



CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOLOGIA MARINHA  
PRH-11



**RODRIGO ALVES BRENDOLAN**

**UTILIZAÇÃO DO MICROCRUSTÁCEO**  
*Kalliapseudes schubartii*  
**EM TESTES DE ECOTOXICOLOGIA**

**NITERÓI**  
2004

**A vida é um eterno perde e ganha  
um dia a gente perde, o outro dia a gente apanha,  
apanha e nem por isso a gente vai fugir da luta,  
não vou abaixar a cabeça pra nenhum f....  
As pedras no caminho a gente chuta  
é super natural,  
não deixo abaixar minha moral.  
Tenho que me manter em movimento  
a vida não é mole mas qualquer parada  
enfrento..enfrento.  
Tão louco você pensa que está  
e se é que está  
tão louco você pode ficar.  
Tem coisas que o dinheiro não paga  
sabe qualé?  
eu e minha Preta...só no role,  
por isso é que eu tiro onda cumpádi  
eu tô de pé.**

*Marcelo D2*

## Resumo

Dentre todos os produtos químicos, o petróleo é um dos mais preocupantes em termos ambientais, principalmente pela toxicidade que pode causar em diferentes organismos. O presente trabalho visa observar a potencialidade de adequar o microcrustáceo *Kalliapseudes schubartii* em laboratório para realização de testes toxicológicos com sedimento contaminado com petróleo. Para adaptação deste invertebrado ao ambiente de laboratório é necessário testes de robustez para as variáveis abióticas limitantes mais significativas (temperatura e salinidade), além da avaliação do grau de sensibilidade da espécie à substâncias de referência. Os resultados mostraram que esta espécie em testes de toxicidade não deve-se utilizar temperaturas acima de 25°C. Quanto a salinidade podem-se utilizar águas entre 15 e 35. A CL50/96h média obtida com o dodecil sulfato de sódio (DSS) foi de 25,90 mg/l, com CV de 17,80%. A média calculada com os resultados obtidos nos testes conduzidos com zinco foi de 5,80 mg/l, com coeficiente de variação de 47,93%. Devido a alta variabilidade dos dados de zinco, a substância escolhida para ser realizada em conjunto aos testes com petróleo foi o DSS. A CL50/10dias do petróleo para o *K. schubartii* foi de 105740.50 ppm. De modo geral, as condições de laboratório testadas no presente estudo mostraram-se adequadas para utilização do *Kalliapseudes schubartii* em testes toxicológicos.

## ABSTRACT

Among chemical pollutants, the oil is one of the most threatening to the natural environment, mainly for its toxicity that can affect different organisms. This work aims to test the use of the microcrustacean *Kalliapseudes schubartii* in laboratory ecotoxicological assays, using sediment contaminated with petroleum. For the adaptation of this invertebrate to the laboratory environment robustness tests are necessary to determine the most significant limiting abiotic variables (temperature and salinity), besides evaluating the degree of sensitivity of the species to reference substances. Our results showed that temperatures of the culture water should not exceed 25°C and salinity could range from 15 to 35. The LC50/96h average to the sodium dodecyl sulfate (SDS) was 25,90mg/l, with coefficient of variation of 17,80%. The average value for the zinc was 5,80 mg/l, with coefficient of variation of 47,93%. Due to the high variability of the zinc data it is preferable to carry out the tests using the SDS as reference substance. The CL50/10days of oil for the *K. schubartii* was 105740.50 ppm. The results obtained in this study showed that *K. schubartii* is a species that fits to ecotoxicological studies.

Dedico,

Ao meu pai (em memória / 95) e minha avó Tereza (em memória / 03),  
à minha mãe e meu irmão, à Luana, minha namorada, e ao meu grande amigo  
Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço pela grandiosa colaboração, sem a qual não seria possível a realização deste projeto de dissertação:

- Ao meu orientador Prof. Dr. Abílio Soares Gomes, pelo apoio e confiança.
- À Ana Clara, Aninha e Denise, por me receberem quando cheguei em Niterói.
- Ao Sérgio e a Bete, não somente pelas amostras de microalgas, ou pelos ensinamentos sobre cultivo, mas sim, pela amizade e carinho que recebi de ambos.
- A todos os professores do Biomar: Abílio, Cassiano, Valéria, Renato, Beto, Sérgio, Bernardo, Cacá, Édson, Miriam, Coutinho e Valmir.
- À Agência Nacional do Petróleo e Ministério da Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro através do Programa de Formação de Recursos Humanos (PRH/ANP-MCT – 11).
- Ao Prof. Dr. Cleverson Guisan Silva, pela ótima coordenação do PRH/ANP-11.
- Ao Bernardo pelas orientações com as análises estatísticas.
- À galera do laboratório: Simone, Mariana, Daniela e Felipe.
- Aos alunos que me elegeram como seu representante no Colegiado do curso.
- A Danikas pela ajuda com a correção do trabalho e as análises estatísticas.
- Aos amigos do Biomar da turma de 2001: Fredão, Zé Policarpo, Gustavo e Léo Vidal.

- Aos amigos de curso (Turma 2002-2004): Uani, Alex Bigio, Léo Avellar, Alessandro, Lili, Danikas, Carlitcha, Luciano, Luiz, Taschinha, Paulão e Renatinha. Essa turma vai deixar saudade. Um brinde...ao de sempre!!!
- Ao Léo Avellar e a Elennaja (que infelizmente não passou) por me ajudarem a estudar pra prova de mestrado.
- A todos os moradores do 1512 da São Sebastião, Lili, Danikas, Carlitcha, Toninho e Luana. E a todos nossos vizinhos que agüentaram as bagunças etc. etc.
- A Eunice (secretária) por ter me agüentado nesses 2 anos.
- Às meninas do LabTox, em especial à Márcia, Maria Cristina, Leila e Viviane, pela ajuda mais que especial que me deram nos testes de toxicidade. E um muito obrigado a Sônia (SP) pelas dicas preciosas na realização dos testes de toxicidade com sedimento.
- À Refinaria Manguinhos, em especial ao Sr Antonio de Pádua, pelas amostras de petróleo.
- Ao Fernando (Lagemar) pela ajuda com as análises de matéria orgânica e granulometria.
- Aos amigos especiais, Lili, Danikas, Carlitcha, Léo Avellar e Fredão, no qual passei momentos especiais e inesquecíveis.
- Aos meus amigos de Jaboticabal: Borsari, Tuca, Mayra, Ana Maria e Kuva, que sempre me apoiaram no momento de insanidade, quando resolvi sair de Jaboticabal somente com uma mochila e uns trocados.

Muito obrigado a todos.

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Quadros</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Os impactos no ambiente marinho.....	1
1.2. A ecotoxicologia.....	2
1.3. Testes de toxicidade.....	4
1.4. As substâncias de referência.....	6
1.4.1. Zinco.....	6
1.4.2. Dodecil sulfato de sódio.....	8
1.5. Escolha da espécie-teste.....	9
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1. Gerais.....	11
2.2. Específicos.....	11
<b>3. APLICABILIDADE</b> .....	<b>12</b>
<b>4. A ESPÉCIