com cinco segmentos, sendo o quarto segmento muito curto. Já as fêmeas apresentam um urossoma mais curto, com três segmentos, sendo o segmento genital alongado. Os ramos caudais nos machos são mais curtos do que os da fêmea. Existe uma geniculação na antena direito do macho (Sabatini 1990).

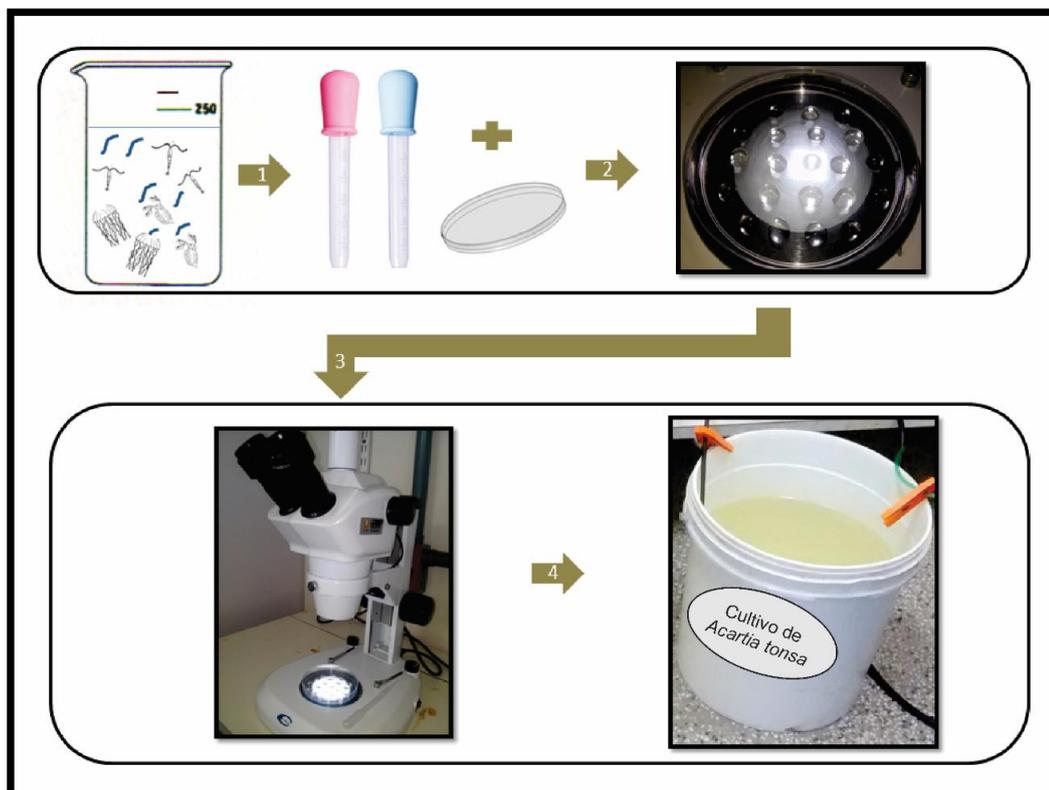


Figura 3: Sequencia dos procedimentos adotados para a separação e identificação de *Acartia tonsa* do restante da comunidade zooplancônica para o estabelecimento dos cultivos. 1- Separação dos organismos mediante utilização de pipetas e placa de petri; 2- disposição dos organismos em gotículas; 3- identificação dos organismos nas gotículas por visualização em microscópio estereoscópico e 4- estabelecimento do cultivo de *A. tonsa* com os organismos positivamente identificados.

2.2.1.2. Cultivo principal

Copépodos machos e fêmeas de *Acartia tonsa*, positivamente identificados do restante da população foram transferidos, um a um, para recipientes contendo 20 L de água marinha (pH ~8,3, salinidade 30) filtrada (Macherey- Nagel 0,7 μ m) e autoclavada, antes de ser utilizada. Os cultivos foram mantidos na mesma sala de cultivo climatizada do Laboratório de Zooplâncton (temperatura 23 °C) e com fotoperíodo 12C:12E para simular as condições de primavera e outono e aeração suave, diferente do que foi sugerido no método da ISO 14669 (1999) e EPA (1976).

Os organismos destes cultivos quando não utilizados diretamente nos experimentos foram alimentados uma vez por dia com uma dieta mista de uma microalga grande, a qual é mais apropriada para a produção de ovos dos organismos (Kaminski 2004) como *Conticribra* (= *Thalassiosira*) *weissflogii* Stachura-Suchoples & Williams 2009 (\emptyset 13,2 μm) (\sim 20.000 cel.mL⁻¹) (Teixeira *et al.* 2010) e uma microalga menor como a *Isochrysis galbana* Parke 1949 (\emptyset 4,7 μm) (\sim 160.000 cel.mL⁻¹) (Teixeira *et al.* 2010), para permitir a sobrevivência e crescimento dos náuplios (Kaminski 2004). Os inóculos iniciais foram fornecidas pelo Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos e mantidas em erlenmeyers autoclavados de 2 L com meio de cultivo F/2 (Guillard 1975) em incubadora tipo DBO (Marconi MA403) com salinidade 30, temperatura 23 °C, e sob aeração suave.

Para a manutenção da qualidade do cultivo, realizou-se a sifonagem do fundo e a troca parcial da água (30%) semanalmente, com renovação total do meio mensalmente. O fundo sifonado era depositado em um novo cultivo de 2 L, afim de eclodir os ovos, sendo os indivíduos, posteriormente transferidos para o cultivo original, após atingido fase adulta.

2.2.1.3. Cultivo temporário

Para se estimar a idade dos indivíduos que foram utilizados nos bioensaios, duas semanas antes dos experimentos foram realizados dois outros cultivos temporários, que derivaram do principal:

- O primeiro utilizou apenas estágios naupliares que foram separados dos outros estágios de *A. tonsa*. Primeiramente organismos

pertencentes a todos os estágios foram filtrados mediante a utilização de uma rede de 20 μm de abertura de malha e 10 cm de diâmetro, a qual foi submergida no cultivo principal três vezes e transferido para um béquer de 500 mL. Posteriormente, com uma rede de 180 μm este material foi filtrado novamente para reter o máximo de organismos que se encontravam nos estágios de copepoditos I à VI e devolvidos ao cultivo principal. Após a retirada dos estágios de copepoditos, o material restante foi submetido a uma inspeção em um microscópio estereoscópico para a retirada de organismos que não estivessem nos estágios naupliares, os quais foram devolvidos ao cultivo principal. Os náuplios remanescentes foram então transferidos para um novo recipiente de cultivo de 5L (nas mesmas condições do principal descrito na seção 2.2.1.2).

- Para o segundo, 50 copépodos adultos, tanto machos quanto fêmeas, foram colocados em um recipiente de PVC com 10,5 cm de diâmetro e 18,5 cm de altura, com o fundo coberto por uma malha de rede de 100 μm . Este recipiente era sobreposto a um recipiente de vidro com capacidade de 5L e mantida sob as mesmas condições do cultivo principal. Após 48 horas, este recipiente de PVC foi retirado e os organismos adultos devolvidos ao cultivo principal (2.2.1.2.).

A partir de então foi feito o acompanhamento diário das mudas dos organismos até atingirem a fase adulta, nos dois cultivos temporários.

2.2.1.4. Unidades Experimentais

As unidades experimentais (UE) utilizadas nos experimentos consistiam em recipientes de Poliestireno (PS) transparentes com capacidade para 200 mL. O meio utilizado nas UE foi água marinha filtrada conforme especificado na seção 2.2.1.2.

2.2.2. Avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede

Para a avaliação do potencial de retenção dos copépodos da espécie *Acartia tonsa*, organismos vivos e fixados (formaldeído a 4%) foram submetidos a procedimentos utilizando diferentes tamanhos de malhas, simulando coletas com redes de: 180 μm (sugerida pela ISO 14669 1999 para retenção de adultos), 330 μm e 500 μm . Cada tipo de malha foi acoplada em um tubo de PVC com quatro centímetros de diâmetro por dois de altura.

Para os organismos fixados, foram realizadas três réplicas para cada um dos estágios de copepoditos de *Acartia tonsa* (*i.e.* I ao VI) para cada uma das malhas testadas. Cada réplica continha 50 organismos de cada estágio que foram separados de amostras provenientes do Estuário da Lagoa dos Patos, coletadas durante o verão de 2012 com rede cilindro cônica de 200 μm no âmbito de Projeto PELD-ELPA (Pesquisa Ecológica de Longa Duração – Sítio 8- Estuário da Lagoa dos Patos e Costa Adjacente), mediante a identificação dos mesmos sob microscópio estereoscópico (Olympus SZ40).

Os organismos utilizados em cada réplica foram dispostos em béqueres contendo 20 mL de água marinha e as redes foram posicionadas em cadinhos já

preenchidos com 10 mL de meio. As réplicas contendo os indivíduos de cada um dos estágios foram despejadas em cada uma de suas respectivas redes. Após, foi recolhido o conteúdo dos cadinhos, o qual foi armazenado em eppendorfs e novamente fixados com formaldeído a 4 %, para a contabilização dos organismos que passaram pela rede e para o cálculo de quantos ficaram retidos (Fig. 4).

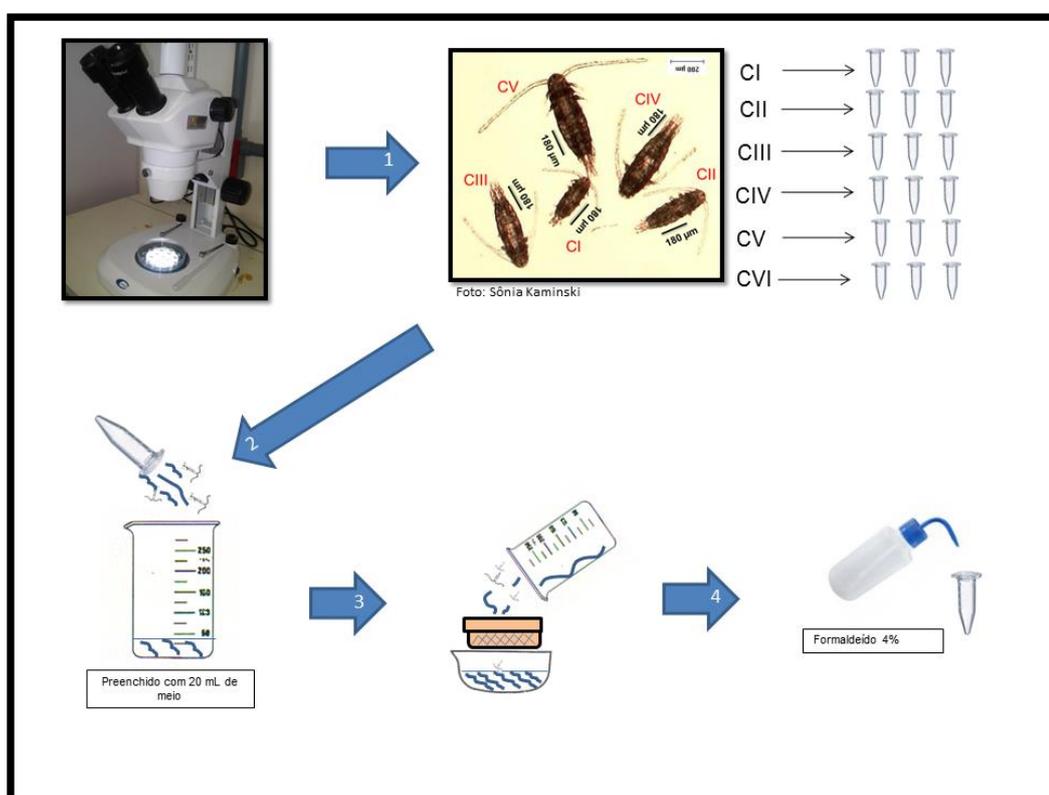


Figura 4: Esquema dos procedimentos adotados durante o experimento de avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede. Para a análise, quantidades pré estabelecidas de cada um dos estágios de *A. tonsa* foram identificados sob microscópio estereoscópio e separados em eppendorfs. 1- As réplicas contendo cada um dos estágios identificados foram transferidas para béqueres com 20 mL de meio; 2- filtragem do material de cada uma das réplicas pelas respectivas redes (180, 330 e 500 µm) e 3 – Todo o material que passou e o que ficou retido foram recolhidos e fixados com formaldeído à 4% e mantidos em eppendorfs para contagem.

Para a avaliação do potencial de retenção dos copépodos da espécie *A. tonsa* em condições de cultivo (organismos vivos), inicialmente foram separados

135 machos e 135 fêmeas adultos dos cultivos estabelecidos no item 2.2.1.3, e depositados em nove cultivos contendo 1,2 L de meio, sendo 15 copépodos machos e 15 fêmeas em cada cultivo. Estes cultivos foram mantidos durante três semanas e tratados da mesma forma que os cultivos já existentes no laboratório (Seção 2.2.1.2.), permitindo que os copépodos pudessem se reproduzir e apresentar indivíduos de todos os estágios de desenvolvimento. Após este período, três de cada um dos cultivos foram filtrado por uma das malhas, um de cada vez, fornecendo assim três réplicas para cada malha de rede. Os organismos retidos e os que passaram pelas malhas foram depositados em vidrarias adequadas e posteriormente fixados com formaldeído a 4 % para a verificação do estágio e quantificação dos mesmos em câmara de Bogorov, com auxílio de um microscópio estereoscópico (Olympus SZ40).

Medidas morfométricas do comprimento do prossoma, largura total, comprimento total, comprimento total até o final da cerda da furca, foram obtidas de 450 organismos de cada estágio de desenvolvimento dos copépodes fixados com auxílio de uma escala micrométrica ($\pm 25 \mu\text{m}$) acoplada na ocular do microscópio estereoscópico (Olympus SZ40). As medidas morfométricas do estágio CVI foram realizadas sem distinção de sexo.

Ainda, foram adquiridas, para avaliação do poro em relação a retenção dos organismos, as medidas das diagonais entre vértices opostos para as redes de 180, 330 e 500 μm .

2.2.3. Avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*

Este experimento foi dividido em duas etapas:

Na primeira etapa foi realizado um experimento de 72 horas, no qual não foram utilizados organismos, apenas mediu-se os parâmetros iniciais e finais de cada uma das UE (conforme 2.2.1.4.) com auxílio de um multiparâmetro (PCSTestr35 \pm 0,01 pH e \pm 0,5 °C) e um refratômetro (Atago S/Mill-E \pm 1 ‰), e também foi estimada a taxa de evaporação em cada UE, medindo o volume inicial e o volume final de cada UE utilizando uma proveta graduada. Para isto, foram realizados seis tratamentos com quatro réplicas, nos quais houve variação na quantidade de meio marinho utilizado por UE, sendo parte das UE cobertas por filme PVC e parte não (Tab. 2).

Tabela 2: Tratamentos utilizados para a avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*.

Tratamentos	Condições das Unidades experimentais (UE)
A₂₅	UE aberta com 25 mL de meio
A₅₀	UE aberta com 50 mL de meio
A₁₀₀	UE aberta com 100 mL de meio
F₂₅	UE coberta com 25 mL de meio
F₅₀	UE coberta com 50 mL de meio
F₁₀₀	UE coberta com 100 mL de meio

O experimento foi estático e sem aeração. Diariamente, foi retirado cuidadosamente sob visualização em microscópio estereoscópico (Olympus SZ40) utilizando um pipetador automático (Gilson Neo P1000N 100-1000 μ L), um volume de 1, 2 e 4 mL nas UE com 25, 50 e 100 mL, respectivamente, para adicionar um volume equivalente de alimento com a concentração de 20.000 cel.mL⁻¹ da diatomácea *Conticribra weissflogii* (Teixeira *et al.* 2010).

Na segunda etapa, foi avaliado se o volume das UE afeta a sobrevivência de *Acartia tonsa*. Para este experimento, 60 copépodos adultos (copepoditos VI, sem distinção de sexo) com idade conhecida foram retirados dos cultivos temporários de copépodos (Seção 2.2.1.3.) mediante a utilização de pipetas de boca larga e o estágio em que se encontravam foi verificado sob microscópio estereoscópico conforme procedimento descrito na seção 2.2.1.1. Os organismos foram utilizados em três tratamentos com quatro réplicas contendo cinco organismos (ISO 14669 1999) para cada UE (Seção 2.2.1.4.) em volumes pré-definidos que simularam densidades de estocagem de 1 organismo por 5, 10 ou 20 mL⁻¹ (Tab. 3). As UE foram cobertas com filme PVC conforme resultados da primeira etapa deste experimento.

Tabela 3: Tratamentos utilizados para testar a sobrevivência no experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*.

Tratamentos	Densidade de estocagem	Volume
T₅	1 organismo. 5 mL ⁻¹ (ISO 14669 1999)	25 mL
T₁₀	1 organismo. 10 mL ⁻¹	50 mL
T₂₀	1 organismo. 20 mL ⁻¹ (Lopes 2014)	100 mL

As UE foram posicionadas dentro de uma sala climatizada nas mesmas condições do cultivo descritas na seção 2.2.1.2. Estes experimentos foram estáticos e sem aeração (Whale & Battersby 2005) e tiveram duração de 72 horas, já que após 48 horas ainda ocorrem mudanças na sobrevivência dos organismos (Lopes 2014). Diariamente, foi retirado cuidadosamente sob visualização em microscópio estereoscópico (Olympus SZ40) utilizando um pipetador automático (Gilson Neo P1000N 100-1000 µL), um volume de 1, 2 e 4 mL nas UE com 25, 50 e 100 mL, respectivamente, para adicionar em cada UE um volume equivalente de alimento com a concentração de 20.000 cel.mL⁻¹ da diatomácea *Conticribra weissflogii* (Teixeira *et al.* 2010), esta microalga foi escolhida para alimentar os

organismos durante os experimentos porque já foi demonstrado que existe uma melhor resposta fisiológica e uma maior taxa de sobrevivência de *Acartia tonsa* alimentadas com *C. weissflogii* que com *Isochrysis galbana* (Ismar et al. 2008). Todas as UE eram checadas a cada 24 horas para a contabilização da sobrevivência e da mortalidade (Resgalla & Laitano 2002) sob microscópio estereoscópico, com comprovação da morte após estímulo físico, tocando os organismos cuidadosamente, para não causar danos aos mesmos, com a ponta de uma agulha. Somente foram considerados os testes em que o controle apresentou no máximo 10 % de mortalidade com 48 horas de exposição (ISO 14669 1999).

2.2.4. Análises estatísticas

Para as aplicações das análises estatísticas foi utilizado o programa R versão 3.3.1 (2016) (R CORE TEAM 2016) com o aplicativo Rstudio versão 0.99n.903-© 2009-2016.

Para avaliar o potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede foram desenvolvimentos dois modelos lineares generalizados (*General linear model* – GLM):

Organismos fixados:

Variável resposta:

$Y = n$ = número de copépodos retidos em cada malha de rede do total de $n=50$ em cada réplica.

Y é Binomial ($n=50, \theta$), sendo θ a probabilidade de retidos.

A função GLM no R usa o modelo “ $Y \sim M + EST + M * EST$ ” com função de ligação “logit”

M= malhas de rede (fator em 3 níveis {180 μ m; 330 μ m; 500 μ m})

EST= estágios de desenvolvimento do copépodo *Acartia tonsa* (fator em 6 níveis: {CI, CII, CIII, CIV, CV, CVI}).

M*EST= o efeito da interação entre as malhas de rede e os estágios de desenvolvimento do copépodo *A. tonsa*.

Para testar quais foram as diferenças entre os fatores analisados utilizou-se um Teste *post-hoc* de Tukey através do pacote multcomp (Hothorn *et al.* 2008). E para testar as diferenças entre as interações entre os fatores analisados utilizou-se o pacote lsmeans (Lenth 2016).

As tabelas serão apresentadas com contraste entre os níveis dos fatores analisados para o *post-hoc* de Tukey.

Organismos vivos:

Variável resposta:

Y= n=número de copépodos retidos em cada malha de rede do total de n= número de organismos retidos + os que passaram em cada réplica.

Y é Binomial (n= número de organismos retidos + os que passaram, θ), sendo θ a probabilidade de retidos.

A função GLM no R usa o modelo “ $Y \sim M + EST + M * EST$ ” com função de ligação “logit”.

M= malhas de rede (fator em 3 níveis {180 μ m; 330 μ m; 500 μ m}).

EST= estágios de desenvolvimento do copépodo *Acartia tonsa* (fator em 6 níveis: {CI; CII; CIII; CIV; CV; CVI}).

M*EST= o efeito da interação entre as malhas de rede e os estágios de desenvolvimento do copépodo *A. tonsa*.

Para testar quais foram as diferenças entre os fatores analisados utilizou-se um Teste *post-hoc* de Tukey através do pacote multcomp (Hothorn *et al.* 2008). E para testar as diferenças entre as interações utilizou-se o pacote lsmeans (Lenth 2016).

As tabelas serão apresentadas com contraste entre os níveis dos fatores analisados para o *post-hoc* de Tukey

Para testar a sobrevivência no experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa* foram desenvolvidos modelos GLM separadamente em cada observação final de 24, 48 e 72 horas :

Variável resposta:

$Y = n$ = número de sobreviventes do total do total de $n=5$ na UE.

Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes.

A função GLM no R usa o modelo " $Y \sim D$ " com função de ligação "logit".

D = densidade de estocagem (fator em 3 níveis: $\{D_1, D_2, D_3\}$).

$D_1 = T_5$; $D_2 = T_{10}$; $D_3 = T_{20}$

Foi também utilizada a função *logit-inversa* para calcular a probabilidade estimada de um dado fator analisado para alguma diferença entre dois fatores analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey através do pacote multcomp (Hothorn *et al.* 2008), assim para adquirir esses valores este teste foi aplicado para todos os experimentos supracitados. Os valores resultantes da função *logit-*

inversa foram multiplicados por 100% para adquirir a porcentagem da probabilidade estimada do fator analisado, sendo a função *logit-inversa* :

```
alogit<- function(x)
{p<- 1/(1+exp(-x))
  p}
```

Por exemplo: Para o experimento testando a sobrevivência na avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*, quando relacionados os tratamentos T_{10} e T_{20} , a probabilidade de sobrevivência de 50% adquirida para $T_{20} - T_{10}$ seria a $p(T_{20}) = 0,5$, ou seja, a probabilidade de sobrevivência no tratamento T_{20} . A probabilidade de sobrevivência para T_{10} é dada como $p(T_{10}) = 1 - p(T_{20}) = 0,5$, ou de 50%. Outro exemplo: Uma probabilidade de sobrevivência de 65% adquirida para $T_{20} - T_5$, é $p(T_{20}) = 0,65$, ou seja, a probabilidade de sobreviventes no tratamento T_{20} . Para obter a probabilidade de sobrevivência $p(T_5)$ basta realizar $p(T_5) = 1 - p(T_{20}) = 0,35$, ou 35%.

Para avaliar o volume mínimo necessário nas UE, para os dados obtidos dos parâmetros físico-químicos foi utilizado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn* utilizando os pacotes PMCMR (Pohlert 2014) e *dunn.test* (Dinno 2016).

As diferenças foram consideradas significantes quando o *p-valor* calculado foi menor que 0,05.

Os scripts dos modelos do GLM realizados no programa R: para um dos experimento avaliando o potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede com organismos fixados esta disponível no apêndice I, o outro experimento, com organismos vivos, segue o mesmo scripts,

apenas mudando a base de dados; para o experimento avaliando se o volume das UE afeta a sobrevivência de *Acartia tonsa*, está disponível no apêndice II; e enfim para o experimento avaliando o volume mínimo necessário nas UE, onde os testes não-paramétrico foram realizado está disponível no apêndice III. Para abrir as planilhas de dados desenvolvidos no Microsoft Excel (2016) foi utilizado o pacote readxl (Wickham 2016).

2.3. Resultados

2.3.1. Avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede

Durante esta dissertação foram realizados ao todo três experimentos avaliando o potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de redes, um para organismos fixados e dois para organismos vivos, entretanto um dos experimentos dos organismos vivos foi desconsiderado devido a erros metodológicos durante a execução do mesmo.

Com relação à capacidade de retenção de organismos vivos, em duas réplicas dos cultivos não foram encontrados nenhum copépodo no estágio de CI, sendo um cultivo de uma das réplicas preparada para a filtragem na malha de 180 μm e outra para a de 330 μm . Devido a isto estas réplicas não foram computadas para estes estágios para estas redes.

De uma maneira geral a malha de rede de 180 μm exibiu os maiores resultados de retenção para todos os estágios de desenvolvimento do copépodo *Acartia tonsa*, sejam eles vivos ou fixados quando comparadas as outras duas

malhas. Na malha de 180 μm todos os estágios de copepoditos, vivos e fixados, ficaram retidos (Fig. 5).

A malha de rede de 330 μm , por sua vez apresentou uma retenção média dos estágios vivos de CI de 0%, CII de 37%, CIII de 33%, CIV de 69%, CV de 79% e CVI de 97%. Já, para os organismos fixados, a malha de rede de 330 μm reteve 5% de copépodos em CI, 15% em CII, 77% em CIII, 74% em CIV, 99% em CV e 100% em CVI (Fig. 5).

A rede de 500 μm mostrou a menor retenção de copépodos, comparados com as outras redes retendo 20%, 0%, 22%, 10%, 3% e 21% de CI, CII, CIII, CIV, CV e CVI quando vivos e 1%, 0%, 2%, 1%, 25% e 22% quando fixados, respectivamente (Fig. 5).

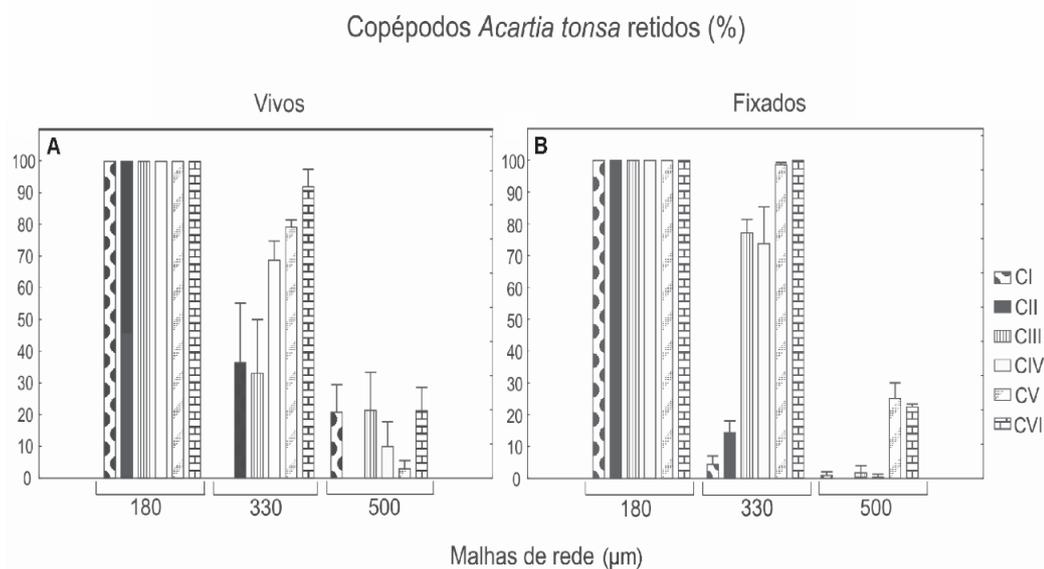


Figura 5: Percentual de retenção de cada um dos estágios de copepodito de *Acartia tonsa* nas malhas de 180, 330 e 500 μm sendo em A o experimento com copépodos vivos e B o experimento utilizando copépodos fixados. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiana de 95 % de acordo com os erros padrões. Onde: CI = copepodito 1; CII = copepodito 2; CIII = copepodito 3; CIV = copepodito 4; CV = copepodito 5 e CVI = copepodito 6.

Analisando os resultados GLM (Apêndice IV) do experimento da avaliação do potencial de retenção de *A. tonsa* enquanto vivas, os estágios de desenvolvimentos de copepodito CII, CIII, CIV, CV e CVI apresentaram diferença significativas ($p < 0,05$) de retenção entre as malhas de rede 180 μm e 500 μm , com a probabilidade de ser retido na malha de 180 μm de 97%, 95%, 98%, 99% e 99% em relação a de 500 μm , respectivamente. Copepoditos CV e CVI apontaram diferenças significativas ($p < 0,05$) de retenção entre as malhas de rede 180 μm e 330 μm e com as chances dos estágios de copepoditos serem retidos na de 180 μm em relação a malha de 330 μm de 94% e 96%, nesta devida ordem, enquanto CIV, CV e CVI apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as malhas de 330 μm e 500 μm , com a probabilidade de retenção da malha de 330 μm quando comparada com a de 500 μm foi de 91% para CIV, 97% para CV e de 97% para CVI.

Quanto aos resultados da análise GLM do potencial de retenção de estágios fixados de *A. tonsa* em diferentes malhas de rede, os estágios CI, CII, CIII, CIV, CV e CVI apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na retenção entre as malhas de 180 μm e 500 μm , sendo que a malha de rede 180 μm apresentou uma probabilidade de retenção dos organismos de 100%, 100%, 100%, 100% 99% e 99% em relação a de 500 μm .

Ainda foi verificado que os estágios CI, CII, CIII e CIV indicaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as malhas de rede 180 μm e 330 μm , com uma chance dos copépodos serem retidos de 100% para CI e CII, 94% para CIII e 95% para CIV. As malhas de 330 μm e 500 μm apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si nos estágios de desenvolvimento CII, CIII, CIV, CV

e CVI, com probabilidade de retenção dos copépodos na de 330 μm em relação a 500 μm nos estágios de CII, CIII, CIV, CV e CVI de 91%, 99%, 99% 99% e 99%, respectivamente.

Ao todo 2.700 copépodos utilizados nos experimentos de retenção foram medidos, mas não foi observado nenhum padrão entre as medidas e retenção nas diferentes malhas de rede, por isso os mesmos não foram analisados. Os valores medidos encontram-se no Apêndice V.

No apêndice VI encontram-se as medidas morfométricas dos organismos que passaram pelas redes.

Os poros das redes de 180, 330 e 500 μm apresentaram as seguintes medidas das diagonais entre vértices opostos: 200, 410 e 800 μm , respectivamente.

2.3.2. Avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*

Para a avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa* também foram realizados ao todo 13 experimentos, sendo que 11 experimentos avaliando a sobrevivência dos organismos nos diferentes tratamentos foram descartados devido a alta mortalidade (maior que 10%).

Considerando-se os valores médios finais dos parâmetros físico-químicos dos meios utilizados nas UE neste teste (Tab. 4) constatou-se que o tratamento com 100mL fechado foi o que mais se manteve estável, sem maiores alterações, sendo que o tratamento aberto com 25 mL teve seu meio totalmente evaporado.

Tabela 4: Valores médios e os desvios padrões finais dos parâmetros analisados durante o experimento avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa* : potencial de hidrogênio (pH), salinidade e percentagem de evaporação (%). "NA" indica não aplicável. Os tratamentos utilizados: A₂₅ - UE aberta com 25 mL de meio; A₅₀ - UE aberta com 50 mL de meio; A₁₀₀ - UE aberta com 100 mL de meio; F₂₅ - UE coberta com 25 mL de meio; F₅₀ - UE coberta com 50 mL de meio e F₁₀₀ - UE coberta com 100 mL de meio.

Valor médio			
Tratamentos	pH	Salinidade	Evaporação (%)
Parâmetros iniciais	8,3	30,0	NA
Parâmetros finais			
A₂₅	Evaporou	Evaporou	Evaporou
A₅₀	8,29 ± 0,02	85,33 ± 25,40	68,00 ± 15,50
A₁₀₀	8,15 ± 0,09	45,75 ± 2,50	31,25 ± 2,50
F₂₅	8,19 ± 0,04	32,50 ± 0,57	6,00 ± 2,30
F₅₀	8,21 ± 0,02	32,50 ± 0,57	4,50 ± 1,15
F₁₀₀	8,16 ± 0,03	30,00 ± 0,09	2,00 ± 0,00

Segundo a análise estatística, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os parâmetros salinidade e evaporação entre o tratamento A₅₀ e os tratamentos F₂₅, F₅₀ e F₁₀₀ e entre os tratamentos A₁₀₀ e F₁₀₀. Já para o pH foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento A₅₀ e os tratamentos A₁₀₀, F₂₅ e F₁₀₀ (Tab. 5). Como o tratamento A₂₅ teve seu meio em todas as UE totalmente evaporado não foi possível realizar a análise estatística para este tratamento.

Tabela 5: Resultado da análise estatística Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn do experimento avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa* e X^2 = Qui-quadrado resultante do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Os tratamentos utilizados: A₂₅ - UE aberta com 25 mL de meio; A₅₀ - UE aberta com 50 mL de meio; A₁₀₀ - UE aberta com 100 mL de meio; F₂₅ - UE coberta com 25 mL de meio; F₅₀ - UE coberta com 50 mL de meio e F₁₀₀ - UE coberta com 100 mL de meio. "ns" indica não significante, "**" indica significância ao nível de 0,05 e "***" ao nível de 0,01. "-" indica que não foi possível realizar a análise devido a falta da medição dos parâmetros, já que houve a evaporação de todo o meio no tratamento A₂₅.

Variáveis	Salinidade	pH	Evaporação %
	$X^2 = 27,17$	$X^2 = 17,26$	$X^2 = 21,8$
	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor	<i>p</i> -valor
A ₂₅ - A ₅₀	-	-	-
A ₂₅ - A ₁₀₀	-	-	-
A ₂₅ - F ₂₅	-	-	-
A ₂₅ - F ₅₀	-	-	-
A ₂₅ - F ₁₀₀	-	-	-
A ₅₀ - A ₁₀₀	ns	0,002**	ns
A ₅₀ - F ₂₅	0,007**	0,020*	0,011*
A ₅₀ - F ₅₀	0,009**	ns	0,006**
A ₅₀ - F ₁₀₀	<0,001**	0,004**	<0,001**
A ₁₀₀ - F ₂₅	ns	ns	ns
A ₁₀₀ - F ₅₀	ns	ns	ns
A ₁₀₀ - F ₁₀₀	0,002**	ns	0,002**
F ₂₅ - F ₅₀	ns	ns	ns
F ₂₅ - F ₁₀₀	ns	ns	ns
F ₅₀ - F ₁₀₀	ns	ns	ns

Quando analisamos os resultados do experimento sobre a sobrevivência de *Acartia tonsa* nos diferentes volumes avaliados observa-se que o tratamento T₅ apresentou 90%, 80% e 70% de sobrevivência média em 24 horas, 48 horas e 72 horas, respectivamente (Fig. 6). Os demais tratamentos, T₁₀ e T₂₀, apresentaram 100% de sobrevivência durante todo o experimento.

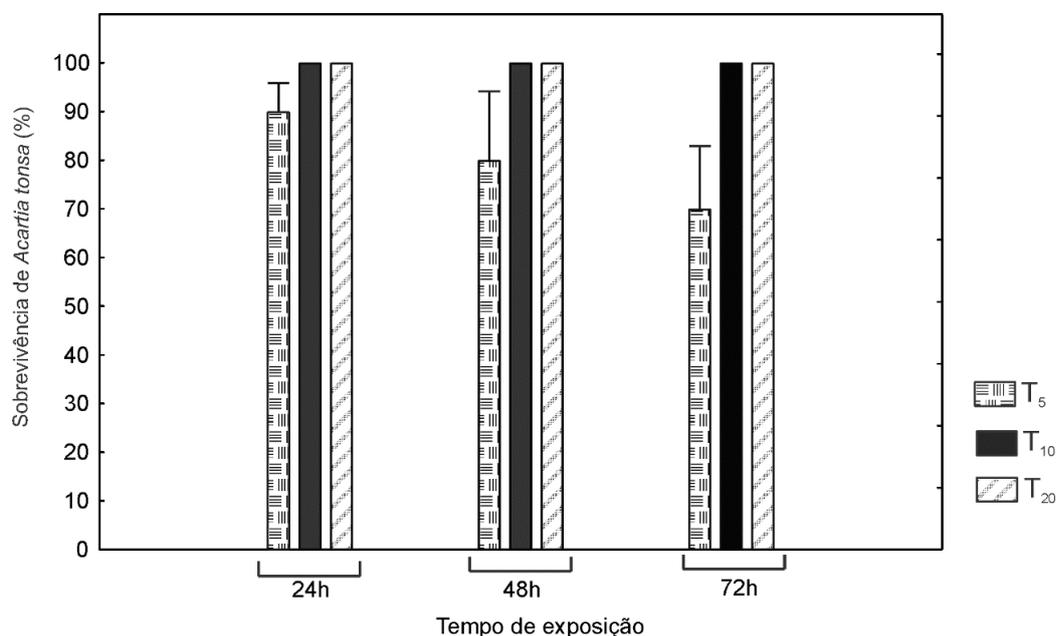


Figura 6: Sobrevivência média (%) do copépodo *Acartia tonsa* durante o experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *A. tonsa*. Onde: T₅ = 1 organismo. 5 mL⁻¹ (25 mL); T₁₀ = 1 organismo. 10 mL⁻¹ (50 mL) e T₂₀ = 1 organismo. 20 mL⁻¹ (100 mL). As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões.

Apesar de não serem detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) a análise GLM sempre demonstrou uma probabilidade de sobrevivência 50% superior quando os tratamentos T₁₀ e T₂₀ são comparados com o T₅ (Tab. 6).

Tabela 6: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (D) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significante. Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. O modelo da função GLM foi “Y~D” com função de ligação “logit”. D= densidade de estocagem (fator em 3 níveis: {D₁, D₂, D₃}). D₁= T₅; D₂= T₁₀; D₃= T₂₀

Tempo	Tratamentos	p -valor	P
24 horas	T ₁₀ -T ₅	ns	62%
	T ₂₀ -T ₅	ns	62%
	T ₂₀ -T ₁₀	ns	50%
48 horas	T ₁₀ -T ₅	ns	71%
	T ₂₀ -T ₅	ns	71%
	T ₂₀ -T ₁₀	ns	50%
72 horas	T ₁₀ -T ₅	ns	77%
	T ₂₀ -T ₅	ns	77%
	T ₂₀ -T ₁₀	ns	50%

2.4. Discussão

2.4.1. Avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede.

Desde que a UNESCO recomendou o uso de uma malha de rede de 200 μm para a coleta do mesozooplâncton (UNESCO 1968), é bem fundamentado em estudos de ecologia de mesozooplâncton que uma malha de 200 ou menor será capaz de coletar todos os estágios de copepodito de *Acartia tonsa* (Sameoto *et al.* 2000, Calbet *et al.* 2001, Favareto *et al.* 2009, Muxagata *et al.* 2012, Agostini *et al.* 2016, Teixeira-Amaral *et al.* 2017), sendo nenhum tamanho de malha capaz de selecionar um único e específico estágio de desenvolvimento (Vannucci 1968).

A malha de 63 μm proposta pela EPA (1976), não foi considerada nos testes pois é reconhecida como sendo capaz de reter ovos de *A. tonsa* que possuem entre 70 à 80 μm (Marcus & Wilcox 2007) e portanto seria capaz de reter de náuplios a adultos.

Os resultados da retenção média e da probabilidade de retenção na malha de rede de 180 μm em relação às outras malhas de redes, para todos os estágios de desenvolvimento no experimento com copépodos vivos se mostraram bem similares com o experimento de copépodos fixados. Foi possível observar que a malha de rede de 180 μm reteve 100% de todos os estágios de desenvolvimentos de copepoditos. Além disso, a mesma malha de rede apresentou as maiores percentagens de retenção, sugerindo que a informação contida na EPA (1976) e na ISO 14669 (1999) de se utilizar redes finas (i.e >180

µm) para separação dos adultos e copepoditos mais velhos dos estágios imaturos não é apropriada e que pode levar a resultados equivocados.

A malha de rede de 180 µm, quando simulou a filtragem dos organismos fixados, apresentou diferenças significativas entre a malha de rede de 330 µm e de 500 µm, apresentando os maiores valores de retenção média e de probabilidade de retenção em relação a estas duas malhas de redes para todos os estágios de desenvolvimento. Ainda, esta malha apresentou a mesma probabilidade de retenção de todos os estágios de copepoditos, um relacionado com o outro. Para os organismos vivos os resultados se mostraram bem similares.

Um estudo, buscando entender a influência da abertura de malha de rede na retenção de quatro espécies de copépodos, *Calanus spp*, *Pseudocalanus minutus* Krøyer 1845, *Paracalanus parvus* Claus 1863 e *Temora longicornis* Müller 1785, encontrou que para uma malha de rede com tamanho de 75% da largura do copépodo, a mesma reterá o equivalente a 95% dos organismos desse tamanho (Nichols & Thompson 1991). No presente estudo o copepodito I de *A. tonsa* apresentou uma média de largura do prossoma de aproximadamente 140 µm (Apêndice V) e se considerarmos esta capacidade de retenção uma malha de 106 µm deveria reter quase a maioria dos copepoditos neste estágio. Entretanto neste experimento 100% dos organismos neste estágio de desenvolvimento foram retidos pela malha de 180 µm (Fig. 7). Desta forma, pode-se inferir que uma rede de 106 µm não reteria apenas 95% dos copepoditos CI, mas sim 100% dos mesmos e com base nos resultados deste experimento

uma rede menor que 180 μm também deveria capturar todos os demais estágios de copepodito.

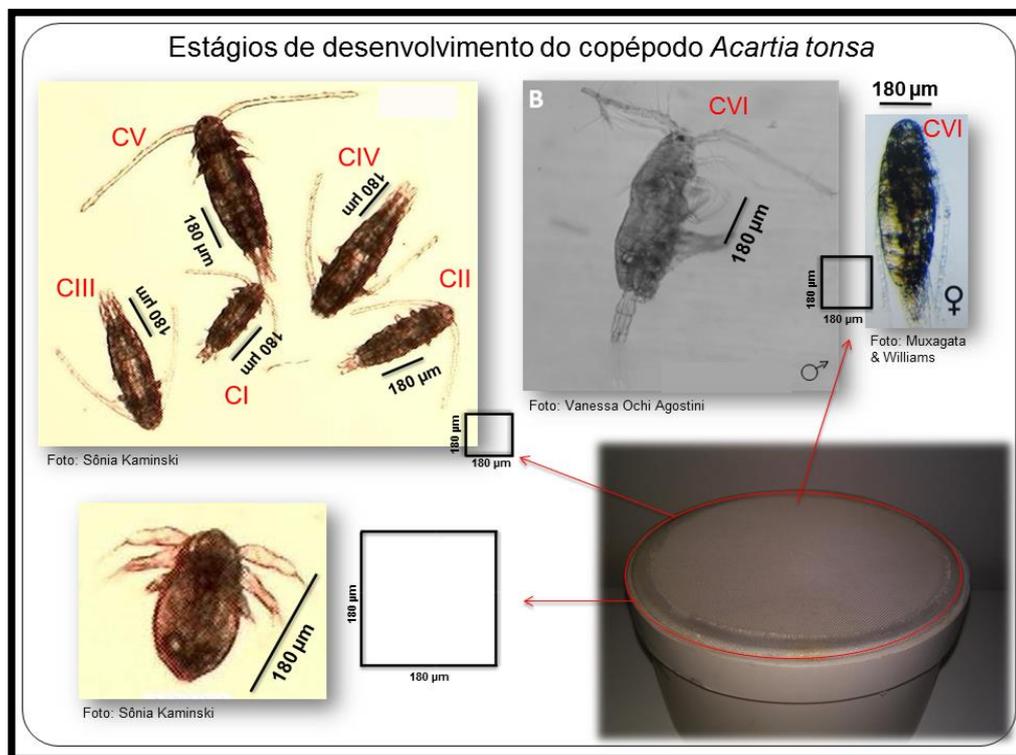


Figura 7: Foto indicando o tamanho relativo dos diferentes estágios de *Acartia tonsa* em relação a uma malha de rede 180 μm .

Contudo, quando analisamos os experimentos com as demais malhas para os organismos vivos, os resultados estatísticos se mostraram diferentes do experimento com copepodos fixados. Os primeiros estágios de desenvolvimento foram os que menos apareceram nos cultivos de uma maneira geral. O estágio de CI em algumas das réplicas estabelecidas para a malha de rede 180 μm nem ocorreu. Já os estágios mais avançados como CV e CVI ocorreram em valores bem maiores. Devido a esta desproporcionalidade dos estágios o modelo estatístico é incapaz de modelar os efeitos desejados.

Quando os resultados dos organismos vivos retidos na malha de 330 μm e 500 μm foram comparados com os dos organismos fixados, existiu sempre

uma maior retenção de copépodos onde os organismos estavam fixados, sugerindo que os organismos quando estão vivos tem uma pequena capacidade de passarem pela rede, pois eles podem se movimentar e talvez até forçar a passagem através dos poros, mas esta percentagem é bem pequena como foi demonstrada através do experimento. Vannucci (1968) reportou que organismos com uma largura de 350 μm eram retidos em laboratório por uma malha de rede de 400 μm quando fixados, porém os mesmos quando vivos eram capazes de escapar por uma rede de 330 μm , sendo necessário uma malha de rede de 200 μm para retê-los. O autor acredita que quando eles estão vivos seus apêndices são mais flexíveis, permitindo que o seu corpo passe através da rede de 330 μm mas não de 200 μm . Entretanto após a fixação com formaldeído, seus apêndices se tornaram rígidos e estendidos, impossibilitando a passagem dos mesmos pelos poros. Além disso, existe uma flexibilidade do abdômen do copépodo, a qual pode ajudar os mesmos a escaparem (Heron 1968).

Segundo Skjoldal *et al.* (2013) 50% dos organismos podem escapar pela rede com uma largura igual ao do tamanho do poro da malha. Os estágios de CIV, CV e CVI medidos neste trabalho apresentaram uma largura média de aproximadamente 180, 230 e 250 μm , nesta devida ordem, ou seja, são menores que o tamanho do poro de 330 μm . Além disso, a retenção dos pequenos organismos aumenta com a redução do tamanho do poro da malha de rede (Boltovskoy 1981), entretanto quanto menor o tamanho do poro da malha, menor será a eficiência de filtragem (Smith *et al.* 1968). Existem diversos fatores e problemas relacionados com a eficiência de filtragem (Wiborg 1948), como o

entupimento da rede pelos copépodos, que se prendem aos poros diminuindo a área de filtração (Gibbons 1939, Wiborg 1948),

Segundo Tranter & Smith (1968), teoricamente uma rede de 100 μm se colmata 30 vezes mais rápido que uma rede de 550 μm . O maior inconveniente do fenômeno da colmatação e o mais importante também, é que a rede não trabalhará mais como uma superfície filtrante e começa a trabalhar como um corpo sólido e irá modificar a composição da amostra obtida, conseqüentemente deturpando os resultados (Boltovskoy 1981). Isto também demonstra que a rede de 180 μm , além de ter a capacidade de reter todos os estágios filtrará com menos eficiência que as malhas de 330 μm e 500 μm .

Ainda, Vannucci (1968) observou que o tamanho, o formato e o comportamento de um organismo zooplânctônico irão também influenciar na sua passagem pelo poro da rede, podendo assim facilitar essa passagem ou dificultar. Organismos providos de apêndices, com uma superfície grosseira e áspera terão sua passagem dificultada pelo poro (Vannucci 1968). Já foi reconhecido que o escape dos organismos através da malha de rede é também pelo excesso da pressão de filtração, a qual provoca a extrusão dos mesmos (Sameoto *et al.* 2000).

A técnica de utilizar uma malha de rede para separar os estágios de desenvolvimento de interesse é comumente usada em bioensaios quando se utiliza copépodos (EPA 1976, ISO 14669 1999, Marcus & Wilcox 2007, Camus & Zeng 2009, Cassiano 2009, Almeda *et al.* 2013, Baetens 2014). Há autores que sugerem redes de tamanhos até menores ou muito próximas a 180 μm para a retenção somente de organismos adultos de *Acartia tonsa*, como Almeda *et al.*

(2013), que utilizaram uma malha de rede de 150 μm para este fim. Entretanto, a separação apenas através da utilização de redes, como aqui demonstrado, não separaram ou isolaram apenas um estágio de desenvolvimento, ou seja, todas as malhas de redes testadas demonstraram a capacidade de reter todos os estágios de desenvolvimento de *A.tonsa*, umas em maior percentagem em relação a outras.

Muitos outros autores utilizaram diferentes tamanhos de malhas de redes para separar adultos de náuplios de *Acartia spp* (Marcus & Wilcox 2007, Camus & Zeng 2009, Baetens 2014), entretanto nestes casos a separação seria dos estágios naupliares e para este fim este método é adequado. Em um estudo realizado por Cassiano (2009) com *Pseudodiaptomus pelagicus* Herrick 1884, foi utilizada uma malha de 200 μm para separar somente copepoditos CVI. Machos e fêmeas dessa espécie tem aproximadamente 669 μm e 785 μm de comprimento de prossoma, respectivamente (Ohs *et al.* 2010). E como já foi abordado neste estudo, dificilmente uma malha de rede iria isolar somente um estágio de desenvolvimento, da mesma forma, Omori & Ikeda (1984) e Mauchline (1998) reportaram que uma mesma rede não irá coletar copépodos adultos e copepoditos com a mesma eficiência, e uma malha de rede que tenha como alvo de coleta somente organismos adultos irá possivelmente coletar náuplios, mesmo que em menor quantidade. Existem ainda fatores relacionados à biologia dos organismos que propiciam que existam vários estágios se sobrepondo em um mesmo cultivo, tornando a seleção de um único estágio de desenvolvimento pela malha de rede mais difícil ainda. Por exemplo, as fêmeas em cultivos controlados, com alimentação a base de *Conticribra weissflogii* com uma

concentração de aproximadamente 20.000 cel.mL⁻¹, estão sempre se reproduzindo, com uma produção média de 28 ovos. fêmea⁻¹.dia⁻¹ (Teixeira *et al.* 2010), a maior parte dos ovos eclodem em náuplios em média após 48 horas em 25 °C (Marcus & Wilcox 2007), assim os ovos de diferentes dias e diferentes fêmeas irão se misturar no cultivo e eclodirem em tempo diferentes.

Esta técnica de filtragem por uma malha de tamanho específico pode ser utilizada como uma estratégia para a concentração de um determinado estágio de interesse, mas não deve ser considerada uma maneira segura de adquirir somente um estágio de desenvolvimento do copépodo. Sendo assim, a separação para o bioensaio deve ser feita através de visualização em microscópio estereoscópico, para assegurar que o estágio em que se encontra o copépodo é aquele de interesse para realização dos testes (Lopes 2014, Agostini *et al.* 2016), evitando assim variações nos resultados devido ao estágio dos indivíduos utilizados. Por exemplo, a rede de 330 µm reteve uma maior média principalmente dos estágios de copepodito CIV, CV e CVI, tanto no experimento com organismos fixados como no de organismos vivos, enquanto a rede de 500 µm reteve uma percentagem muito baixa de todos os estágios. Desta maneira, uma rede de tamanho de malha intermediário entre 330 e 500 µm poderia ajudar a reter uma maior percentagem dos estágios mais avançados, com uma retenção menor dos primeiros estágios, facilitando assim a separação do estágio almejado.

O estágio de desenvolvimento no qual os organismos se encontram influencia na sua sensibilidade, sendo os primeiros estágios mais sensíveis que os adultos de *Acartia tonsa* (Medina *et al.* 2002, Baetens 2014) e *Daphnia*

magna Stratus 1829 (Bodar *et al.* 1989, Hoang & Klaine 2007). Além disso já foi comprovada uma maior tolerância de fêmeas em relação a machos a contaminantes (Di Pinto *et al.* 1993, Carman & Todaro 1996, Medina *et al.* 2002, Avila *et al.* 2010), existindo a necessidade de após a identificação dos adultos, também realizar a identificação dos sexos. Assim, se a técnica de utilizar uma rede de 180 μm para a separação somente de organismos adultos de *A. tonsa* conforme sugerida pelo ISO 14669 (1999) for aplicada em um bioensaio, sem confirmação visual dos estágios por visualização em microscópios estereoscópicos este teste poderá ter sua confiabilidade diminuída e questionada.

De uma maneira geral a probabilidade de retenção na malha de rede de 180 μm sempre foi maior em relação às outras malhas, seguida pela malha de 330 e 500 μm , respectivamente. A média da retenção também sempre foi maior para todos os estágios de desenvolvimento na malha de rede de 180 μm , seguida pela malha de rede 330 μm e com a malha de rede de 500 μm retendo a menor porcentagem de todos os estágios de desenvolvimento. Quando avaliamos as medidas das diagonais entre vértices opostos dos poros das redes utilizadas neste trabalho, aparentemente, observando o resultado de 100% de retenção de todos os estágios de copepodito na malha de rede de 180 μm o fato da diagonal do poro ser maior que a largura do organismo no estágio de CI a CIV (Apêndice V), não influenciou na retenção do mesmo.

2.4.2. Avaliação do volume mínimo necessário nas UE utilizadas em bioensaios com *Acartia tonsa*

Tanto o protocolo da EPA (1976) quanto o da ISO 14669 (1999) não especificam o volume a ser utilizado nos testes, porém ambos deixam implícito que o mesmo seria de 20 - 25 mL por UE, pois a EPA sugere o uso de $1 \text{ org. } 2\text{mL}^{-1}$, com um mínimo de 10 copépodos enquanto a ISO sugere o uso de cinco organismos por réplica e que cada UE tenha como densidade máxima $1 \text{ org. } 5 \text{ mL}^{-1}$. Estes volumes se mostraram totalmente inapropriados, pois na primeira etapa deste experimento, uma UE contendo 25 mL evaporou completamente após as 72 horas de duração do teste em condições de UE abertas. Já em condições cobertas foi o tratamento que apresentou a maior porcentagem de evaporação em relação aos tratamentos fechados.

O problema relacionado ao efeito da evaporação em bioensaios já foi relatado antes (EPA 1976; 2009, ISO 14669 1999), o qual é resolvido ao cobrir as UE e aumentar o meio utilizado (100 mL), como foi demonstrado. Neste trabalho, os resultados obtidos se mostraram compatíveis aos problemas já relatados sobre a evaporação. O tratamento A₂₅ e A₅₀ foram os que demonstraram uma forte influência da evaporação em relação os cobertos, com o tratamento A₂₅ alcançando 100% de evaporação.

A EPA (2009), em seu protocolo para testes com o misídeo *Americamysis bahia* Molenock 1969, aborda sobre a necessidade de cobrir as UE devido ao aumento da evaporação e conseqüentemente o aumento da salinidade, a qual pode exceder 100 se as mesmas não estiverem cobertas, e isto dependerá também do volume utilizado nas UE. Este efeito da evaporação devido ao volume

utilizado, como o aumento da salinidade, foi também observado neste experimento, onde as UE abertas apresentaram um aumento considerável de salinidade. Quando o tratamento A₅₀ foi comparado com os tratamentos fechados, houve diferença significativa em todos os parâmetros medidos. Já o tratamento A₁₀₀ não diferiu estatisticamente dos tratamentos F₂₅ e F₅₀, mas sim do F₁₀₀ ou seja, das UE com menores volumes. Desta forma, nota-se que a quantidade de volume utilizado nas UE é importante nos bioensaios, para o controle dos parâmetros físico-químicos.

O copépodo *Acartia tonsa* tolera grandes mudanças (Lance 1963, Cervetto 1987) e variações instantâneas de salinidade no ambiente, entretanto essas variações não podem ultrapassar 10 pontos de salinidade em relação a água original para não causar danos aos organismos (Cervetto *et al.* 1999). Assim, mesmo que neste experimento não se tenha utilizado copépodos para a verificação da sua sobrevivência em relação ao aumento da salinidade devido à evaporação, pode-se inferir que os tratamentos abertos (A₂₅ e A₅₀), os quais exibiram uma variação drástica na salinidade (com o tratamento A₂₅ apresentando total evaporação do meio comparado com os outros tratamentos), irão aumentar a possibilidade da mortalidade dos indivíduos e também interpretações errôneas nos experimentos de toxicidade, podendo inviabilizar os testes. Lance (1963) demonstrou que mudanças na salinidade podem afetar negativamente a sobrevivência de *A. tonsa*. Assim, mudanças significantes neste fator abiótico podem ocasionar problemas nos resultados dos testes (Rand 1995), pois os organismos possivelmente estarão sendo influenciados por alterações desse parâmetro físico-químico e não somente pelo efeito do toxicante.

Deve-se enfatizar, também que, alterações nos parâmetros físico-químicos, não só irão influenciar na sensibilidade dos organismos, como também na biodisponibilidade de alguns contaminantes como os metais e também em relação a sua toxicidade para os organismos aquático (Di Toro *et al.* 2001), pois sabe-se que as concentrações de metal iônico livres são reduzidas em ambientes com altas salinidades em comparação com baixas salinidades, por causa do aumento da presença de ânions complexantes (Sadiq 1989, Hall & Anderson 1995).

Ainda, em relação a qual tipo de cobertura a ser utilizada, alguns trabalhos não chegam a um consenso, existe a sugestão do uso de pratos de vidro ou folhas de plástico pela EPA (1976; 2009) e a ISO 14669 (1999) não especifica o material usado. Neste experimento filme de PVC foi utilizado como cobertura das UE, o qual se mostrou eficaz no controle da evaporação, entretanto o efeito da evaporação pode ser reduzido, mas não totalmente eliminado como foi reportado por Ryan (2012) e comprovado aqui através do tratamento F₁₀₀, o qual apresentou uma taxa de evaporação de 2% e nenhuma variação na salinidade das UE em relação a água inicial.

Os efeitos adversos devido a alta densidade de estocagem em cultivos de copépodos já foram reportados por muitos estudos (Walker 1979, Kahan *et al.* 1988, Lazzaretto *et al.* 1990, Miralto *et al.* 1996, Sibly *et al.* 2000, Lee & Park 2005). Dentre os problemas encontrados por meio de cultivos em altas densidades pode-se citar: o estresse devido ao canibalismo (Gergs *et al.* 2014), a escassez de alimentos e contato físico, restrição de nutrientes, fome, declínio da qualidade da água (Lee *et al.* 2012), o efeito parede, ou seja, o efeito do enclausuramento (Dur *et al.* 2011), redução na aptidão física, aumento da

mortalidade, diminuição na taxa de crescimento e diminuição na fecundidade (Gergs *et al.* 2014).

Assim para o bioensaio propriamente dito, da segunda etapa, somente foi investigada a sobrevivência média dos organismos em diferentes densidades de estocagem. Entretanto os resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa na mortalidade desses organismos, nos diferentes tratamentos testados durante as 72 horas. Assim, como o presente estudo, Medina & Barata (2004) e Jepsen *et al.* (2007), testando uma densidade de estocagem de 1 org. 0,5 - 2 mL⁻¹ e 1 org. 1,7 - 20 mL⁻¹, respectivamente, também não encontraram nenhuma ligação entre a mortalidade e a densidade de estocagem para *Acartia tonsa*, durante 26 dias de experimento. Entretanto, Camus & Zeng (2009) demonstraram que após um período de 12 dias a sobrevivência de *Acartia sinjensis* Mori 1940 foi maior no cultivo com uma densidade de estocagem de 1 org. 8 mL⁻¹ quando comparado com as densidades de 1 org. 0,5, 1, 2 e 4 mL⁻¹. Diferente deste trabalho, Medina & Barata (2004), Jepsen *et al.* (2007) e Camus & Zeng (2009) utilizaram volumes bem maiores em seus estudos, como, 1L, 60 L e 1L, respectivamente. E como foi desmontrado neste experimento, volumes maiores irão ter menores variações em seus parâmetros físico-químicos, mantendo melhor a qualidade da água e não afetando os resultados dos experimentos.

No entanto, quando se observa a sobrevivência média de *Acartia tonsa*, nota-se uma mortalidade gradual no tratamento T₅ ao longo do tempo. Ao final dos experimentos os tratamentos T₁₀ e T₂₀, demonstraram uma probabilidade de sobrevivência de 77% em relação ao tratamento T₅. Alajmi *et al.* (2015)

exprimem que copépodos Calanoida requerem múltiplas gerações de cultivo para atingirem todo seu potencial de se ajustarem a diferentes ambientes de cultivos. Os copépodos aqui utilizados podem também estar se ajustando ao ambiente de cultivo, já que estes copepodos estão sendo cultivados há quatro meses no laboratório de zooplâncton e o ciclo médio de vida para esta espécie é de 26 dias (Strøttrup *et al.* 1986).

A maior tolerância dos copépodos cultivados a cultivos em altas densidades encontrados por Alajmi *et al.* (2015) e tanto quanto os resultados aqui apontados, demonstram um problema, já que no ambiente natural as densidades desses organismos são bem menores (Shahidul & Tanaka 2007). *Acartia tonsa*, por exemplo, é um copépodo holoplanctônico encontrado em diversos estuários do hemisfério norte onde densidades de 8.571 org.m⁻³, (~1 org. 117 mL⁻¹) e 19.000 org.m⁻³ (~ 1 org. 52 mL⁻¹) foram reportadas em estuários nos Estados Unidos (Lee & McAlice 1979, Mallin 1991), 13.000 org.m⁻³, (~ 1 org. 77 mL⁻¹) 2.578 org.m⁻³, (~ 1 org.387 mL⁻¹) em estuários da Europa (Barreta & Malschaert 1988, Marques *et al.* 2006). Já no hemisfério sul a mesma espécie atinge densidades máximas de 1.601 org.m⁻³ (~ 1 org.624 mL⁻¹) na região amazônica (Magalhães *et al.* 2009), 1.993 org.m⁻³ (~ 1 org.50 mL⁻¹) no Saco dos Limões em Santa Catarina (Resgalla 2001), 43.460 org.m⁻³ (~1 org.22 mL⁻¹) no estuário da Lagoa dos Patos (Muxagata *et al.* 2012) e 17.600 org. m⁻³ (~ 1 org.57 mL⁻¹) no estuário do Río de la Plata, na Argentina (Marrari *et al.* 2004). Sendo fácil reconhecer que suas maiores densidades são reportadas em estuários onde dificilmente atingem densidades próximas a 1 org.20mL⁻¹.

Portanto, utilizar em um teste uma espécie adaptada ao cultivo, provavelmente irá demonstrar respostas diferentes a de um copépodo que vive no ambiente e que está adaptado a uma densidade muito inferior a 1 org. 5 ou 2 mL⁻¹ e de repente se depara com uma condição totalmente diferente da qual ele vive. Segundo Mauchline (1998), os resultados obtidos de cultivos de laboratórios podem ser afetados por condições favoráveis, como fornecimento de alimento e condições estáveis.

Logo, deve-se tomar em consideração que os testes de toxicidade são utilizados para predizerem possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes no ambiente (Costa *et al.* 2008), assim o uso de copépodos de cultivos em altas densidades e por longos períodos em testes de toxicidade, podem estar mascarando o que está ocorrendo no ambiente.

2.4.3. Considerações sobre as análises estatísticas empregadas

Este trabalho deparou-se com um problema relacionado a análise estatística. Inicialmente, optou-se por utilizar análises ANOVA (*one-way* e *two-ways*). Entretanto, alguns pressupostos para se utilizar estas análises foram quebrados, as réplicas deste trabalho de certa forma estavam interconectadas, ou seja, não eram réplicas independentes, assim as mesmas são consideradas pseudoréplicas (Hurlbert 1984). A pseudoreplicação é a modelagem incorreta da aleatoriedade e é um problema desenfreado que ocorre nos experimentos ecológicos (Hurlbert 1984). Além disso, foi descoberto que os dados aqui utilizados, não são normais e nem contínuos, estes dados são dados binomiais e discretos. Por estes motivos, escolheu-se utilizar uma análise mais apropriada

para este tipo de dados, que foi o modelo linear generalizado (*General linear model* - GLM). Diferentemente do que se vê em trabalhos de ecotoxicologia (Willis & Ling 2003, Bellas & Thor 2007, Gorbi *et al.* 2012, Agostini 2014, Lopes 2014, Zhou *et al.* 2015, Agostini *et al.* 2016), onde a Análise de Variância (ANOVA) tanto Unifatorial, quanto a Bifatorial foram utilizadas. Além disso, a solução encontrada para não cometer a pseudoreplicação, porém sem considerar a interação com o tempo, foi realizar a GLM separadamente em 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Assim, ressalta-se a relevância em avaliar a necessidade da aplicação da abordagem estatística adequada, além do planejamento e desenvolvimento do delineamento experimental dos bioensaios. Esta importância é também enfatizada por Haas *et al.* (2012).

2.5. Conclusão

Neste capítulo foram realizados dois experimentos com o intuito de reavaliar/esclarecer alguns dos procedimentos indicados nos métodos de cultivos e UE para bioensaios.

- A utilização de uma malha de rede específica para separar somente um estado de desenvolvimento desejado de *Acartia tonsa* para uso em bioensaios, não é indicada, pois as malhas de redes não têm a capacidade de separar somente um estágio de desenvolvimento, fato este de amplo conhecimento nos estudos ecológicos sobre a espécie em questão e que aparentemente foi ignorada em virtude da necessidade de simplificação dos métodos.

Assim, recomenda-se o uso de uma malha de rede para a concentração do estágio de interesse, porém a separação deve ser aprimorada sob visualização em microscópio estereoscópico atentando para as diferenças morfológicas de cada estágio, para garantir que o estágio de desenvolvimento desejado, seja o efetivamente utilizado no bioensaio.

- As UE devem conter ao menos 100 mL e serem mantidas cobertas durante os testes de toxicidade para evitar a evaporação e alterações nos parâmetros físico-químicos, os quais podem alterar os resultados do teste. E não foi encontrada nenhuma diferença na letalidade entre os tratamentos do experimento testando a densidade de estocagem do copépodo *Acartia tonsa*.

**3. APRIMORAMENTO DOS FUNDAMENTOS DE BIOENSAIOS
UTILIZANDO O COPÉPODO *Acartia tonsa* Dana 1849**

3.1. Introdução

A dificuldade em se investigar diferentes populações zooplanctônicas diretamente do ambiente somado à necessidade de identificar os fatores que influenciam positivamente ou negativamente as taxas de crescimento, o tempo de desenvolvimento e a dinâmica destas populações (Rigler & Downing 1984, Runge & Roff 2000) fez dos experimentos em laboratório, sob condições controladas, excelentes recursos para se obter estas informações (Uye *et al.* 1983, Chinnery & Williams 2004, Calliari *et al.* 2008). Através de experimentos de laboratório, foi possível a obtenção de informações sobre a utilização de organismos zooplanctônicos sensíveis, como os copépodos, para avaliar a toxicidade de substâncias químicas frequentemente encontradas em ambientes aquáticos, estimando assim a toxicidade de contaminantes em determinadas concentrações para uma determinada espécie (Ramdorf 2007).

Copépodos, por ocorrerem em grande abundância e possuírem uma elevada biomassa e diversidade, têm uma grande importância ecológica em ecossistemas marinhos (Raymont 1983, Mauchline 1998, Ruppert *et al.* 2005), sendo considerados um importante elo na cadeia alimentar de ecossistemas aquáticos, conectando o fitoplâncton a níveis tróficos superiores (Pane *et al.* 2012) pois são presas naturais de muitas larvas de espécies de peixes (Strøttrup *et al.* 1986). Por serem organismos sensíveis (Ihara *et al.* 2010, Gorbi *et al.* 2012) são também muito utilizados em bioensaios toxicológicos (Lee 1977, Bengtsson 1978, Sosnowski & Gentile 1978, Nipper *et al.* 1993, Ihara *et al.* 2010, Gorbi *et al.* 2012).

A importância e potencial de copépodos na ecotoxicologia marinha já são reconhecidos por muitas organizações, agências reguladoras e convenções e,

por este motivo, protocolos para testes de toxicidade com estes organismos foram estabelecidos (EPA 1976, ISO 14669 1999, OECD 2007, ISO 16778 2013).

Contudo, existe a necessidade de que os fundamentos, técnicas e metodologias sugeridas nestes protocolos serem avaliados e aprimorados, já que, a toxicologia é uma ciência experimental em desenvolvimento, logo, sujeita a erros e mudanças metodológicas (OECD 2006). Uma vez que os bioensaios sejam realizados de acordo com um protocolo consistente e bem estabelecido, com métodos concisos, coerentes, confiáveis e replicáveis, seus resultados tornam-se ferramentas para a proteção de ecossistemas estuarinos e marinhos (Sosnowski & Gentil 1978, Bellas & Thor 2007, Avila *et al.* 2010).

Na literatura são encontradas divergências com relação aos organismos utilizados nos bioensaios, uma delas é a utilização de copépodes cultivados em laboratório por um longo período (meses a anos) (Toudal & Riisgård 1987, ISO 14669 1999, Pedroso *et al.* 2007, Ihara *et al.* 2010, Gorbi *et al.* 2012, Pham 2014) em relação à utilização de copépodes coletados do ambiente e aplicados diretamente nos experimentos (Kaminski 2004; 2009, Stringer 2012, Finiguerra *et al.* 2013, Agostini 2014, Lopes 2014, Sun *et al.* 2015) com ou sem aclimação. Neste caso, ambas as propostas podem influenciar negativamente os resultados dos bioensaios, pois a utilização de organismos cultivados pode acarretar em diminuição da variabilidade genética ao longo do tempo (Eknath & Doyle 1985, Allendorf & Ryman 1987, Lacy 1987), podendo influenciar os resultados dos experimentos e assim confundir a comparação e a reprodutibilidade entre os testes de toxicidade de diferentes laboratórios (Nowak *et al.* 2007).

Em contrapartida, os copépodos empregados diretamente em bioensaios toxicológicos após a coleta garantem uma maior variabilidade genética, porém, estes podem estar estressados, além de influenciados pelas características ambientais (alimentação, dinâmica, predação, competição interespecífica, entre outros fatores) (Sosnowski *et al.* 1979), acarretando em resultados possivelmente inadequados. Desta forma, talvez exista a necessidade de aclimação de algumas horas para excluir os organismos debilitados (Hollister *et al.* 1980, Chow-Fraser 1986) mantendo toda a população sob as mesmas condições antes de utilizá-los em testes ecotoxicológicos (Lance 1963).

Os procedimentos utilizados para avaliar a resposta aguda de copépodos da espécie *Acartia tonsa* pela a *U.S. Environmental Protection Agency* EPA (1976), assim como pela ISO 14669 (1999), a *Oslo and Paris Commissions* (OSPAR) e também a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), ainda ignoram completamente questões biológicas como a maior sensibilidade de machos em relação às fêmeas (Parrish & Wilson 1978, Mauchline 1998, Medina *et al.* 2002) e a maior sensibilidade dos estágios de copepoditos em relação aos adultos (Hutchinson *et al.* 1998, Mohammed *et al.* 2009), os quais também podem influenciar nos resultados dos testes.

Desta forma, com o intuito de se avaliar alguns aspectos ignorados pelos protocolos de cultivo com o copépodo Calanoida *A. tonsa* para uso em bioensaios toxicológicos agudos, este trabalho teve como objetivo avaliar (i) a necessidade de aclimação de indivíduos de *A. tonsa* coletados do ambiente para uso direto em bioensaios toxicológicos agudos; (ii) possíveis diferenças na resistência entre copépodos coletados diretamente do ambiente e copépodos de

cultivos já existentes e (iii) estimar a sensibilidade de machos e fêmeas de *A. tonsa* em testes toxicológicos agudos a antimicrobianos.

3.2. Material e Métodos

Para os experimentos foram utilizados organismos provenientes dos cultivos de *Acartia tonsa*: do Laboratório de Zooplâncton e do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) assim como organismos coletados diretamente do ambiente (Fig. 2).

Os procedimentos de coleta, isolamento, cultivo (principal e secundário) e unidades experimentais (UE) utilizadas neste capítulo seguem os mesmos procedimentos e etapas detalhadas no item 2.2.1.

3.2.1. Procedimentos gerais

Para os experimentos, copepoditos VI (i.e adultos sem distinção de sexo) foram separados dos cultivos com auxílio de uma pipeta (tipo *Pasteur*) de ponta arredondada e o estágio no qual se encontravam foi verificado sob microscópio estereoscópico segundo Sabatini (1990) conforme procedimento já detalhado na seção 2.2.1.1 .

3.2.1.1. Unidades Experimentais (UE) utilizadas nos tratamentos

As UE são as mesmas detalhadas na seção 2.2.1.4, mas os experimentos que aqui foram realizados cada UE continha 100 mL de meio contendo 5 organismos para se manter uma densidade de estocagem de 1 org. 20 mL⁻¹ e cobertas com filme PVC conforme resultados obtidos na seção 2.3.2. Cada

tratamento possuía 4 réplicas com 5 organismos (ISO 14669 1999) e foram dispostas dentro de uma sala climatizada nas mesmas condições do cultivo, descritas na seção 2.2.1.2.

Cada bioensaio teve uma duração de 72 horas (Lopes 2014) e todas as UE eram checadas a cada 24 horas para a contabilização da sobrevivência e da mortalidade (Resgalla & Laitano 2002) sob microscópio estereoscópico, com comprovação da morte após estímulo físico e sem aeração (Whale & Battersby 2005).

3.2.1.2. Testes de sensibilidade

Para avaliar a diferença na sensibilidade dos copépodos durante os experimento foi utilizada uma concentração de 2 mg.L⁻¹ de Dodecil Sulfato de Sódio Puro (DSS). Esta concentração foi adquirida antes dos bioensaios, como sendo a CL₅₀ 48 horas de um teste de referência com a mesma substância, utilizando as concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹ (Ihara 2008). Comparando assim, o resultado obtido deste teste de referência, com os limites de sensibilidade da carta controle do CONECO, a qual possui, para esta mesma substância, uma CL₅₀ 48 horas média de 1,52 mg. L⁻¹ com limite inferior de 0,91 mg. L⁻¹ e limite superior de 2,13 mg.L⁻¹, verificando a adequação da sensibilidade e uniformidade da população do cultivo do Laboratório de Zooplâncton (Zagatto & Bertolletti 2008). Somente foram considerados os testes em que o controle apresentou no máximo 10 % de mortalidade com 48 horas de exposição (ISO 14669 1999).

3.2.2. Avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*

Para avaliar a necessidade de aclimação de copépodos da espécie *Acartia tonsa* coletados do ambiente antes da sua aplicação em biensaio toxicológicos agudos foi realizado um experimento testando diferentes tempos de aclimação (Tab.7). Essa aclimação foi em relação as condições do cultivo (seção 2.2.1.2) e foi realizada em um curto período de tempo em relação a vida do organismo.

Tabela 7: Tratamentos utilizados no teste toxicológico agudo de aclimação pós coleta.

Tratamentos	Tempo de aclimação
C _{0h}	Controle com 0 h de aclimação
C _{20h}	Controle após 20 h de aclimação
C _{30h}	Controle após 30 h de aclimação (Agostini 2014)
T _{0h}	Tratamento com DSS com 0 h de aclimação
T _{20h}	Tratamento com DSS após 20 h de aclimação
T _{30h}	Tratamento com DSS após 30 h de aclimação

Para este experimento cerca de 250 copepoditos VI (i.e. adultos sem distinção de sexo) da espécie *Acartia tonsa* foram identificados e triados de amostras coletadas no dia 26/03/2016, seguindo a metodologia detalhada na seção 2.2.1.1, os parâmetros físico-químicos da água marinha da Praia do Cassino na hora da coleta se encontram na tabela 8. Os primeiros 20 copepoditos triados foram depositados nas UE seguindo procedimentos descritos na seção 3.2.1.1. para os tratamentos conduzidos sem aclimação (C_{0h} e T_{0h} – Tab. 7). O restante dos copepoditos triados foram divididos em dois recipientes contendo 2 L de meio marinho (Fig. 8), sendo aclimatados respectivamente por 20 e 30 horas e mantidos nas mesmas condições do cultivo (Seção 2.2.1.2) durante esse período.

Tabela 8: Parâmetros da água marinha da Praia do Cassino adquiridos para o experimento da Avaliação do tempo de aclimatação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*: potencial de hidrogênio (pH), Temperatura (T° C) e salinidade.

Parâmetros	Água marinha da Praia do Cassino
pH	7,64
Temperatura	23
Salinidade	31

Conforme foi atingido o tempo de aclimatação (20 e 30 horas) os organismos necessários para cada réplica (3.2.1.1.) foram depositados em cada UE para a realização dos experimentos (Tab. 7). O experimento foi estático, ou seja, sem renovação do meio (ISO 14669 1999). Diariamente, era retirado cuidadosamente sob visualização em microscópio estereoscópico (Olympus SZ40) utilizando um pipetador automático (Gilson Neo P1000N 100-1000 µL), um volume de 4 mL de cada UE para adicionar um volume equivalente de alimento com a concentração de 20.000 cel.mL⁻¹ da diatomácea *Conticribra weissflogii* (Teixeira *et al.* 2010), esta diatomácea foi selecionada ao invés de *Isochrysis galbana* para alimentar os organismos durante os experimentos porque já foi demonstrado que existe uma melhor resposta fisiológica e uma maior taxa de sobrevivência de *Acartia tonsa* alimentadas com a mesma em relação aos copépodos alimentados com *I. galbana* (Ismar *et al.* 2008). Os organismos que foram separados em excesso e não foram utilizados nos ensaios foram devolvidos ao cultivo principal.

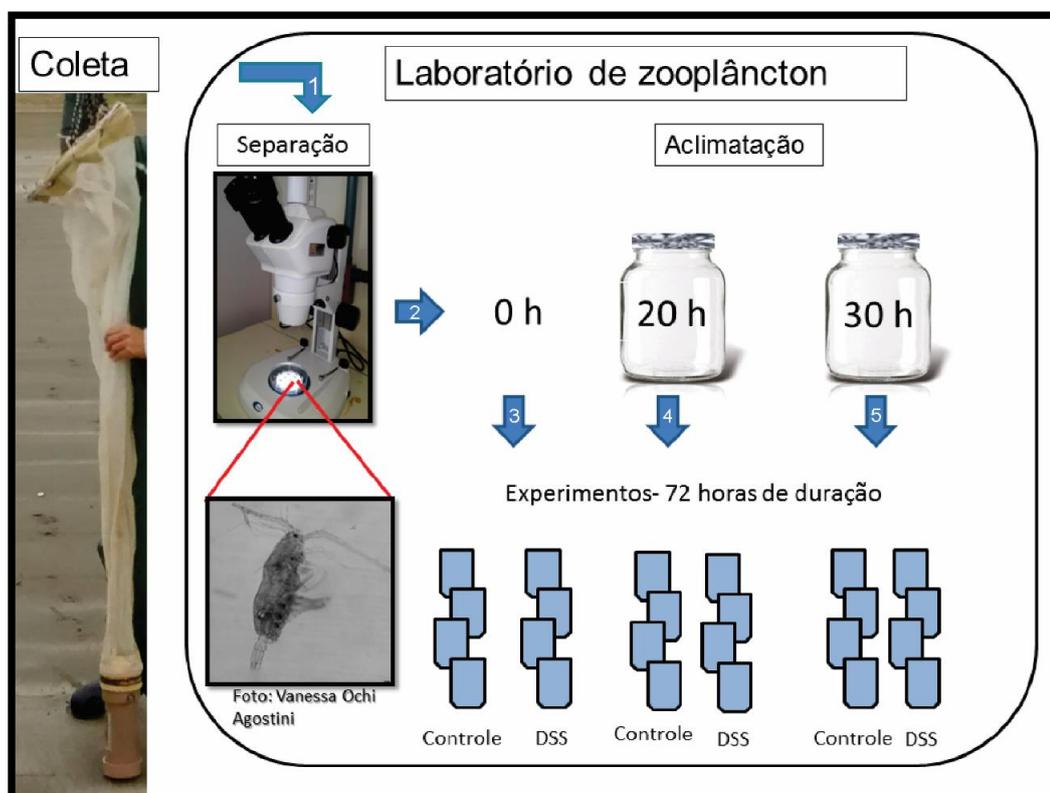


Figura 8: Esquema indicando os passos seguidos no experimento de avaliação do tempo de aclimação pós-coleta. 1- Após a coleta foi realizada a separação de *Acartia tonsa* da comunidade zooplânctonica sob visualização em microscópio estereoscópico; 2- Os organismos identificados foram submetidos a aclimação de 0h, 20h ou 30h; 3, 4 e 5 - de acordo com a aclimação, foi realizado o teste de toxicidade aguda com duração de 72 h.

3.2.3. Análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente

Para se avaliar a sensibilidade de organismos cultivados frente aos recém-coletados do ambiente um experimento constituído por quatro tratamentos (Tab. 9) foi elaborado.

Tabela 9: Tratamentos utilizados no teste de análise da sensibilidade entre *Acartia tonsa* cultivados e *A. tonsa* recém-coletados do ambiente.

Tratamentos	Condições das populações de copépodo para o experimento
A	Copépodos recém-coletados do ambiente, sem DSS
C	Copépodos do cultivo, sem DSS
T _A	Copépodos recém-coletados do ambiente, com DSS
T _C	Copépodos do cultivo, com DSS

Para este experimento 150 copepoditos VI de *Acartia tonsa* (i.e, machos e fêmeas sem distinção de sexo) foram obtidas junto ao cultivo do CONECO dois dias antes do experimento para que os organismos se aclimassem (mínimo de aclimação 30 horas, conforme resultados da seção 3.2.2.) às condições da sala de cultivo do Laboratório de Zooplâncton (Seção 2.2.1.2.) para evitar possíveis variações de sensibilidade devido a mudança de condições.

Outros 200 copepoditos VI foram identificados e triados de amostras coletadas no dia 27/09/2016, seguindo a metodologia detalhada na seção 2.2.1.1., e depositados em um recipiente contendo 4 L de meio marinho e aclimatados conforme o melhor resultado da seção 3.2.2. e mantidos nas mesmas condições do cultivo (Seção 2.2.1.2.). Os parâmetros físico-químicos da água marinha da Praia do Cassino na hora da coleta se encontram na tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros iniciais adquiridos para o experimento da análise da sensibilidade entre *Acartia tonsa* cultivada e *A. tonsa* recém-coletada do ambiente: potencial de hidrogênio (pH), Temperatura (T° C) e salinidade.

Parâmetros	Água marinha da Praia do Cassino
pH	8,43
Temperatura	18
Salinidade	24

Posteriormente, procedeu-se o bioensaio toxicológico com e sem exposição ao DSS (Tab. 9). Para estes bioensaios, 5 copepoditos VI foram depositados em cada UE conforme seção 3.2.1.1.

O experimento foi estático, ou seja, sem renovação do meio (ISO 14669 1999). A alimentação seguiu os procedimentos da seção anterior (3.2.2.).

3.2.4. Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa*

Para avaliar se existem diferenças na sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa* a antimicrobianos em experimentos toxicológicos agudos, um total 80 copépodos provenientes do cultivo do laboratório de zooplâncton (Seção 2.2.1.3.) foram separados em machos e fêmeas e colocados nas UE conforme a seção 3.2.1.1 para se estabelecer os quatro tratamentos que se encontram descritos na tabela 11.

Tabela 11: Tratamentos utilizados na avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa* expostos a antimicrobianos. UE significa unidades experimentais.

Tratamentos	Descrição
T _M	UE de machos sem antimicrobianos
T _F	UE de fêmeas sem antimicrobianos
T _{M*}	UE de machos com antimicrobianos
T _{F*}	UE de fêmeas com antimicrobianos

Para isto foi aplicada nas UE a seguinte combinação de antimicrobianos: 0,025 g.L⁻¹ de penicilina G potássica + 0,08 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina + 0,04 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina + 0,005 g.L⁻¹ de nistatina, previamente testados por Agostini (2014), Lopes (2014) e Agostini *et al.* (2016).

Este experimento foi semi-estático, ou seja, com reposição de antimicrobianos a cada 24 horas, para garantir o efeito dos mesmos até o final do experimento (Lopes 2014, Agostini *et al.* 2016).

Em uma segunda etapa, outros 80 copépodos provenientes do cultivo do Laboratório de Zooplâncton (Seção 2.2.1.3.) foram separados em machos e fêmeas e colocados nas UE conforme a seção 3.2.1.1 para verificar a sensibilidade dos mesmos ao DSS conforme os quatro tratamentos que se encontram descritos na tabela 12.

Tabela 12: Tratamentos utilizados na avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa* expostos ao DSS. UE significa unidades experimentais.

Tratamentos	Descrição
T_{MD}	UE de machos sem DSS
T_{FD}	UE de fêmeas sem DSS
T_{MD}^*	UE de machos com DSS
T_{FD}^*	UE de fêmeas com DSS

Este experimento foi estático, ou seja, não houve renovação do meio utilizados (ISO 14669 1999).

Nos dois experimentos, diariamente os copépodos nas UE eram alimentados, seguindo os procedimentos realizados na seção 3.2.2.

3.2.5. Análises estatísticas

Para as aplicações das análises estatísticas foi utilizado o programa R versão 3.3.1 (2016) (R CORE TEAM 2016) com o aplicativo Rstudio versão 0.99n.903-© 2009-2016.

Para testar a sobrevivência em todos experimentos foram desenvolvidos modelos GLM separadamente em cada observação final de 24, 48 e 72 horas:

Para o experimento da avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*:

Variável resposta:

$Y = n$ = número de sobreviventes do total do total de $n=5$ na UE.

Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes.

A função GLM no R usa o modelo “ $Y \sim \text{Trat} + \text{Tempaclim} + \text{Trat} * \text{Tempaclim}$ ” com função de ligação “logit”.

Trat= controle e tratamento com DSS (fator de 2 níveis: {C,T}).

Tempaclim= tempos de aclimação (fator de 3 níveis: {0h, 20h, 30h}).

Trat*Tempaclim= o efeito da interação entre os tratamentos controle e tratamentos com DSS e os tempos de aclimação.

Para o experimento Análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente:

Variável resposta:

$Y = n$ = número de sobreviventes do total do total de $n=5$ na UE.

Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes.

A função GLM no R usa o modelo “ $Y \sim$ Tratamento” com função de ligação “logit”.

Tratamento= controles e tratamentos com DSS (fator com 4 níveis {C, A, T_c, T_A})

Para o experimento Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa*:

Variável resposta:

$Y = n$ = número de sobreviventes do total do total de $n=5$ na UE.

Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes.

A função GLM no R usa o modelo “ $Y \sim$ Tratamento” com função de ligação “logit”.

Tratamento= controles e tratamentos com o contaminante (fator de 4 níveis {TF, TM, TM*, TF*}).

Para testar quais foram as diferenças entre os fatores analisados utilizou-se um Teste *post-hoc* de Tukey através do pacote multcomp (Hothorn *et al.* 2008). E para testar as diferenças entre as interações utilizou-se o pacote lsmeans (Lenth 2016).

As tabelas serão apresentadas com contraste entre os níveis dos fatores analisados para o *post-hoc* de Tukey .

Foi também utilizada a função *logit-inversa* para calcular a probabilidade estimada de um dado fator analisado para alguma diferença entre dois fatores analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, conforme descrito na seção 2.2.4.

As diferenças foram consideradas significantes quando o *p-valor* calculado foi menor que 0,05.

Os scripts de todos os experimentos testados nesse capítulo seguem o mesmo padrão do script do apêndice II.

3.3. Resultados

3.3.1. Avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*

De uma maneira geral, que o tratamento T_{0h} após 24 horas obteve um valor de sobrevivência de 20% e com 48 e 72 horas de 10% e 5%, respectivamente, sendo 5% o menor valor de sobrevivência encontrado ao longo do experimento (Fig. 9). O tratamento T_{20h} teve valores de sobrevivência em 24h, 48h e 72h de 45%, 40% e 20%, respectivamente. Enquanto T_{30h} mostrou 85% de sobrevivência ao longo de todos os tempos de exposição (Fig. 9)

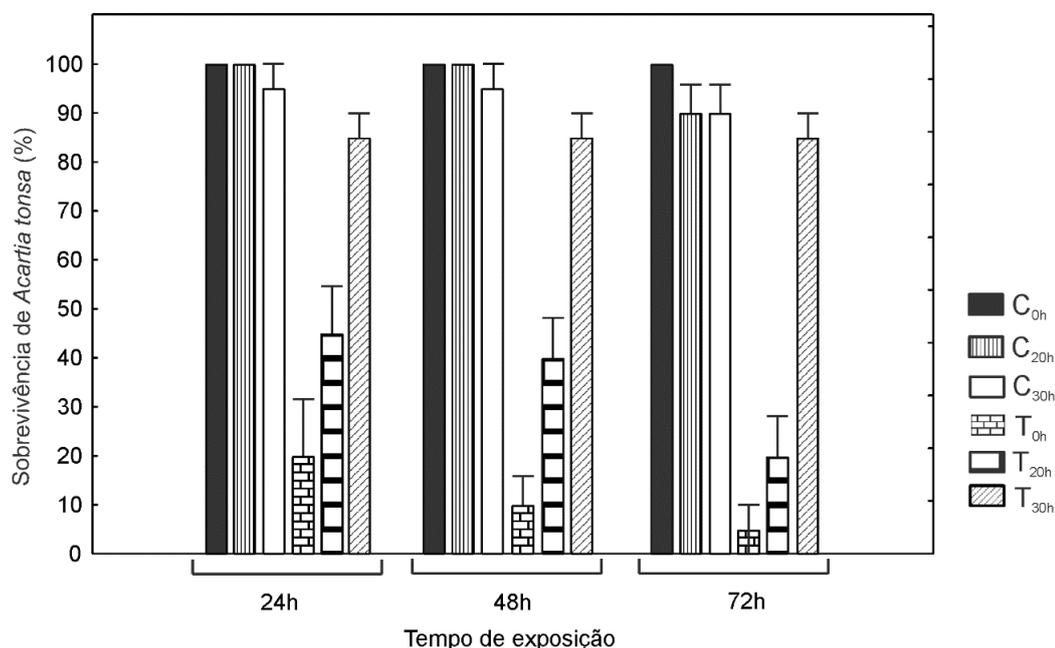


Figura 9: Sobrevivência média (%) de *Acartia tonsa* no experimento de avaliação do tempo de aclimação pós-coleta. Onde: C_{0h} = Controle com 0 h de aclimação; C_{20h} = Controle após 20 h de aclimação; C_{30h} = Controle após 30 h de aclimação; T_{0h} = Tratamento com DSS com 0h de aclimação; T_{20h} = Tratamento com DSS após 20 h de aclimação e T_{30h} = Tratamento com DSS após 30 h de aclimação. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões.

Pela análise GLM (Tab. 13), os controles com 24, 48 e 72 horas apresentaram os maiores valores de sobrevivência média. O tratamento T_{30h} apresentou os maiores valores de sobrevivência entre os tratamentos e não indicou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os controles ao longo do experimento. Ainda foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre T_{30h} e T_{0h} durante todo o tempo de exposição, com 24, 48 e 72 horas. Enquanto o T_{30h} apenas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre T_{20h} com 72 horas.

Durante todo o experimento o controle C_{0h} foi diferente significativamente ($p < 0,05$) do tratamento T_{0h} como também o controle C_{20h} e o tratamento T_{20h} apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

As outras interações, assim como os valores da probabilidade estimada (P) estão detalhados na tabela 13.

Tabela 13: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo *Acartia tonsa*. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (Trat) e diferentes tempos de aclimação (Tempaclim) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significativa, “*” indica significância ao nível de 0,05 e “**” ao nível de 0,01. Y é Binomial ($n=5$, θ), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. O modelo da função GLM foi “Y~Trat+Tempaclim+Trat-Tempaclim” com função de ligação “logit”. Trat= controle e tratamento com DSS (fator de 2 níveis: {C, T}). Tempaclim= tempos de aclimação (fator de 3 níveis: {0h, 20h, 30h}). Trat-Tempaclim= o efeito da interação entre os tratamentos controle e tratamentos com DSS e os tempos de aclimação.

Tempo	Tratamento	p -valor	P
24 h	C _{0h} -T _{0h}	0,000**	94%
	C _{20h} -T _{20h}	0,026*	87%
	C _{30h} -T _{30h}	ns	61%
	C _{0h} -C _{20h}	ns	50%
	C _{0h} -C _{30h}	ns	57%
	C _{20h} -C _{30h}	ns	57%
	T _{0h} -T _{20h}	ns	32%
	T _{0h} -T _{30h}	0,007**	12%
	T _{20h} -T _{30h}	ns	22%
48 h	C _{0h} -T _{0h}	0,000**	96%
	C _{20h} -T _{20h}	0,013*	89%
	C _{30h} -T _{30h}	ns	63%
	C _{0h} -C _{20h}	ns	50%
	C _{0h} -C _{30h}	ns	57%
	C _{20h} -C _{30h}	ns	57%
	T _{0h} -T _{20h}	ns	27%
	T _{0h} -T _{30h}	0,001**	8%
	T _{20h} -T _{30h}	ns	20%
72 h	C _{0h} -T _{0h}	<0,001**	96%
	C _{20h} -T _{20h}	0,003**	90%
	C _{30h} -T _{30h}	ns	55%
	C _{0h} -C _{20h}	ns	62%
	C _{0h} -C _{30h}	ns	62%
	C _{20h} -C _{30h}	ns	50%
	T _{0h} -T _{20h}	ns	35%
	T _{0h} -T _{30h}	0,000**	8%
	T _{20h} -T _{30h}	0,007**	12%

3.3.2. Análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente

Conforme os resultados da seção (3.3.1), o melhor tempo de aclimação foi o de 30 horas, assim os organismos deste experimento foram aclimatados por este tempo antes da realização dos ensaios.

Com 24 horas os controles C e A e o tratamento T_A foram detentores da maior percentagem de sobrevivência média (respectivamente 95%, 100%, 95%,) sendo o tratamento T_C detentor da menor percentagem de sobrevivência de copépodos (60%) (Fig. 10). Transcorridas 48h os controles C e A e o T_A não sofreram alteração, já o tratamento T_C apresentou 50% de mortalidade (Fig. 10).

Ao final do experimento, o tratamento T_C seguiu demonstrando a menor sobrevivência de organismos (45%), sendo a maior sobrevivência observada no tratamento T_A onde 90% dos organismos sobreviveram. Os controles C e A, apresentaram 85% e 100% de sobrevivência, respectivamente (Fig. 10).

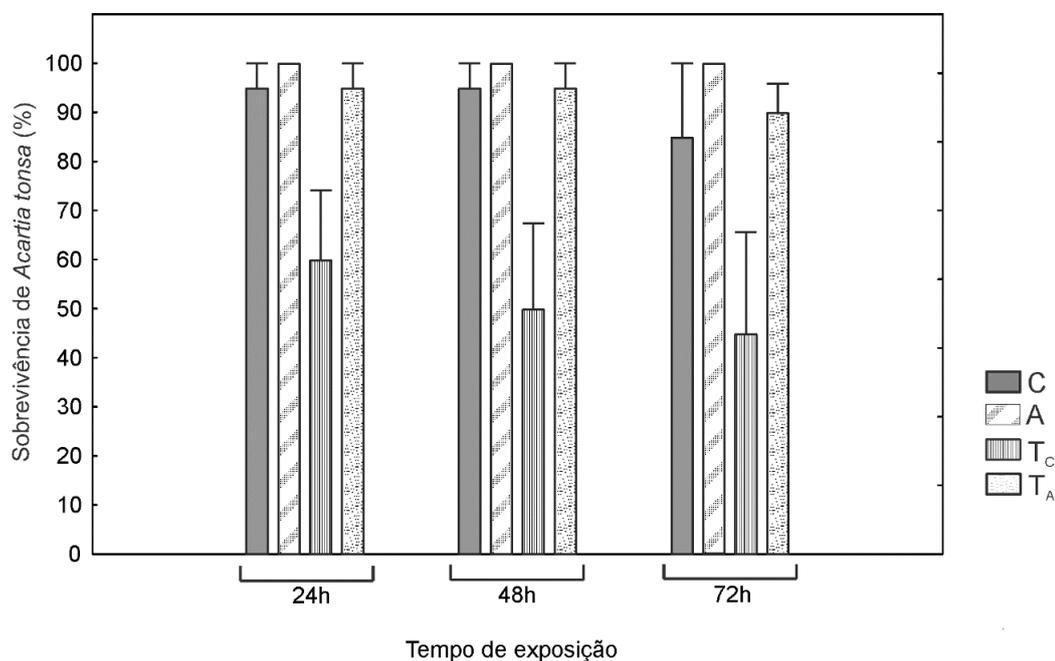


Figura 10: Sobrevivência média (%) do copépodo *Acartia tonsa* durante o experimento da análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente. Onde: C = Copépodos do cultivo, sem DSS; A = Copépodos recém-coletados do ambiente, sem DSS; T_c = Copépodos do cultivo, com DSS e T_a = Copépodos recém-coletados do ambiente, com DSS. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões.

Pela análise GLM foi verificada diferença significativa apenas entre os tratamentos T_c e o controle A em 48 horas e em 72 horas de exposição, sendo que T_c demonstrou uma chance de 14% e 13% de sobrevivência em relação ao controle A, respectivamente nesses tempos (Tab. 14).

Tabela 14: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento de análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (Tratamento) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. "ns" indica não significativa e "*" indica significância ao nível de 0,05. Y é Binomial ($n=5, \theta$), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. O modelo da função GLM foi $Y \sim \text{Tratamento}$ com função de ligação "logit". Tratamento= controles e tratamentos com DSS (fator com 4 níveis {C, A, T_C, T_A}).

Tempo	Tratamentos	p -valor	P
24 horas	A-C	ns	57%
	T _C -C	ns	22%
	T _A -C	ns	50%
	T _C -A	ns	18%
	T _A -A	ns	43%
	T _A -T _C	ns	78%
48 horas	A-C	ns	57%
	T _C -C	0,066	18%
	T _A -C	ns	50%
	T _C -A	0,032*	14%
	T _A -A	ns	43%
	T _A -T _C	0,066	82%
72 horas	A-C	ns	67%
	T _C -C	ns	22%
	T _A -C	ns	55%
	T _C -A	0,017*	13%
	T _A -A	ns	38%
	T _A -T _C	0,073	81%

Os valores que não são significativos, mas que se encontram perto do limite de significância ao nível de 0,05, estão apresentados na tabela. Os valores foram considerados perto do limite de significância quando os mesmos fossem menores ou igual a 0,1.

3.3.3. Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa*.

Na figura 11 é possível observar a sobrevivência média de machos e fêmeas do copépodo *Acartia tonsa* expostos aos antimicrobianos com 24, 48 e 72 horas de experimentos. Após 24 horas de experimento os controles T_F e T_M exibiram uma mortalidade média de 5% cada um, enquanto os tratamentos T_F* e T_M* apresentaram 100% de sobrevivência dos copépodos, sendo estas as maiores sobrevivências reportadas durante o experimento. Com 48 horas, os controles T_F e T_M, seguiram mostrando uma sobrevivência de 95%, já o tratamento T_F*

apresentou uma sobrevivência média dos organismos de 90% e T_{M^*} uma sobrevivência de 95%. Ao final do experimento, com 72 horas, os controles apresentaram 10% de mortalidade enquanto o T_{F^*} 15% e o T_{M^*} 30%. O T_{M^*} apresentou a menor sobrevivência durante todo o experimento, onde apenas 70% dos organismos sobreviveram.

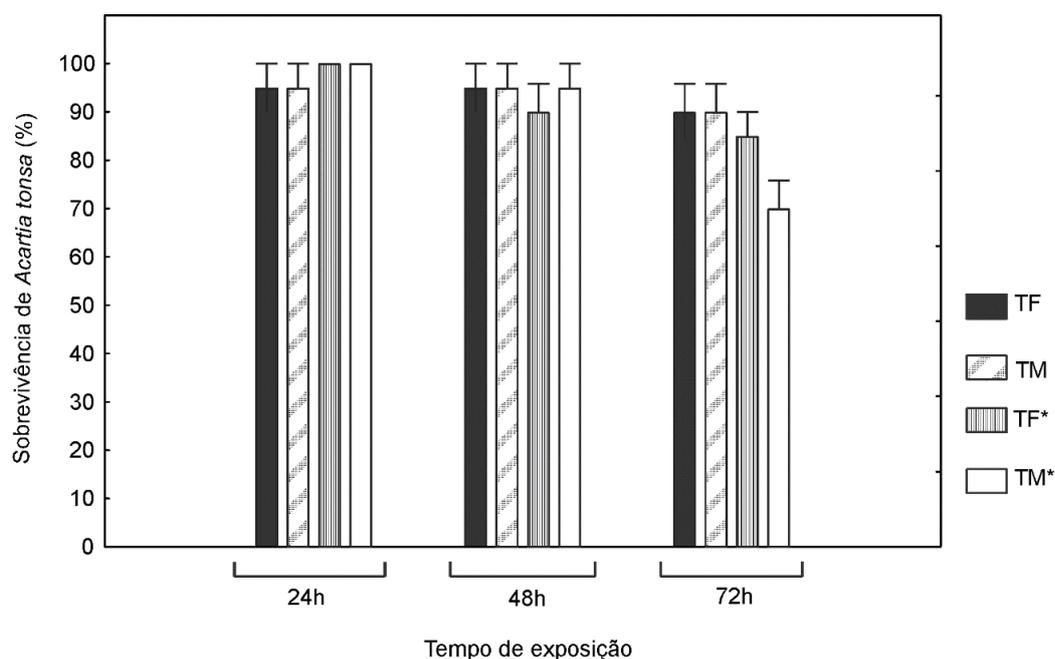


Figura 11: Sobrevivência média (%) do copépodo *Acartia tonsa* durante o experimento da avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas expostos a antimicrobianos. Onde: TF = Cultivo de fêmeas sem antimicrobianos; TM = Cultivo de machos sem antimicrobianos; TF* = Cultivo de fêmeas com antimicrobianos e TM* = Cultivo de machos com antimicrobianos. As barras representam a semi amplitude do intervalo de confiança de 95 % de acordo com os erros padrões.

Estatisticamente não foi verificada nenhuma diferença significativa de sensibilidade entre machos e fêmeas expostos a antimicrobianos nos tratamentos e períodos avaliados no experimento (Tab. 15).

Tabela 15: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa*. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre os diferentes tratamentos (D) sobre a sobrevivência dos organismos (Y) em 24 horas, 48 horas e 72 horas. “ns” indica não significativo. Y é Binomial ($n=5$, θ), sendo θ a probabilidade de sobreviventes. $Y \sim \text{Tratamento}$ com função de ligação “logit”. O modelo da função GLM foi: $Y \sim \text{Tratamento}$ com função de ligação “logit”. Tratamento= controles e tratamentos com o contaminante (fator de 4 níveis {TF, TM, TM*, TF*}).

Tempo	Tratamentos	p -valor	P
24 horas	TM-TF	ns	50%
	TM*-TF	ns	57%
	TF*-TF	ns	57%
	TM*-TM	ns	57%
	TF*-TM	ns	57%
	TF*-TM*	ns	50%
48 horas	TM-TF	ns	50%
	TM*-TF	ns	50%
	TF*-TF	ns	44%
	TM*-TM	ns	50%
	TF*-TM	ns	44%
	TF*-TM*	ns	44%
72 horas	TM-TF	ns	50%
	TM*-TF	ns	33%
	TF*-TF	ns	45%
	TM*-TM	ns	33%
	TF*-TM	ns	45%
	TF*-TM*	ns	62%

O segundo experimento realizado nessa seção, ou seja, a sensibilidade entre machos e fêmeas expostos ao DSS, não foi levado em consideração, já que todas as tentativas da realização do mesmo (5 repetições) apresentaram uma mortalidade dos organismos maior que 10% nos controles.

3.4. Discussão

3.4.1. Avaliação do tempo de aclimação pós-coleta para o copépodo

Acartia tonsa

Os controles aqui utilizados apresentaram os melhores resultados de sobrevivência média em todos os tempos de aclimação durante os

experimentos, entretanto quando o DSS é aplicado nos tratamentos, nota-se que o tempo de aclimação ajudou na sobrevivência destes organismos. Segundo a *Environment Canada* (1990) substâncias de referência, como o DSS, são utilizadas para avaliar as condições de sensibilidade dos organismos-teste, sejam eles provenientes dos cultivos do laboratório ou até mesmo do ambiente/campo. Neste experimento foi possível verificar que a utilização apenas dos controles mascaram as condições em que os organismos se encontram, ou seja, estressados e debilitados devido a coleta, podendo levar a más interpretações e erros nos testes, já que o que estará matando os organismos não será o toxicante em si, mas sim o toxicante em conjunto com o estresse da coleta.

Além disso, apenas com 24 horas, já é possível certificar a importância da aclimação para o copépodo *Acartia tonsa* coletado no ambiente, para esses organismos se recuperarem do estresse causado pela mesma. Esta importância também já foi demonstrada por Lance (1963) através de experimentos relacionados com os efeitos da salinidade e temperatura combinados, envolvendo três espécies congênicas de *Acartia*, inclusive *A. tonsa*, e como no presente estudo, o autor verificou que a aclimação ajuda na sobrevivência dos copépodos.

Contudo, a maior parte dos estudos relacionados à aclimação de copépodos são focados na tolerância dos organismos às mudanças de salinidade (Lance 1963, Roddie *et al.* 1984), de temperatura (Lance 1963, Bradley 1978, Roddie *et al.* 1984), avaliação da nutrição (Mayzaud *et al.* 1998) e a tolerância a contaminantes (Sun *et al.* 2015). Com isso, torna-se mais evidente

a importância do estabelecimento de um tempo mínimo de aclimação dos organismos as condições de laboratório, para que estes possam se recuperar do estresse causado pela coleta, e assim se desenvolver com êxito os bioensaios.

Estatisticamente copépodos aclimatados por 30 horas apresentaram os maiores valores médios de sobrevivência em todos os tempos de exposição. Ao final do experimento foi obtida uma chance de sobrevivência dos copépodos de 55% comparado à sobrevivência média no controle C_{30h}, o qual foi estatisticamente igual ao T_{30h}. O tempo de aclimação de 20 horas se mostrou falho, demonstrando desde o início diferenças significativas entre o tratamento e o controle. Nipper *et al.* (1993) e Chow-Fraser (1986) aclimataram os copépodos *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht 1889, *Temora stylifera* Dana 1849; *Diaptomus oregonensis* Lilljeborg 1889 e os cladóceros *Daphnia galeata mendota* Birge 1918 e *D. pulex* Leydig 1860, por 24 horas e concluíram que esse tempo não seria suficiente para ajudar na sobrevivência dos copépodos, pois há a possibilidade das condições nutricionais dos organismos coletados e outros fatores afetarem os resultados dos experimentos. Entretanto, já para os cladóceros Chow-Fraser (1986) reportou que 24 horas de aclimação seriam suficientes para aumentar a sobrevivência dos mesmos. Os resultados aqui expostos corroboram com os resultados obtidos para os copépodos, pois com 20 horas de aclimação apenas 20% dos copépodos utilizados sobreviveram ao final do experimento.

Hollister e colaboradores (1980) por sua vez utilizaram um tempo de aclimação de 48 horas para *A. tonsa* e reportaram ótimos resultados de sobrevivência (> 95%) durante esse período de aclimação. Os controles do

presente trabalho também demonstraram ótimos resultados de sobrevivência durante 72 horas (>90%). Entretanto apenas quando o estressor DSS foi aplicado foi possível verificar em quais tratamentos os organismos estavam debilitados. E se considerarmos os resultados obtidos após 30 horas de aclimação apresentados nesse experimento sugere-se que 30 horas deve ser o tempo mínimo de aclimação antes dos bioensaios, já que quando o experimento foi realizado os parâmetros físico-químicos (salinidade e temperatura) da água da Praia do Cassino e do cultivo eram os mesmos, assim conforme maiores amplitudes de salinidade e temperatura entre a água do ambiente coletado e o cultivo, possivelmente o tempo de aclimação será maior. Entretanto, alguns bioensaios que utilizaram diferentes copépodos do ambiente (Lance 1965, Latimer *et al.* 1975) reportaram resultados positivos com apenas 24 horas de aclimação. Cabe ressaltar, porém, que populações diferentes, de regiões geográficas diferentes, podem responder diferentemente às variações ambientais e químicas, como já foi comprovado por Sun *et al.* (2015) através da avaliação de cinco populações da espécie *Tigriopus japonicus* Mori 1938, coletadas em cinco regiões diferentes de Hong Kong e cinco populações de *Tigriopus californicus* Baker 1912, coletadas também em cinco diferentes regiões da Califórnia – USA. Estas apresentaram diferenças intraespecíficas dos valores de sensibilidade ao cobre, sendo umas populações dentro da mesma espécie muito mais resistentes que outras quando submetidas aos mesmos testes.

Kwok *et al.* (2008) sugeriram que para a espécie *T. japonicus* um período de aclimação superior a 10 dias fosse realizado antes dos testes de toxicidade.

Todavia, este copépodo é uma espécie de Harpacticoida, enquanto as espécies aqui utilizadas são copépodos Calanoida.

Como esperado, o tratamento T_{0h} demonstrou claramente o estresse gerado devido à coleta nos organismos através da baixa sobrevivência média de *Acartia tonsa*, e a necessidade de uma aclimação antes dos bioensaios. As taxas de sobrevivência para o tratamento T_{0h} sem aclimação foram baixíssimas, demonstrando que testes como este, que irão expor os organismos a um contaminante, sem aclimação prévia, poderão apresentar resultados equivocados. Isto demonstra que um tempo mínimo de aclimação antecedendo os bioensaios é fundamental, pois potencializa a taxa de sobrevivência dos organismos.

3.4.2. Análise da sensibilidade entre organismos de *Acartia tonsa* cultivados e organismos recém-coletados do ambiente

Neste estudo não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos que pudessem indicar uma diferença de sensibilidade entre os copépodos cultivados e os provenientes do ambiente. Assim, do ponto de vista estatístico, estes resultados não se mostraram compatíveis com os que foram apresentados por Sosnowski & Gentile (1978), cujo trabalho demonstrou que *Acartia tonsa* de populações coletadas do ambiente utilizada em bioensaios são mais sensíveis ao cádmio e ao cobre quando comparada a populações cultivadas em laboratório.

Além disso, Lugo *et al.* (1998) indicou que estressores naturais podem modificar a sensibilidade da comunidade zooplanctônica exposta às substâncias

agroquímicas. Estes mesmos organismos se mostraram mais sensíveis a estas substâncias no ambiente natural do que quando em ambientes de cultivo em laboratório com condições controladas.

Aqui foi apenas avaliada a diferença do efeito agudo entre os tratamentos, ou seja, letalidade, das populações de *A. tonsa* proveniente de um cultivo estabelecido e independente e das coletadas do ambiente. Porém, mesmo que só tenha sido observada diferença significativa entre o tratamento T_C e o controle A, quando o gráfico de sobrevivência média é observado, os valores resultantes para os tratamentos T_A e T_C tendem a mostrar o contrário do que foi apresentado por Sosnowski & Gentile (1978), ou seja, que copépodos do cultivo seriam mais sensíveis que copépodos do ambiente. Nota-se que os menores valores de sobrevivência média são exibidos pelo tratamento T_C durante todo o tempo de exposição. Ainda, os tratamentos T_A e T_C com 72 horas apresentam um *p*-valor bem próximo ao limite do nível de significância de 5% e uma probabilidade de sobrevivência dos organismos do ambiente bem maior em relação aos cultivados (probabilidade de 81%), isto sugere que pode haver alguma diferença entre estes tratamentos. Entretanto, para se chegar a alguma conclusão há a necessidade de uma investigação mais ampla realizando mais vezes este mesmo experimento para testar a reprodutibilidade do mesmo, já que existe uma variabilidade inerente nos valores de *p* (Boos & Stefanski 2011). Além disso, ao final do experimento o tratamento T_A mostrou-se, em termos de sobrevivência média, ser um pouco mais eficiente, comparado ao controle C das populações do cultivo, apresentando uma probabilidade de sobrevivência dos copépodos do tratamento T_A em relação ao controle C de 55%.

Noskov (2011) comparando a sensibilidade de *Daphnia magna* isolada do ambiente natural e cultivada apontou uma diferença significativa entre esses organismos, reportando que os cladóceros cultivados em laboratório se mostraram mais sensíveis ao inseticida sumicidin alpha. Os resultados deste trabalho alinham-se com estes de Noskov (2011) uma vez que foi verificada uma menor sobrevivência dos copépodos do cultivo em contato com a substância DSS.

Os testes de toxicidade utilizam, sempre que possível, um grupo de espécies que representam uma ampla gama de sensibilidade (Rand 1995). Neste caso, os copépodos do cultivo, por apresentarem a maior mortalidade média durante o experimento em relação aos controles e tratamentos, possivelmente, podem estar indicando uma maior sensibilidade em relação aos organismos do ambiente. Assim se estes organismos cultivados são utilizados nos bioensaios, os resultados dos mesmos estariam dizendo que uma substância seria tóxica para *A. tonsa* do cultivo, mas não para as espécies provenientes do ambiente. Porém, mais estudos são necessários para chegar a resultados estatísticos condizentes.

Contudo, as populações de organismos cultivados em laboratório têm assumido o papel de representar as espécies como um todo em testes de toxicidade, e os resultados dos bioensaios realizados com estes organismos têm sido livremente aplicados em situações do meio natural (Klerks 1987). Essa técnica tem sido muito criticada no meio científico (Luoma *et al.* 1983, White & Champ 1983, Levin & Kimball 1984, Kimball & Levin 1985). Segundo Klerks (1987) o motivo das críticas surge de muitas evidências que apontam que pode

existir uma alta variação na tolerância a agentes tóxicos entre diferentes populações de uma mesma espécie.

O ciclo de vida dos copépodos é curto quando comparado com a maioria das espécies aquáticas utilizadas em cultivos, proporcionando várias gerações em um curto período de tempo. Essas várias gerações com um tempo de vida curto podem resultar tanto em respostas fenotípicas positivas quanto negativas devido às mudanças nas condições ambientais (Tiselius *et al.* 1995).

Já foi demonstrado que o cultivo em condições artificiais é caracterizado por mudanças genéticas no comportamento, na morfologia ou na fisiologia dos organismo (Doyle 1983). Os cultivos de *A. tonsa* do CONECO foram estabelecidos há oito anos, com adição de alguns organismos, ao longo do tempo, doados ora do cultivo do Laboratório de Zooplâncton ora de coletas realizadas pelo mesmo Laboratório e já passaram por muitas gerações (> 112 considerando-se um ciclo de 26 dias). Entretanto os organismos que foram adquiridos do cultivo do Laboratório de Zooplâncton já vinham com um histórico de copépodos cultivados agregado, sendo possível que os mesmos já apresentassem as características e resistências que organismos de cultivos manifestam. Mesmo que estes cultivos tenham recebidos copépodos do ambiente ao longo do tempo, o espaçamento entre uma adição e outra pode ser importante, Alajmi *et al.* (2015), reportaram através da taxa de mortalidade e a produção de ovos uma maior resistência para o copépodo Calanoida da espécie *Parvocalanus crassirostris* Dahl 1894 cultivado por dois anos, em relação aos organismos da mesma espécie coletados do ambiente. Assim, o cultivo do CONECO pode, teoricamente, ter adquirido características fenotípicas

negativas, já que a resposta de sobrevivência média indicou os menores resultados para esta população.

Existe um efeito chamado perda da aptidão gerada devido ao longo tempo de cultivo, particularmente a endogamia, os quais estão suscetíveis a acumular através de gerações (Araki 2007), e devido ao longo tempo de cultivo em que os copépodos testados se encontravam, possivelmente poderiam estar sendo influenciados por esse fenômeno.

A aptidão está associada com o nível de variação genética da população (Mitton 1997). Em geral, assume-se que a sobrevivência de uma população ao longo do tempo depende de um nível suficiente de variação genética dos organismos, o qual irá permitir que se adaptem às mudanças no ambiente (Frankham 2005).

Assim, poderíamos sugerir que a variação genética seja um fator relevante que poderia estar contribuindo para a maior resistência aos organismos do ambiente ou a menor resistência dos organismos do cultivo. Porém, para chegar a uma conclusão é necessário realizar experimentos genéticos.

Por outro lado, podemos inferir que os organismos que foram coletados na Praia do Cassino e que passaram pelo tempo de aclimação de 30 horas, tempo pré definido na seção 3.3.1, encontravam-se em ótimas condições nutricionais e físicas, devido à alta sobrevivência no controle (100%). Vale ressaltar que esse tempo, se mostrou eficiente neste experimento com o controle A e o tratamento T_A apresentando 100% e 90% de sobrevivência, respectivamente, ao longo do experimento, mesmo com uma diferença na

temperatura de 5 °C e na salinidade de 6 pontos a menos, quando comparada com a água marinha que eles foram aclimatados. Talvez maiores diferenças nesses parâmetros físico-químicos entre a água do ambiente e a da água marinha que os organismos foram aclimatados, necessite de maiores tempos de aclimação, entretanto para se responder essa questão devem ser realizados mais outros experimentos. Contudo, os copépodos do ambiente que foram utilizados neste experimento estão representando somente um conjunto das condições nutricionais e do ambiente do momento coletado, de um ambiente dinâmico que é a Praia do Cassino. Enquanto o cultivo representaria as condições ambientais e nutricionais ideais para *Acartia tonsa*, ou seja, os animais em laboratório são alimentados com excesso de alga e os organismos fracos e debilitados não estão sujeitos à eliminação por predação, ao contrário dos copépodos do ambiente, que crescem em um ambiente com variação da fonte de alimento e com um risco contínuo de serem predados. Tiselius *et al.* (1995) reportaram que em cultivos contínuos de copépodos, os mesmos estariam sujeitos a diferentes fatores seletivos comparados aos do ambiente natural. Além disso, os organismos do cultivo são ótimos para se obter resultado relativos a um fator na atividade do copépodo, mas é menos claro até que ponto pode-se confiar nos resultados gerados utilizando organismos de laboratório, pois a redução do risco de predação e a seleção contínua para o crescimento rápido/reprodução elevada podem criar respostas funcionais alteradas (Tiselius *et al.* 1995).

Por esses motivos supracitados, existe uma necessidade de se repetir mais vezes este mesmo experimento avaliando essa diferença na sensibilidade

entre organismos do cultivo e organismos de diferentes ambientes. Pois, além da literatura apresentar resultados divergentes, os resultados aqui apresentados também são discordantes, ou seja, que não existe diferença significativa de sensibilidade entre populações de organismos do ambiente e cultivo. Porém, também deve-se realizar mais testes de sensibilidade ao longo do tempo com os organismos do meio ambiente para avaliar essa sensibilidade e poder comparar com os organismos de um cultivo.

3.4.3. Avaliação da sensibilidade entre machos e fêmeas de *Acartia tonsa* expostos a antimicrobianos

No experimento realizado neste estudo não foi apresentada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos T_M^* e T_F^* e entre os mesmos e os controles. Stringer (2012), demonstraram que para o copépodo Harpacticoida *Robertsonia propinqua* Scott 1894 não houve nenhuma diferença na sensibilidade entre machos e fêmeas ao zinco e a atrazina. Entretanto como *R. propinqua* é um copépodo Harpacticoida e muitos estudos reportaram uma maior sensibilidade de copépodos Calanoida que copépodos Harpacticoida a uma variedade de substâncias químicas (Ward & Ballantine 1985, O'Brien *et al.* 1988, Di Toro *et al.* 1991, ANZECC 2000, Stringer 2012), esperava-se que os resultados aqui demonstrassem uma diferença na sensibilidade entre machos e fêmeas.

Medina *et al.* (2002) demonstraram através de um experimento, que fêmeas de *Acartia tonsa* são mais tolerantes a cipermetrina. De uma outra forma, aqui, quando observada apenas a sobrevivência média e também a

probabilidade de sobrevivência entre um tratamento em relação ao outro, nota-se que existe uma propensão em aumentar a sensibilidade dos copépodos machos expostos aos antimicrobianos em relação às fêmeas expostas aos antimicrobianos e aos controles. E a probabilidade de sobrevivência do T_F^* em relação a T_M^* ao longo do tempo também aumenta, sugerindo que se tivéssemos conduzido os experimentos por mais 24 horas, seria plausível supor que se acentuassem as diferenças e diferenças significativas pudessem ser observadas.

Sabe-se que machos de copépodos são fisiologicamente mais sensíveis, pois apresentam um metabolismo mais rápido e com menos estoque de lipídios que fêmeas (Avery *et al.* 2008). Além disso, são menores que as fêmeas (Landry 1983) e mais predados, pois precisam procurar fêmeas para o acasalamento (Kjørboe 2006). Ainda, muitos estudos já comprovaram uma maior tolerância de fêmeas em relação a machos a diversos fatores como: variações nos parâmetros ambientais (*i.e.* salinidade, temperatura, pH, etc.) (Kelly *et al.* 2012), a fome (Colin & Dam 2003, Avery & Dam 2007, Raisuddin *et al.* 2007), contaminantes (Di Pinto *et al.* 1993, Carman & Todaro 1996) e toxinas de algas (Avery *et al.* 2008). Assim, especula-se que a inexistência de diferenças significativas na sensibilidade entre os sexos neste experimento seja devido à utilização de uma combinação de antimicrobianos previamente testada por Lopes (2014) e Agostini *et al.* (2016) que não apresentou nenhum efeito letal a esta espécie.

Apesar dos resultados aqui encontrados, a realização de um experimento com uma substância de referência como o DSS para a verificação desta diferença da sensibilidade entre os sexos de *Acartia tonsa* e uma pesquisa mais

aprofundada neste assunto é muito importante para testes de toxicidade, para a proteção do meio ambiente e também para testes ecológicos. Já que existem muitos fatores que colaboram para a mortalidade dos machos de copépodos, podendo assim limitar o sucesso da fertilização, levando ao declínio da população (Kjørboe 2007). Além da possibilidade de testes sem distinção de sexo apresentarem variações na sensibilidade, as quais podem modificar a toxicidade dos testes agudos (Sprague 1995).

3.4.4. A alimentação durante os bioensaios

Durante os experimentos os copépodos foram alimentados a cada 24 horas com uma concentração de 20.000 cel.mL⁻¹ da diatomácea *Conticribra weissflogii*. Os experimentos de toxicidade aguda não realizam esse procedimento (ISO 14669 1999, Ihara *et al.* 2010, Lopes 2014). Segundo Dagg (1977) o copépodo *Acartia tonsa*, pode sobreviver por volta de 48 horas sem ser alimentado, mas antes disso ocorrer o copépodo primeiramente irá passar por processos como: a diminuição na energia utilizada na alimentação (Frost 1975); diminuição do metabolismo (Conover & Coner 1968, Harris 1973), o crescimento cessará (Marshall & Orr 1955) e diminuição na produção de ovos (Checkley 1980). Assim, a condição nutricional do organismo é muito importante antes e durante o teste, pois pode modificar a aparência da toxicidade da substância química (Lanno *et al.* 1989). Alimentar o organismo irá aumentar seu metabolismo e conseqüentemente a sua absorção e a taxa de depuração do toxicante (Jobling 1981). Por exemplo, já foi observado que a alimentação diminui a toxicidade do cobre em *Acartia tonsa* (Sosnowski *et al.* 1979), bem como a toxicidade do

sulfonato de aquibenzeno linear em *Daphnia magna* (Taylor 1985). Entretanto, a alimentação pode também interagir com o contaminante e diminuir essa toxicidade (Erickson *et al.* 1998). Neste trabalho não foi avaliado o efeito da alimentação nos testes de toxicidade, houve uma maior preocupação em relação à fisiologia, ou seja, ao efeito do estado nutricional de *A. tonsa* nesses testes. Contudo, um teste avaliando este efeito para melhores conclusões deve ser realizado.

3.5. Conclusão

- Recomenda-se um tempo de aclimação pré-bioensaios dos organismos coletados do ambiente de 30 horas. Este tempo é suficiente para permitir que os organismos debilitados se recomponham aumentando a sobrevivência dos organismos;
- Não foi verificada nenhuma diferença significativa na sensibilidade entre *A. tonsa* do ambiente e do cultivo;
- Não foi encontrada diferença significativa na sensibilidade aguda entre machos e fêmeas de *A. tonsa* a essa combinação de antimicrobianos, a qual já não havia demonstrado um efeito agudo aos copépodos da mesma espécie (Lopes 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo trouxe informações e esclarecimentos relevantes em relação aos procedimentos e métodos de bioensaios utilizando o copépodo *Acartia tonsa*. Apresentamos evidências que o método utilizando uma malha de rede de 180 µm para separar adultos de estágios imaturos desses copépodos não é eficiente, bem como o uso de um volume mínimo de 25 mL nas UE não é adequado devido às possíveis alterações nos parâmetros físico-químicos do meio utilizado. Além disso, este trabalho trouxe mais conhecimento sobre o uso de um modelo estatístico mais adequado, como o GLM, para este tipo de bioensaio e também o tempo mínimo de aclimação para se utilizar *A. tonsa* do ambiente.

Devido a necessidade de facilitar a realização da separação dos organismos, talvez uma maneira eficaz de resolver este problema seria tornar estes copépodos mais lentos por meio da utilização de determinados métodos, assim sugere-se a realização de bioensaios testando a toxicidade, tanto aguda quanto crônica, o tempo de recuperação do copépodo e adequação de técnicas como: a utilização de anestésias, como a MS 222 (ethyl *m*-aminobenzoate), a qual já é utilizada em trabalhos de zooplâncton (Båmstedt *et al.* 2000, Durbin *et al.* 2012); e a redução temporária da temperatura da água, já que *A. tonsa* é capaz de tolerar uma grande faixa de temperatura (-1 à 32 °C) (González 1974) e sobreviver a mudanças repentinas no ambiente (Mauchline 1998).

Entretanto, os experimentos relacionados com a melhor densidade de estocagem para os bioensaios utilizando *A. tonsa*, a diferença na sensibilidade entre machos e fêmeas de copépodos dessa espécie e a diferença na sensibilidade entre organismos do cultivo e recém coletados do ambiente, não demonstraram diferença significativa entre seus tratamentos. Porém, na literatura

consta informações, sobre a biologia e fisiologia de *A. tonsa* e também sobre fatores e mudanças nos cultivos que podem afetar o comportamento, a morfologia ou a fisiologia dos organismos.

Por esses motivos, sugere-se a repetição do experimentos avaliando a melhor densidade de estocagem para os bioensaios utilizando *A. tonsa* utilizando a substância DSS, pois existe a possibilidade de que os copépodos utilizados neste experimento tenham adquirido uma resistência ao ambiente de cultivo. Também, executar um outro experimento avaliando a relação da sensibilidade entre os organismos de cultivos em altas densidades e por longo período de tempo e organismos de cultivos em menores densidades e curto períodos de tempo, utilizando os mesmos tratamentos deste experimento, pode trazer uma resposta mais apurada em relação a melhor densidade de estocagem.

A sensibilidade entre os sexos dos copépodos é também uma questão importante como foi enfatizado neste trabalho, logo realizar outro experimento avaliando a diferença na sensibilidade entre machos e fêmeas de copépodos de *A. tonsa* utilizando a substância DSS e adicionando mais um tratamento, além desses dois aqui testados, em que não haja distinção de sexos desses organismos, é muito importante para se chegar a uma resposta mais concreta sobre este tópico.

Como também é importante repetir o experimento da avaliação da diferença na sensibilidade entre organismos do cultivo e recém coletados do ambiente, já que o cultivo no qual os copépodos foram utilizados já está estabelecido há oito anos. Ainda, o valor de p relacionado aos tratamento T_A e T_C se encontra bem próximo ao limite do nível de significância de 5% sugerindo

que possa existir ou não alguma diferença significativa entre estes tratamentos. Se os organismos do cultivo forem mais sensíveis que do ambiente, significa que os testes toxicológicos não estejam representando bem o ambiente. Vale ressaltar, que existem trabalhos de toxicidade que estabeleceram seus cultivos através de ovos doados de cultivos de outros laboratório, ao invés de coletarem seus próprios organismos do ambiente (Wollenberger *et al.* 2003, Medina & Barata 2004, Lauer & Bianchini 2010). A própria ISO 14669 (1999) recomenda o uso, preferencial, de *Acartia tonsa* doadas de laboratórios que já possuem um cultivo dessa espécie. E como foi apresentado anteriormente, existem vários problemas relacionados a cultivo a longo prazo, isto significa que estabelecer um cultivo através de organismos doados de cultivos de outros laboratórios, impõe o risco de os mesmos apresentarem vícios e resistências relacionadas a esse longo tempo de cultivo. Ainda, como já foi mencionado anteriormente, as populações de uma mesma espécie podem variar quanto à sua sensibilidade em diferentes regiões, sendo talvez importante os pesquisadores também realizarem experimento e uma carta controle com organismos do ambiente de sua própria região, para entender melhor como o ambiente da região de interesse está respondendo a toxicidade de determinados contaminantes. Talvez para contornar este problema, e também o fato de que copépodos do ambiente apresentam uma variação sazonal na abundância (Crapp 1971), seria iniciar um cultivo e o manter no laboratório, ao mesmo tempo que uma vez por mês ou a cada dois meses, realizar uma coleta para adquirir *A. tonsa* do ambiente e agregá-las ao cultivo já existente no laboratório. Assim possibilitará o aumento da variabilidade genética do cultivo. Conseqüentemente o laboratório não

correrá o risco de não possuir *Acartia tonsa* no período desejado, e os copépodos deste cultivo poderão representar melhor o ambiente sem demonstrarem os vícios e resistências gerados por cultivos de longo período. Porém, deve-se realizar testes para a confirmação desse esforço de coletar os organismos uma vez por mês ou a cada dois meses.

Como foi verificado na literatura, existe também uma maior sensibilidade dos estágios iniciais do que adultos, logo avaliar essa diferença de sensibilidade entre os estágios de desenvolvimento de *Acartia tonsa* ao DSS, pode trazer respostas mais apuradas e reais sobre qual a concentração letal mínima que pode realmente afetar esta espécie, pois uma vez afetados os estágios iniciais, os organismos não chegarão à fase adulta impossibilitando a reprodução, afetando assim toda a teia alimentar do ambiente marinho.

A alimentação durante o bioensaio pode, também, ser um fator que colaborou para a não detecção da diferença na sensibilidade de parte dos experimentos, pois pode ser que através da aplicação do volume com a concentração de *Conticribra weissflogii*, ocorreu a amenização do efeito do DSS, já que houve uma pequena diluição do meio nesse procedimento. Além do experimento testando o efeito da alimentação nos bioensaios, a realização de um experimento avaliando o efeito da alimentação em conjunto com a renovação do meio pode trazer respostas mais satisfatórias e coerentes relacionadas a sensibilidade de *Acartia tonsa*.

Outras questões importantes, que também devem ser pesquisadas e levadas em consideração é sobre os resíduos que serão produzidos através destes testes, além do transporte e quantidade de meio das amostras

ambientais, porém sempre pensando nas questões fisiológicas e biológica do copépodo, para que o teste não perca sua qualidade.

Assim, devido as perguntas que surgiram através de trabalho e sabendo da importância dos bioensaios para a proteção dos ambientes estuarinos e marinhos, incentiva-se a continuidade dessa linha de pesquisa, em conjunto com um Laboratório de Toxicologia.

5. LITERATURA CITADA

- AGOSTINI, VO. 2014. Avaliação dos efeitos do uso de antimicrobianos em cultivos de plâncton marinho. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 124p.
- AGOSTINI, VO, AJ MACEDO & E MUXAGATA. 2016. Evaluation of antibiotics as a methodological procedure to inhibit free-living and biofilm bacteria in marine zooplankton culture. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 88: 733-746.
- ALAJMI, F, C ZENG & DR JERRY. 2015. Domestication as a novel approach for improving the cultivation of calanoid copepods: A case study with *Parvocalanus crassirostris*. *Plos One*, 10: e0133269. doi: 10.1371/journal.pone.0133269.
- ALLENDORF, FW & N RYMAN. 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: RYMAN, N & F UTTER (ed.). Population Genetics and Fishery Management. University of Washington Press, Seattle, Chap. 6: 141-159.
- ALMEDA, R, Z WAMBAUGH, Z WANG, C HYATT & Z LIU. 2013. Interactions between zooplankton and crude oil: Toxic effects and bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *PLoS One*, 8: e67212. doi: 10.1371/journal.pone.0067212.
- ANZECC. 2000. National water quality management strategy - Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. Canberra, The Australian and New Zealand environment Conservation Council. 314p.
- ARAKI, H, B COOPER & MS BLOUIN. 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science*, 318: 100-103.

- ARNOTT, GH & M AHSANULLAH. 1979. Acute toxicity of copper, cadmium and zinc to three species of marine copepod. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 30: 63-71.
- ASTM. 2004. Standard guide for conducting renewal microplate-based life-cycle toxicity tests with a marine meiobenthic copepod. West Conshohocken, American Society For Testing Materials International. 16p.
- AVERY, DE & HG DAM. 2007. Newly discovered reproductive phenotypes of a marine copepod reveal the costs and advantages of resistance to a toxic dinoflagellate. *Limnol. Oceanogr.*, 52: 2099-2108.
- AVERY, DE, KK ATLAND & HG DAM. 2008. Sex-related differential mortality of a marine copepod exposed to a toxic dinoflagellate. *Limnol. Oceanogr.*, 53: 2627-2635.
- AVILA, TR, JGF BERSANO & G FILMANN. 2010. Lethal and sub-lethal effects of the water-soluble fraction of a light crude oil on the planktonic copepod *Acartia tonsa*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 5: 19-25.
- BAETENS, J. 2014. Culturing *Acartia tonsa* Dana and acute testing with copper on different life cycle stages. Dissertação de Mestrado, Ghent University, Bélgica, 138 p.
- BÂMSTEDT, U, DJ GIFFORD, X IRIGOIEN, A ATKINSON & M ROMAN. 2000. Feeding. In: HARRIS, RP, PH WIEBE, J LENZ, HR SKJOLDAL & M HUNTLEY (ed.). ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, London, Chap. 8: 297-399.

- BARNES, H & FA STANBURY. 1948. The toxic action of copper and mercury salts both separatell and when mixed on the harpacticid copepod, *Nitocra Spinipes* (Boeck). *J. Exp. Biol.*, 25: 270-275.
- BARRETA, JW & JFP MALSCHAERT. 1988. Distribution and abundance of the zooplankton of the Ems estuary (North Sea) Neth. *J. Sea Res.*, 22: 69-81.
- BEAUGRAND, G, KM BRANDER, AJ LINDLEY, S SOUISSI & PC REID. 2003. Plankton effect on cod recruitment in the North Sea. *Nature*, 426: 661-664.
- BELLAS, J & P THOR. 2007. Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 16: 465-474.
- BENGTSSON, BO. 1978. Avoiding inbreeding: at what cost? *J. Theor. Biol.*, 73: 439-444.
- BJÖRNBERG, TKS. 1981. Copepods. In: BOLTOVSKOY, D (ed.). Atlas del Zooplankton del Atlántico Sudoccidental y Métodos de Trabajo con el Zooplankton Marino. INIDEP, Mar del Plata, Chap. 39: 587-679.
- BODAR, CW, A ZEE, PA VOOGT, H WYNNE & DI ZANDEE. 1989. Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 17: 333-338.
- BOLTOVSKOY, D. 1981. La malla. In: BOLTOVSKOY, D. (ed.). Atlas del Zooplankton del Atlántico Sudoccidental y Métodos de Trabajo con el Zooplankton Marino. INIDEP, Mar del Plata, Chap. 7: 71-79.
- BOOS, DD & LA STEFANSKI. 2011. P-Value precision and reproducibility. *Am. Stat.*, 65: 2013-221.

- BRADLEY, BP. 1978. Increase in range of temperature tolerance by acclimation in the copepod *Euryteinora affinis*. *Biol. Bull.*, 154: 177-187.
- BRON, JE, D FRISCH, E GOETZE, SC JOHNSON, CE LEE & GA WYNGAARD. 2011. Observing copepods through genomic lens. *Front. Zool.*, 8: 1-15.
- BUSHONG, S, M ZIEGENFUSS, M UNGER & L HALL. 1990. Chronic tributyltin toxicity experiment with the Chesapeake bay copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 359-366.
- BUTTINO, I, A IANORA, S BUONO, V VITIELLO, MG MALZONE, C RICO, A LANGELLOTTI, G SANSONE, L GENNARI & A MIRALTO. 2012. Experimental cultivation of the mediterranean calanoid copepod *Temora stylifera* and *Centropages typicus* in a pilot re-circulation system. *Aquaculture*, 43:247-259.
- CALBET, A, S GARRIDO, E SAIZ, M ALCARAZ & CM DUARTE. 2001. Annual zooplankton succession in coastal NW Mediterranean waters: the importance of the smaller size fractions. *J. Plankton. Res.*, 23: 319-331.
- CALLIARI, D, MCA BORG, P THOR, E GOROKHOVA & P TISELIUS. 2008. Instantaneous salinity reductions affect the survival and feeding rates of the co-occurring copepods *Acartia tonsa* Dana and *A. clausi* Giesbrecht differently. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 362: 18-25.
- CAMUS, T & C ZENG. 2009. The effects of stocking density on egg production and hatching success, cannibalism rate, sex ratio and population growth of the tropical calanoid copepod *Acartia sinjiensis*. *Aquaculture*, 287: 147-151.

- CARMAN, K & M TODARO. 1996. Influence of polycyclic aromatic hydrocarbons on the meiobenthic-copepod community of a Louisiana salt marsh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 198: 37-54.
- CASSIANO, EJ. 2009. Evaluation of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus* as a first feed for florida pompano, *Trachinotus carolinus*, larvae. Dissertação de Mestrado, University of Florida, Estados Unidos, 96p.
- CERVETTO, G. 1987. Fluctuaciones del zooplankton del Arroyo Solís Grande: Uruguay (16 al 30/11/82). Tese de Licenciatura, Universidad de la República, Uruguay, 154p.
- CERVETTO, G, R GAUDY & M PAGANO. 1999. Influence of salinity on the distribution of *Acartia tonsa* (copepoda, calanoida). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 239: 33-45.
- CHECKLEY, DM. 1980. The egg production of a marine planktonic copepod in relation to its food supply: laboratory studies. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 430-446.
- CHINNERY, FE & JA WILLIAMS. 2004. The influence of temperature and salinity on *Acartia* (copepoda: calanoida) nauplii survival. *Mar. Biol.*, 145: 733-738.
- CHOW-FRASER, P. 1986. Effect of collection and acclimation period on grazing rates of limnetic zooplankton. *Hydrobiologia*, 137: 203 -210.
- COLIN, SP & HG DAM. 2003. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* on the copepod *Acartia hudsonica*: A test of the mechanisms that reduce ingestion rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 248: 55-65.

- CONOVER, RJ & ES CORNER. 1968. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 48: 49-75.
- COSTA, RC, P OLIVI, CMR BOTTA & ELG ESPINDOLA. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, 7: 1820-1830.
- CRAPP, GB. 1971. Laboratory experiments with emulsifiers. In: COWELL, EB (ed.). *The Ecological Effects of Oil Pollution on Littoral Communities*. Applied Science Publishers, London, Chap. 11:129:149.
- DAGG, M. 1977. Some effects of patchy food environments in copepods. *Limnol. Oceanogr.*, 22: 99-107.
- DEVREKER, D, S SOUISSI & L SEURONT. 2004. Development and mortality of the first naupliar stages of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) under different conditions of salinity and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 303: 31-46.
- DINNO, A. 2016. *Dunn.test*: Dunn's test for multiple comparisons using rank sums. R package version 1.3.2. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>. Acesso em: 23/02/2017.
- DI PINTO, L, B COULL & T CHANDLER. 1993. Lethal and sublethal effects of the sediment-associated PCB aroclor 1254 on a meiobenthic copepod. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1909-1918.
- DI TORO, DM, CS ZARBA, DJ HANSEN, WJ BERRY, RC SWARTZ, CE COWAN, SP PAVLOU, HE ALLEN, NA THOMAS & PR PAQUIN. 1991.

- Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1541-1583.
- DI TORO, DM, HE ALLEN, HL BERGMAN, JS MEYER, PR PAQUIN & RC SANTORE. 2001 Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 2383-2396.
- DOYLE, RW. 1983. An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture. *Aquaculture*, 33: 167-85.
- DUR, G, S SOUISSI, F SCHMITT, FG MICHALEC, MS MAHJOUB & JS HAWANG. 2011. Effects of animal density, volume, and the use of 2D/3D recording on behavioural studies of copepods. *Hydrobiologia*, 666: 197-214.
- DURBIN, EG, MC CASAS & TA RYNEARSON. 2012. Copepod feeding and digestion rates using prey DNA and qPCR. *J. Plankton Res.*, 34: 72-82.
- DUSSART, BH & D DEFAYE. 1995. Copepoda: Introduction to the copepoda. Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world. Amsterdam, SPB Academic Publishing. 277p.
- EKNATH, AE & RW DOYLE. 1985. Indirect selection for growth and life-history traits in Indian carp aquaculture: I. Effects of broodstock management. *Aquaculture*, 49: 73-84.
- ENVIRONMENT AGENCY. 2007. Proposed EQS for water framework directive annex VIII substances: diazinon. Bristol, U.K. Environment Agency. 72p.

- ENVIRONMENT CANADA. 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Ottawa, Environment Canada. 85p.
- EPA. 1976. Acute toxicity of certain pesticides to *Acartia tonsa* Dana. U.S. Rhode Island, Environmental protection agency. 29p.
- EPA. 2009. Mysid (*Americamysis bahia*) survival, growth, and fecundity toxicity tests supplement to training video. Washington, U.S. Environmental protection agency. 14p.
- ERICKSON, RJ, LT BROOKE, MD KAHL, FV VENTER, SL HARTING, TP MARKEE & RL SPEHAR. 1998. Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 572-578.
- FAVARETO, LR, G PERBICHE-NEVES, M SERAFIM-JÚNIOR & LP SARTORI. 2009. Selectivity of plankton nets over planktonic copepoda in two subtropical estuaries. *Acta Limnol. Bras.*, 21: 67-77.
- FINIGUERRA, MB, HG DAM, DE AVERY & Z BURRIS. 2013. Sex-specific tolerance to starvation in the copepod *Acartia tonsa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 446: 17-21.
- FRANKHAM, R. 2005. Stress and adaptation in conservation genetics. *J. Evol. Biol.*, 18: 750-755.
- FROST, BW. 1975. A threshold of feeding behavior in *Calanus pacificus*. *Limnol. Oceanogr.*, 20: 263-266.

- GERGS, A, TG PREUSS & A PALMQVIST. 2014. Double trouble at high density: Cross-level test of resource-related adaptive plasticity and crowding-related fitness. *Plos One*, 9: e91503. doi: 10.1371/journal.pone.0091503.
- GIBBONS, SG. 1939. The Hensen net. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 14: 242-248.
- GIDDINGS, JM, LWJR HALL & KR SOLOMON. 2000. Ecological risks of diazinon from agricultural use in the sacramento- San Joaquin river basins, California. *Risk Anal.*, 20: 545-572.
- GIRLING, AE. 1989. Acute and chronic toxicity of produced water from a North Sea oil production platform to the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 280-286.
- GONZÁLEZ, JG. 1974. Critical thermal maxima and upper lethal temperature for the calanoid copepods *Acartia tonsa* and *A. clausi*. *Mar. Biol.*, 27:219-223.
- GORBI, G, M INVIDIA, FS AVORELLI, O FARAPONOVA, E GIACCO, M CIGAR, I BUTTINO, T LEONI, E PRATO, I LACCHETTI & S SEI. 2012. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31: 2023-2028.
- GUILLARD, RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate animals. In: SMITH, WL & MH CHANLEY (ed.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, Chap. 3: 29-60.
- HAAS, JMS, JMS MANRO, H SHANNON, W ANDERSON, J BROZINICK, A CHAKRAVARTTY, M CHAMBERS, J DU, B EASTWOOD, J HEUER, S ITURRIA, P IVERSEN, D JOHNSON, K JOHNSON, M O'NEIL, H-R QIAN, D SINDELAR & K SVENSSON. 2012. Vivo assay guidelines. In:

SITTAMPALAM, GS, NP COUSSENS, KMS BRIMACOMBE, A GROSSMAN, M ARKIN, D AULD, C AUSTIN, B BEJCEK, M GLICKSMAN, J INGLESE, PW IVERSEN, Z LI, J MCGEE, O MCMANUS, L MINOR, A NAPPER, JM PELTIER, T RISS, OJJR TRASK & J WEIDNER (ed.). Assay Guidance Manual [Internet]. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92013/pdf/Bookshelf_NBK92013.pdf. 48p.

HALL, LW & RD ANDERSON. 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25: 281-346.

HANSEN, BH, D ALTIN, K BONAUNET & IB ØVERJORDET. 2014. Acute toxicity of eight oil spill response chemicals to temperate, boreal, and arctic species. *J. Toxicol. Env. Health*, 77: 495-505.

HARRIS, RP. 1973. Feeding, growth, reproduction and nitrogen utilization by the harpacticoid copepod, *Tigriopus brevicornis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 53: 785-800.

HERON, AC. 1968. Plankton Gauze. In: TRANTER, DJ (ed.). Zooplankton Sampling. UNESCO, Paris, Chap. 2: 77-86.

HOANG, TC & SJ KLAINE. 2007. Influence of organism age on metal toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26: 1198-1204.

HOLLISTER, TA, GS WARD & PR PARRISH. 1980. Acute toxicity of No. 6 fuel oil to marine organisms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24: 656-661.

- HURLBERT, SH. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol. Monogr.*, 54: 187-211.
- HUTCHINSON, TH, J SOLBE & P KLOEPPER-SAMS. 1998. Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (eat) database, III: comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*, 36: 12-142.
- HOTHORN, T, F BRETZ & P WESTFALL. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.*, 3: 346-363.
- HUYS, R & GA BOXSHALL. 1991. Copepod evolution. London, The Ray Society. 468p.
- IHARA, PM. 2008. Aplicação de ensaios ecotoxicológicos com diferentes organismos-teste na determinação da toxicidade da água produzida. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 82p.
- IHARA, PM, GLL PINHO & G FILLMANN. 2010. Avaliação do copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 5: 27-32.
- ISMAR, MH, T HANSEN & U SOOMER. 2008. Effect of food concentration and type of diet on *Acartia* survival and naupliar development. *Mar. Biol.*, 154: 335-343.
- ISO 14669. 1999. Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (copepoda, crustacea). Geneva, International Organization for Standardization. 16p.

- ISO 16778. 2013. Water quality – Calanoid copepod development test with *Acartia tonsa*. Geneva, International Organization for Standardization. 45p.
- JEPSEN, PM, N ANDERSEN, T HOLM, AT JØRGENSEN, JK HØJGAARD, JK & B HANSEN. 2007. Effects of adult stocking density on egg production and viability in cultures of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana). *Aquac. Res.*, 38: 764-772.
- JOBLING, M. 1981. The influence of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. *J. Fish. Biol.*, 18: 385-400.
- KAHAN, D, Y BERMAN & T BAR-EL. 1988. Maternal, inhibition of hatching at high population densities in *Tigriopus japonicus* (copepoda, crustácea). *Biol. Bull.*, 174: 764-772.
- KAMINSKI, SM. 2004. Influência da alimentação sobre a reprodução e o desenvolvimento do copépode calanoida *Acartia tonsa* Dana 1849, em cultivo intensivo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 52p.
- KAMINSKI, SM. 2009. Mesozooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos e zona costeira adjacente com ênfase para os copépodos *Acartia tonsa*, *Pseudodiaptomus richardi* e *Notodiaptomus incompositus* (2000-2005). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 139p.
- KELLY, MW, E SANFORD & RK GROSBERG. 2012. Limited potential for adaptation to climate change in a broadly distributed marine crustacean. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 279: 349-356.

- KIMBALL, KD & SA LEVIN. 1985. Limitations of laboratory bioassays: The need for ecosystem-level testing. *Bioscience*, 35: 165-71.
- KIØRBOE, T, F MØHLENBERG & K HAMBURGER. 1985. Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26: 85-97.
- KIØRBOE, T. 2006. Sex, sex ratios, and the dynamics of pelagic copepod populations. *Oecologia*, 148:40-50.
- KIØRBOE, T. 2007. Mate finding, mating, and population dynamics in a planktonic copepod *Oithona davisae*: There are too few males. *Limnol. Oceanogr.*, 52: 1511-1522.
- KIØRBOE, T. 2009. A mechanistic approach to plankton ecology. *J. Plankton Res.*, 31: 927-928.
- KLERKS, PL.1987. Adaptation to metals in benthic macrofaunal. Tese de Doutorado, State University of New York, Estados Unidos, 143p.
- KUSK, KO & S PETERSEN. 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:1629-1633.
- KWOK, KWH, KMY LEUNG, VWW BAO & JS LEE. 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Mar. Pollut. Bull.*, 57: 632-636.

- LACY, RC. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conserv. Biol.*, 1: 143-158.
- LANCE, J. 1963. The salinity tolerance of some estuarine planktonic copepods. *Limnol. Oceanogr.*, 8: 440-449.
- LANCE, J. 1965. Respiration and osmotic behaviour of the copepod *Acartia tonsa* in diluted sea water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 14: 155-165.
- LANDRY, MR. 1983. The development of marine calanoid copepods with comment on the isochronal rule. *Limnol. Oceanogr.*, 29: 614-624.
- LANNO, RP, BE HICKIE & DG DIXON. 1989. Feeding and nutritional considerations in aquatic toxicology. *Hydrobiologia*, 188: 525-531.
- LANZKY, PF & B HALLING-SØRENSEN. 1997. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere*, 35: 2553-2561.
- LASSUS, P, CL BAUT, LL DEAN, M BARDOUIL, P TRUQUET & G BOCQUENÉ. 1984. The use of harpacticoid copepods for testing the effects of chemicals on larval production. *Inst. Mar. Scient. Res.*, 2: 131-142.
- LATIMER, DL, AS BROOK & AM BEETON. 1975. Toxicity of 30-minute exposures of residual chlorine to the copepods *Limnocalanus macrurus* and *Cyclops bicuspidatus thomasi*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32: 2495-2501.
- LAUER, MM & A BIANCHINI. 2010. Chronic copper toxicity in the estuarine copepod *Acartia tonsa* at different salinities. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29: 2297-2303.

- LAZZARETTO, I, B SALVATO & A LIBERTINI. 1990. Evidence for chemical signaling in *Tigriopus fulvus* (copepod: harpacticoida). *Crustaceana*, 59: 171-179.
- LEANDRO, SM, P TISELIUS & H QUEIROGA. 2006. Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Mar. Biol.*, 150: 121-129.
- LEE, WY. 1977. Some laboratory cultured crustaceans for marine pollution studies. *Mar. Pollut. Bull.*, 8: 258-259.
- LEE, WY & BJ MCALICE. 1979. Sampling variability of marine zooplankton in a tidal estuary. *Estuar. Coast. Shelf S.*, 8: 565-582.
- LEE, KW & HG PARK. 2005. Optimum culture density for the intensive mass production in cyclopoid copepod, *Paracyclops nana*. *J. Aquacult.*, 18: 19-25.
- LEE, KW, JS RHEE, J HAN, HG PARK & JS LEE. 2012. Effect of culture density and antioxidants on naupliar production and gene expression of the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana*. *Comp. Biochem. Phys. A Mol. Integr. Physiol.*, 161: 145-152.
- LENTH, RV. 2016. Least-squares means: The r package lsmeans. *J. Stat. Softw.*, 69: 1-33.
- LEVIN, SA & KD KIMBALL. 1984. New perspectives in ecotoxicology. *Environ. Manage.*, 8: 375-452.

- LOPES, LFP. 2014. Aplicação de antimicrobianos no cultivo de *Acartia tonsa* (copepoda: calanoida): uma ferramenta para inibição de bactérias e fungos. Monografia de Graduação, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 26p.
- LUGO, A, LA BRAVO-INCLÁN, J ALCOCER, ML GAYTÁN, MG OLIVA, MR SÁNCHEZ & G VILACLARA. 1998. Effect on the planktonic community of the chemical program used to control water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Guadalupe Dam, Mexico. *Aquat. Ecosyst. Health and Manag.*, 1: 333-343, 1998.
- LUOMA, SN, DJ CAIN, K HO & A HUTCHINSON. 1983. Variable tolerance to copper in two species from San Francisco Bay. *Mar. environ. Res.*, 10: 209-222.
- MAGALHÃES, A, NR LEITE, JGS SILVA, LCC PEREIRA & RM COSTA. 2009. Seasonal variation in the copepod community structure from a tropical Amazon estuary, Northern Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 81: 187-197.
- MALLIN, MA. 1991. Zooplankton abundance and community structure in a mesohaline North Carolina estuary. *Estuaries*, 14: 481-488.
- MARCUS, NH. 1996. Ecological and evolutionary significance of resting eggs in marine copepods: past, present, and future studies. *Hydrobiologia*, 320: 141-152.
- MARCUS, NH. & JA WILCOX. 2007. A Guide to the meso-scale production of the copepod *Acartia tonsa* (manual). Florida, Florida State University. 29p.

- MARQUES, SC, UM AZEITEIRO, JC MARQUES, JM NET & MA PARDAL. 2006. Zooplankton and ichthyoplankton communities in a temperate estuary: spatial and temporal patterns. *J. Plankton Res.*, 28: 297-312.
- MARRARI, M, MD VIÑAS, P MARTOS & D HERNÁNDES. 2004. Spatial patterns of mesozooplankton distribution in the Southwestern Atlantic Ocean (34-41°S) during austral spring: relationship with the hydrographic conditions. *ICES J. Mar. Sci.*, 61: 667-679.
- MARSHALL, SM & AP ORR. 1955. *Calanus finmarchicus* food uptake, assimilation and excretion in adult copepods. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 34: 495-529.
- MAUCLINE, J. 1998. The biology of calanoid copepods: Advances in marine biology. London, Academic Press. 710p.
- MAYZAUD, P, V TIRELLI, JM BERNARD & O ROCHE-MAYZAUD. 1998. The influence of food quality on the nutritional acclimation of the copepod *Acartia clausi*. *J. Mar. Syst.*, 15: 483-493.
- MEDINA, M, C BARATA, T TELFER & DJ BAIRD. 2002. Age and sex related variation in sensitivity to the pyrenoid cypermetrin in the marine copepod *Acartia tonsa* Dana. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 17-22.
- MEDINA, M & C BARATA. 2004. Static-renewal culture of *Acartia tonsa*. (copepod: calanoida) for ecotoxicological testing. *Aquaculture*, 229: 203-213.
- MENCONI, M & C COX. 1994. Pesticide investigations unit, administrative report-94-2- Hazard assessment of the insecticide diazinon to aquatic organisms in the Sacramento-San Joaquin River system. Cordova, Department Environmental Services Division. 57p.

- MIRALTO, A, A IANORA, SA POULET, G ROMANO & M LAABIR. 1996. Is fecundity modified by crowding in the copepod *Centropages typicus*? *J. Plankton Res.*, 18: 1033-1040.
- MITTON, JB. 1997. Natural selection fitness determination and molecular variation. In: MITTON, JB (ed.). Selection in Natural Populations. Oxford University Press, Oxford, Chap. 1: 3-13.
- MOHAMMED, A, T HALFHIDE & N ELIAS-SAMLALSINGH. 2009. Comparative sensitivity of six toxicants of two life stages of the tropical mysid, *Metamysidopsis insularis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 97: 1331-1337.
- MONTÚ, M & IM GLOEDEN. 1986. Atlas dos cladocera e copepoda (crustacea) do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, Brasil). *Nerítica*, 1: 1-134.
- MUXAGATA, E, WJA AMARAL, & CN BARBOSA. 2012. *Acartia tonsa* production in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *ICES J. Mar. Sci.*, 69: 475-482.
- NICHOLS, JH & AB THOMPSON. 1991. Mesh selection of copepodite and nauplius stages of four calanoid copepod species. *J. Plankton Res.*, 13: 661-671.
- NIPPER, MG, C BADARÓ-PEDROSO, VF JOSÉ & SLR MELO. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil mysids and copepods. *B. Environ. Contam. Tox.*, 51: 99-106.
- NOSKOV, YA. 2011. Comparative sensitivity of the several zooplankton species (cladocera, copepoda) to sumicidine-alpha insecticide. *Contemp. Probl. Ecol.*, 4: 373-378.

- NOWAK, C, C VOGT, JB DIOGO & K SCHWENK. 2007. Genetic impoverishment in laboratory cultures of the test organism *Chironomus riparius*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26: 1018-1022.
- O'BRIEN, P, H FELDMAN, EV GRILL & AG LEWIS. 1988. Copper tolerance of the life history stages of the splashpool copepod *Trigriopus californicus* (copepoda, harpacticoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 44:59-54.
- OECD. 2006. Summary of considerations in the report from the OECD expert groups on short term and long term toxicology. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9740001e.pdf?expires=1477397538&id=id&accname=guest&checksum=850B4AE2C5CB947DB3759E8E864CFF0A>. Acesso :25/10/2016.
- OECD. 2007. Validation report of the full life-cycle test with the harpacticoid copepods *Nitocra Spinipes* and *Amphiascus Tenuiremis* and the calanoid copepod *Acartia Tonsa*-Phase 1. Brussels, Organization for Economic Cooperation and Development. 102p.
- OGLE, S. 2005. Diazinon in San Francisco Bay: Conceptual model/impairment assessment. San Francisco, Clean Estuary Partnership. 40p.
- OHS, CL, KL CHANG, SW GRABE, MA DIMAGGIO & E STENN. 2010. Evaluation of dietary microalgae for culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus pelagicus*. *Aquaculture*, 307: 225-232.
- OMORI, M & T IKEDA. 1984. Sampling. In: OMORI, M & T IKEDA (ed.). *Methods in Marine Zooplankton Ecology*. John Wiley & Sons, New York, Chap. 2: 20-48.

- OSPAR. 2006. Protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore oil industry. Disponível em: <http://www.ospar.org/documents?d=6996>. Acesso em: 28/01/2017.
- PANE, L, C AGRONE, E GIACCO, A SOMÀ & MG LUIGI. 2012. Utilization of marine crustaceans as study models: A new approach in marine ecotoxicology for european (REACH) regulation. In: BEGUM, G (ed.). Ecotoxicology. InTech, Rijeka, Chap. 5: 91-106.
- PARRISH, K & D WILSON. 1978. Fecundity studies on *Acartia tonsa* (copepoda: calanoida) in standardized culture. *Mar. Biol.*, 46: 65-81.
- PECK, MA & L HOLSTE. 2006. Effects of salinity, photoperiod and adult stocking density on egg production and egg hatching success in *Acartia tonsa* (calanoida: copepoda): Optimizing intensive cultures. *Aquaculture*, 255: 341-350.
- PEDROSO, MS, GLL PINHO, SC RODRIGUES & A BIANCHNI. 2007. Mechanism of acute silver toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*. *Aquatic. Toxicol.*, 87: 173-180.
- PHAM, TD. 2014. Particle characterization and influence on the nauplii and egg production of calanoid copepod (*Acartia tonsa* Dana) in water treatment systems with and without membrane filtration. Dissertação de Mestrado, Norwegian University of Science and Technology, Noruega, 62p.
- POHLERT, T. 2014. The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=PMCM>. Acesso em: 23/02/2017.

- RAISUDDIN, S, KWH KWOK, KM LEUNG, D SCHLENK & JS LEE. 2007. The copepod *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.*, 83: 161-173.
- RAMDORF, WA. 2007. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* sp B e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 109p.
- RAND, GM. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. New York, Hemisphere Publishing Corporation. 1125p.
- RAYMONT, JEG. 1983. Plankton and productivity in the oceans. Oxford, Pergamon Press. 824p.
- R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 15/11/2016.
- REGALLA, JRC. 2001. Impacto sobre o zooplâncton na enseada do saco dos Limões. *Atlântica*, 23: 5-16.
- REGALLA, JRC & KS LAITANO. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Técn. FACIMAR*, 6: 153-163.
- RIGLER, FH & JA DOWNING. 1984. The calculation of secondary productivity. In: DOWNING, JA & FH RIGLER (ed.). A Manual on Methods for the

Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters. Blackwell Scientific, Oxford, Chap. 2: 19-58.

RODDIE, BD, RJG LEAKEY & AJ BERRY. 1984. Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (poppe) (copepoda: calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the Forth estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 77: 191-211.

RUNGE, JA & JC ROFF. 2000. The measurement of growth and reproductive rates. In: HARRIS, RP, PH WIEBE, J LENZ, HR SKJOLDAL & M HUNTLEY (ed.). ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, London, Chap. 9: 401-454.

RUPPERT, EE, RS FOX & RD BARNES. 2005. Zoologia dos invertebrados. São Paulo, Editora Roca. 1145p.

RYAN, JÁ. 2012. Corning guide for identifying and correcting common cell growth problems. *Technical Bulletin of Corning Incorporated Life Science*. 12p.

SABATINI, ME. 1990. The developmental stages (copepodids I to VI) of *Acartia tonsa* Dana, 1849 (copepoda calanoida). *Crustaceana*, 59: 53-61.

SADIQ, M. 1989. Nickel sorption and speciation in a marine environment. *Hydrobiologia*, 176/177: 225-232.

SAMEOTO, D, P WIEBE, J RUNGE, L POSTEL, J DUNN, C MILLER & S COOMBS. 2000. Collection Zooplankton. In: HARRIS, R, P WIEBE, J LENZ, HR SKJOLDAL & M HUNTELEY (ed.). ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, London, Chap. 3: 55-81.

- SANTOS, FM. 2005. Efeito da densidade de estocagem no cultivo do copépode *Acartia tonsa* e avaliação do seu potencial como alimento vivo na larvicultura do robalo-peva *Centropomus parallelus*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 54 p.
- SHAHIDUL, IM & M TANAKA. 2007. Effects of freshwater flow on environmental factors and copepod density in the Chikugo estuary, Japan. *Estuar. Coast. Shelf. S.*, 47: 579-584.
- SIBLY, RM, TD WILLIAMS & MB JONES. 2000. How environmental stress affects density dependence and carrying capacity in a marine copepod. *J. Appl. Ecol.*, 37: 388-397.
- SKJOLDAL, HR, PH WIEBE, L POSTEL, T KNUTESSEN, S KAARTVEDT & D SAMEOTO. 2013. Intercomparison of zooplankton (net) sampling systems: Results from the ICES/GLOBEC sea-going workshop. *Prog. Oceanogr.*, 108: 1-42.
- SMITH, PE, RC COUNTS & I CLUTTER. 1968. Changes in filtering efficiency of plankton nets due to clogging under tow. *J. Cons. Explor. Mer.*, 32: 232-248.
- SOSNOWSKI, SL & JH GENTILE. 1978. Toxicological comparison of natural and cultured population of *Acartia tonsa* to cadmium, copper and mercury. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 1366-1369.
- SOSNOWSKI, SL, DJ GERMOND & JH GENTILE. 1979. The effect of nutrition on the response of field populations of the calanoid copepod *Acartia tonsa* to copper. *Wat. Res.*, 13: 449-452.

- SOUISSI, S, F CARLOTTI & P NIVAL. 1997. Food and temperature-dependent function of moulting rate in copepods: an example of parameterization for population dynamics models. *J. Plankton Res.*, 19: 1331-1346.
- SPRAGUE, J. 1995. Factors that modify toxicity. In: RAND, GM & SR PETROCELLI (ed.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corp, Washington, Chap. 6: 124-163.
- STRINGER, TJ. 2012. Development of bioassay approaches to evaluate the impacts of pollution on New Zealand estuaries using the marine copepod *Quinquelaophonte sp.* Tese de doutorado, Universidade de Canterbury, Nova Zelândia, 222 p.
- STRØTTRUP, JG, K RICHARDSON, E KIRKEGAARD & NJ PIHL. 1986. The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, 52: 87-96.
- SUN, PY, HB FOLEY, VWW BAO, KMY LEUNG & S EDMANDS. 2015. Variation in tolerance to common marine pollutants among different populations in two species of the marine copepod *Tigriopus*. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 22: 16143-16152.
- TAYLOR, MT. 1985. Effect of diet on the sensitivity of *Daphnia magna* to linear alkylbenzene sulfonate. In: CARDWELL, RD, R PURDY & RC BAHNER (ed.). *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium*. ASTM American Society for Testing and Materials STP 854. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Chap. 5: 53-72.

- TEIXEIRA, PF, SM KAMINSKI, TR ÁVILA, AP CARDOZO, JGF BERSANO & A BIANCHINI. 2010. Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896). *An. Acad. Bras. Ciên.*, 82: 333-339.
- TEIXEIRA-AMARAL, PF, WJA AMARAL, DO ORTIZ, VO AGOSTINI & E MUXAGATA. 2017. The mesozooplankton of the Patos Lagoon Estuary, Brazil: trends in community structure and secondary production. *Mar. Biol. Res.*, 13: 48-61.
- TISELIUS, P, B HANSEN, P JONSSON, T KIØRBOE, TG NIELSEN, S PIONTKOVSKI & E SAIZ. 1995. Can we use laboratory-reared copepods for experiments? A comparison of feeding behaviour and reproduction between a field and a laboratory population of *Acartia tonsa*. *ICES J. Mar. Sci.*, 52: 369-376.
- TOUDAL, K & HU RIISGÁRD. 1987. Acute and sublethal effects of cadmium on ingestion, egg production and life-cycle development in the copepod *Acartia tonsa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 37: 141-146.
- TRANTER, DJ & PE SMITH. 1968. Filtration performance. In: TRANTER, DJ (ed.). *Zooplankton Sampling*. UNESCO, Paris, Chap. 3: 77- 86.
- UNESCO. 1968. *Zooplankton Sampling*. Paris, UNESCO. 174p.
- UYE, S, Y IWAI & K KASAHARA. 1983. Growth and production of the inshore marine copepod *Pseudodiaptomus marinus* in the central part of the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, 73:91-98.

- VAN DAM, RA, AJ HARFORD, MA HOUSTON, AC HOGAN & AP NEGRI. 2008. Tropical marine toxicity testing in Australia: a review and recommendations. *Aust. J. Ecotoxicol.*, 14: 55-88.
- VANNUCCI, M. 1968. Loss of organisms through the messes. In: TRANTER, DJ (ed.). Zooplankton Sampling. UNESCO, Paris, Chap. 5: 77-86.
- WALKER, I. 1979. Mechanisms of density-dependent population regulation in the marine copepod *Amphiascoides sp* (harpacticoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1: 209-221.
- WARD, GS & L BALLANTINE. 1985. Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna. *Estuaries*, 8: 22-37.
- WARD, GS. 1995. Saltwater test. In: RAND, G (ed.). Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. Taylor & Francis, Washington, Chap. 3: 103-133.
- WEIDEBORG, M, T KÄLLQVIST, KE ØDEGARD, LE SVERDRUP & EA VIK. 2001. Environmental risk assessment of acrylamide and methylolacrylamide from a grouting agent used in the tunnel construction of Romeriksporten. *Wat. Res.*, 35: 2645-2652.
- WENDT, I, T BACKHAUS, H BLANCK & A ARRHENIUS. 2016. The toxicity of the three antifouling biocides DCOIT, TPBP and medetomidine to the marine pelagic copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 25: 871-879.
- WHALE, FG & N BATTERSBY. 2005. Case study: whole-effluent assessment using a combined biodegradation and toxicity approach. In: THOMPSON,

- KC, K WADHIA & AP LOIBNER (ed.). Environmental Toxicity Testing. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Chap.10: 310-336.
- WHITE, HH & MA CHAMP. 1983. The great bioassay hoax, and alternatives. In: CONWAY, RA & WP GULLEDGE (ed.). Hazardous and Industrial Solid Waste Testing: Second Symposium American Society for Testing and Materials STP 805. American Society for Testing and Materials, Baltimore, Chap. 6: 299-312.
- WIBORG, KF. 1948. Experiments with the clarke-bumpus plankton sampler and with a plankton pump in the lofoten area in Norway. *Fiskeridir. Skr. Ser. Havunders.*, 2: 1-32.
- WICKHAM, H. 2016. readxl: Read Excel Files. R package version 0.1.1. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>. Acesso em: 30/11/2016.
- WILLIS, KJ & N LING. 2003. The toxicity of emamectin benzoate, an aquaculture pesticide, to planktonic marine copepods. *Aquaculture*, 221: 289-297.
- WOLLENBERGER, L, M BREITHOLTZ, KO KUSK & B-E BENGTSSON. 2003. Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Sci. Total Environ.*, 305: 53-64.
- ZAGATTO, PA & E BERTOLETTI. 2008. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos, RIMA. 478p.
- ZHANG, Q & G UHLIG. 1993. Effect of density on larval development and female productivity of *Tisbe holothuriae* (copepoda, harpacticoida) under laboratory conditions. *Helgolander Meeresun.*, 47: 229-241.

ZHOU, C, V VITIELLO, D PELLIGRINI, C WU, E MORELLI & I BUTTINO. 2015.
Toxicological effects of CdSe/ZnS quantum dots on marine planktonic
organisms. *Ecotox. Environ. Safe.*, 123: 26-31.

APÊNDICES

Apêndice I: Scprit do programa R versão 3.3.1 (2016) (R CORE TEAM 2016), para o modelo linear generalizado (GLM) do experimento da avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede com organismos fixados.

```

library(readxl)
read_excel("Experimento_redemorto.xlsx")
glm= read_excel("Experimento_redemorto.xlsx")
##Análise exploratória dos dados
glm$MR <- factor(glm$MR)
glm$EST <- factor(glm$Esta)
glm$RET <- glm$Ret
par(mfrow=c(2,2))
boxplot(glm$RET~glm$MR, col="bisque")
hist(glm$Ret, col="bisque")
qqnorm(glm$Ret)
qqline(glm$Ret)
par(mfrow=c(1,1))
glm$MR=factor(glm$MR,levels=c('180','330','500'))
boxplot(glm$Ret~glm$Esta, col="bisque")
hist(glm$Ret, col="bisque")
qqnorm(glm$Ret)
qqline(glm$Ret)
#####ANOVA
anova_GLM1 <- anova(GLM1, test="Chisq")
anova_GLM1
plot(GLM1)
library(multcomp)
summary(glht(GLM1, linfct=mcp(MR="Tukey")))
summary(glht(GLM1, linfct=mcp(EST="Tukey")))
###função anti-logit ( para calcula a probabilidade de retenção)
alogit<- function(x)
{p<- 1/(1+exp(-x))
p}
#####GLM binomial with interactions
GLM2 <- glm(formula=cbind(RET+1, c(51-RET)) ~ MR+EST+MR*EST, family =
binomial(link="logit"), data=glm)
summary(GLM2)
ctable <- coef(summary(GLM2))
write.csv(round(ctable, 3),"GLM2.csv")
#####ANOVA
anova_GLM2 <- anova(GLM2, test="Chisq")
anova_GLM2
plot(GLM2)
summary(glht(GLM2, linfct=mcp(MR="Tukey")))
summary(glht(GLM2, linfct=mcp(EST="Tukey")))
library(lsmmeans)
GLM2list= pairs(lsmmeans(GLM2, ~ MR|EST))
GLM2list2= pairs(lsmmeans(GLM2,~ EST|MR))
rbind(GLM2list, GLM2list2)
### ou
test(rbind(GLM2list, GLM2list2), adjust= "tukey")

```

Apêndice II: Scprit do programa R versão 3.3.1 (2016) (R CORE TEAM 2016), para o modelo linear generalizado (GLM) do experimento o qual avaliou se o volume das unidade experimentais afeta a sobrevivência de *Acartia tonsa*.

```

library(readxl)
read_excel("Experimento_densidade.xlsx")
###24horas
Densidade=read_excel("Experimento_densidade.xlsx", sheet = 1)
summary(Densidade)
Densidade$Tratamento= factor(Densidade$Trat)
Densidade$Sobre<-Densidade$Sobrev
Densidade$Tratamento=factor(Densidade$Tratamento,levels=c("T5","T10","T20"))
par(mfrow=c(1,2))
hist(Sobre)
boxplot(Sobre)
qqplot(Tratamento,Sobre)
Densidade1= Densidade[Densidade$Temp=='24h',]
GLM1<- glm(cbind(Sobre+1, c(6-Sobre)) ~ Tratamento, family = binomial(link="logit"),
data = Densidade1)
summary(GLM1)
#####ANOVA
anova_GLM1 <- anova(GLM1, test="Chisq")
anova_GLM1
plot(GLM1)
library(multcomp)
summary(glht(GLM1, linfct=mcp(Tratamento="Tukey"))))
#####48h
Densidade2= Densidade[Densidade$Temp=='48h',]
GLM2<- glm(cbind(Sobre+1, c(6-Sobre)) ~ Tratamento, family = binomial(link="logit"),
data = Densidade2)
summary(GLM2)
#####ANOVA
anova_GLM2 <- anova(GLM2, test="Chisq")
anova_GLM2
plot(GLM2)
library(multcomp)
summary(glht(GLM2, linfct=mcp(Tratamento="Tukey"))))
#####72h
Densidade3=Densidade[Densidade$Temp=='72h',]
GLM3<- glm(cbind(Sobre+1, c(6-Sobre)) ~ Tratamento, family = binomial(link="logit"),
data = Densidade3)
summary(GLM3)
#####ANOVA
anova_GLM3 <- anova(GLM3, test="Chisq")
anova_GLM3
plot(GLM3)
library(multcomp)
summary(glht(GLM3, linfct=mcp(Tratamento="Tukey"))))

```

Apêndice III: Scprit do programa R versão 3.3.1 (2016) (R CORE TEAM 2016) para avaliar o volume mínimo necessário nas unidades experimentais. Os dados obtidos dos parâmetros físico-químicos foram analisados utilizando o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*.

```

library(readxl)
evapo=read_excel("Evapora.xlsx", sheet = 2)
###Análise exploratória dos dados
evapo$Tratamento= factor(evapo$Trat)
evapo$pH= as.numeric(evapo$ph)
evapo$Sali= as.numeric(evapo$Sal)
evapo$Temper= evapo$temp
evapo$Eva= evapo$Evap
evapo$EvaPer= evapo$evaper
evapo$Tempo= factor(evapo$TEMPO)
evapo$Trat
evapo$Trat=factor(evapo$Trat,levels=c("t5a","t10a","t20a","t5f","t10f","t20f"))
trata=evapo$trata=evapo$Trat
#####para analise de Kruskal wallis
library(readxl)
read_excel("Evapora.xlsx", sheet = 3)
evapo2 = read_excel("Evapora.xlsx", sheet = 3)
evapo2$Tratamento2= as.factor(evapo2$Trat)
evapo2$pH2= evapo2$ph
evapo2$Sal2= evapo2$Sal
evapo2$Eva2= evapo2$Evap
evapo2$Evaper2= evapo2$evaper
evapo2$Tratamento2=factor(evapo2$Tratamento2,levels=c("t10a","t20a","t5f","t10f","t20f"))
kruskal.test(Sal2~Tratamento2, data = evapo2)
###post hoc tukey kruskal wallis
library(PMCMR)
library(dunn.test)
###Salinidade
kruskal.test(Sal2~Tratamento2, data = evapo2)
evapo2$Sal2 <- rank(evapo2$Sal2, ties.method = "random")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(Sal2~Tratamento2, data = evapo2, dist = c("Tukey"))
dunn.test(evapo2$Sal2,evapo2$Tratamento2)
###pH
kruskal.test(pH2~Tratamento2, data = evapo2)
evapo2$pH2 <- rank(evapo2$pH2, ties.method = "random")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(pH2~Tratamento2, data = evapo2, dist = c("Tukey"))
dunn.test(evapo2$pH2,evapo2$Tratamento2)
###Evaporação
kruskal.test(Evaper2~Tratamento2, data = evapo2)
evapo2$Evaper2 <- rank(evapo2$Evaper2, ties.method = "random")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(Evaper2~Tratamento2, data = evapo2, dist = c("Tukey"))
dunn.test(evapo2$Evaper2,evapo2$Tratamento2)

```

Apêndice IV: Valores de significância (p -valor) e a percentagem dos valores da probabilidade estimada (P) de um dado tratamento analisado para alguma diferença entre dois tratamentos analisados referida no Teste *post-hoc* de Tukey, o qual seguiu, a análise do modelo linear generalizado (GLM), do experimento da avaliação do potencial de retenção do copépodo *Acartia tonsa* em diferentes malhas de rede. A GLM demonstrou os efeitos das interações (-) entre as diferentes malhas de rede (M) e diferentes estágios de desenvolvimento de *A. tonsa* (EST) sobre a retenção de organismos (Y). "ns" indica não significante, "*" indica significância ao nível de 0,05 e "***" ao nível de 0,01. Para os organismos fixados Y é Binomial ($n=50, \theta$), sendo θ a probabilidade de retidos. Para os organismos vivos Y é Binomial ($n=$ número de organismos retidos + os que passaram, θ), sendo θ a probabilidade de retidos. O modelo da função GLM foi: "Y~M+EST+M-EST" com função de ligação "logit". M= malhas de rede (fator em 3 níveis {180 μ m; 330 μ m; 500 μ m}). EST= estágios de desenvolvimento do copépodo *Acartia tonsa* (fator em 6 níveis: {CI, CII, CIII, CIV, CV, CVI}). M-EST= o efeito da interação entre as malhas de rede e os estágios de desenvolvimento do copépodo *A. tonsa*.

Variáveis		Fixados		Vivos	
MR (μ)	EST	p -valor	P	g -valor	P
180-330	CI	<0,001**	100%	ns	91%
180-500	CI	<0,001**	100%	0,091	94%
330-500	CI	ns	67%	ns	61%
180-330	CII	<0,001**	100%	ns	83%
180-500	CII	<0,001**	100%	0,001**	97%
330-500	CII	0,012**	91%	ns	88%
180-330	CIII	<0,001**	94%	ns	90%
180-500	CIII	<0,001**	100%	0,003**	95%
330-500	CIII	<0,001**	99%	ns	70%
180-330	CIV	<0,001**	95%	ns	89%
180-500	CIV	<0,001**	100%	<0,001**	98%
330-500	CIV	<0,001**	99%	0,012*	91%
180-330	CV	ns	63%	0,003**	94%
180-500	CV	<0,001**	99%	<0,001**	99%
330-500	CV	<0,001**	99%	<0,001**	97%
180-330	CVI	ns	50%	<0,001**	96%
180-500	CVI	<0,001**	99%	<0,001**	99%
330-500	CVI	<0,001**	99%	<0,001**	97%
180	CI-CII	ns	50%	ns	41%
180	CI-CIII	ns	50%	ns	30%
180	CI-CIV	ns	50%	ns	18%
180	CI-CV	ns	50%	ns	6%
180	CI-CVI	ns	50%	0,009**	2%
180	CII-CIII	ns	50%	ns	38%
180	CII-CIV	ns	50%	ns	24%
180	CII-CV	ns	50%	ns	9%
180	CII-CVI	ns	50%	0,004**	3%
180	CIII-CIV	ns	50%	ns	33%
180	CIII-CV	ns	50%	ns	14%
180	CIII-CVI	ns	50%	0,029*	5%
180	CIV-CV	ns	50%	ns	25%
180	CIV-CVI	ns	50%	ns	9%
180	CV-CVI	ns	50%	ns	24%
330	CI-CII	ns	26%	ns	25%
330	CI-CIII	<0,001**	2%	ns	16%
330	CI-CIV	<0,001**	2%	ns	28%
330	CI-CV	<0,001**	0,2%	ns	10%
330	CI-CVI	<0,001**	0,1%	ns	5%
330	CII-CIII	<0,001**	6%	ns	55%
330	CII-CIV	<0,001**	6%	ns	36%
330	CII-CV	<0,001**	0,6%	ns	25%
330	CII-CVI	<0,001**	0,4%	ns	16%
330	CIII-CIV	ns	54%	ns	32%
330	CIII-CV	<0,001**	10%	ns	22%
330	CIII-CVI	<0,001**	6%	ns	13%
330	CIV-CV	<0,001**	8%	ns	37%
330	CIV-CVI	<0,001**	5%	ns	25%
330	CV-CVI	ns	37%	ns	36%
500	CI-CII	ns	63%	ns	62%
500	CI-CIII	ns	45%	ns	37%
500	CI-CIV	ns	56%	ns	56%
500	CI-CV	<0,001**	8%	ns	74%
500	CI-CVI	<0,001**	10%	ns	60%
500	CII-CIII	ns	33%	ns	26%
500	CII-CIV	ns	43%	ns	44%
500	CII-CV	<0,001**	5%	ns	63%
500	CII-CVI	<0,001**	6%	ns	47%
500	CIII-CIV	ns	60%	ns	69%
500	CIII-CV	<0,001**	10%	ns	83%
500	CIII-CVI	<0,001**	11%	ns	72%
500	CIV-CV	<0,001**	7%	ns	68%
500	CIV-CVI	<0,001**	8%	ns	54%
500	CV-CVI	ns	53%	ns	35%

Os valores que não são significativos, mas que se encontram perto do limite de significância ao nível de 0,05, estão apresentados na tabela. Os valores foram considerados perto do limite de significância quando os mesmos fossem menor ou igual a 0,1.

Apêndice V: Medidas morfométricas dos estágios de desenvolvimento do copépodo *Acartia tonsa* do experimento avaliação do potencial de retenção do copépodo *A. tonsa* nas diferentes malhas de rede. Valores mínimos e máximos, médias e desvios padrões apresentados entre parênteses. CI – copepodito 1; CII – copepodito 2; CIII – copepodito 3; CIV – copepodito 4; CV – copepodito 5; CVI – copepodito 6. N – número de organismos medidos.

Estágio	Comprimento total (µm)	Comprimento total * (µm)	Comprimento do prossoma (µm)	Largura do prossoma (µm)	N
Rede de 180					
CI	321-422 (408±20,99)	400-500 (485±24,26)	300-350 (345±14,59)	100-150 (142±18,07)	150
CII	348-549 (503±29,70)	400-600 (555±30,04)	350-400 (399±4,08)	150-150 (150±0)	150
CIII	447-662 (575±42,56)	500-750 (649±45,24)	450-500 (471±24,76)	100-150 (150±4,08)	150
CIV	556-906 (711±66,84)	600-1000 (771±70,56)	500-650 (552±34,80)	150-200 (179±24,68)	150
CV	683-1115 (875±61,46)	800-1250 (992±63,30)	650-800 (683±33,11)	200-250 (230±24,51)	150
CVI	740-1190 (950±97,28)	900-1400 (1143±100,11)	650-900 (768±53,81)	250-300 (252±9,00)	150
Rede de 330					
CI	348-448 (414±28,17)	400-500 (483±29,44)	300-350 (341±18,99)	100-150 (139±20,78)	150
CII	430-543 (500±29,29)	500-600 (563±29,78)	350-400 (400±4,08)	150-150 (150±0)	150
CIII	439-642 (575±39,67)	500-700 (641±40,86)	450-500 (468±24,08)	150-150 (150±0)	150
CIV	567-867 (710±54,27)	600-950 (765±63,13)	500-650 (547±36,74)	150-200 (178±24,94)	150
CV	732-1083 (873±58,75)	850-1200 (992±59,10)	650-800 (683±33,61)	200-250 (236±22,52)	150
CVI	795-1195 (950±103,08)	1000-1400 (1170±103,95)	650-900 (763±63,61)	250-300 (254±21,35)	150
Rede de 500					
CI	300-469 (405±25,68)	315-550 (486±32,31)	250-350 (340±21,67)	100-150 (139±20,55)	150
CII	431-542 (500±32,49)	500-600 (564±32,43)	350-400 (400±5,75)	150-150 (150±0)	150
CIII	417-678 (575±39,46)	550-750 (643±40,97)	450-500 (468±24,17)	150-200 (152±9,83)	150
CIV	529-943 (710±66,30)	600-1000 (766±67,59)	500-650 (553±38,33)	150-250 (185±23,56)	150
CV	732-1017 (875±57,42)	850-1150 (994±58,48)	650-750 (674±28,79)	200-250 (226±25,05)	150
CVI	744-1134 (950±103,08)	950-1350 (1170±103,95)	650-900 (773±63,61)	200-300 (261±21,35)	150

Comprimento total * refere-se a medida do comprimento tomada até o final das cerdas da furca

Apêndice VI: Medidas morfométricas dos estágios de desenvolvimento do copépodo *Acartia tonsa* que passaram pelas diferentes malhas de rede. Valores mínimos e máximos, e médias e desvios padrões apresentados entre parênteses. CI – copepodito 1; CII – copepodito 2; CIII – copepodito 3; CIV – copepodito 4; CV – copepodito 5; CVI – copepodito 6. N – número de organismos medidos. “np” indica nenhum passou.

Estágio	Comprimento total (μm)	Comprimento total * (μm)	Comprimento do prossoma (μm)	Largura do prossoma (μm)	N
Rede de 180					
CI	np	np	np	np	0
CII	np	np	np	np	0
CIII	np	np	np	np	0
CIV	np	np	np	np	0
CV	np	np	np	np	0
CVI	np	np	np	np	0
Rede de 330					
CI	334-434 (414±29,69)	400-500 (480±29,69)	300-350 (341±19,35)	100-150 (141,96±18,43)	143
CII	493-643 (593±38,92)	550-700 (650±38,92)	450-500 (469±24,66)	150-150 (150±0)	128
CIII	478-617 (574±35,25)	550-700 (650±38,92)	450-500 (469±24,66)	150-150 (150±0)	34
CIV	593-767 (699±23,89)	650-850 (763±31,87)	500-600 (547±19,70)	150-200 (181±24,64)	39
CV	732-882 (807±106,06)	850-1000 (925±106,06)	650-650 (650±0)	200-200 (200±0)	2
CVI	np	np	np	np	0
Rede de 500					
CI	319-469 (407±25,69)	400-550 (488±25,69)	300-350 (338±21,30)	100-150 (136±22,70)	148
CII	431-542 (500±32,49)	500-600 (564±32,43)	350-400 (400±5,75)	150-150 (150±0)	150
CIII	497-671 (575±31,84)	550-750 (643±41,23)	450-500 (468±24,09)	150-200 (152±9,93)	147
CIV	561-943 (709±63,55)	600-1000 (765±67,46)	500-650 (549±53,10)	150-250 (185±23,61)	149
CV	744-1032 (903±114,99)	850-1150 (986±102,77)	650-750 (771±63,39)	200-250 (261±21,60)	112
CVI	794-982 (945±114,99)	900-1100 (1164±102,78)	650-750 (771±63,39)	200-250 (260±21,60)	116

Comprimento total * refere-se a medida do comprimento tomada até o final das cerdas da furca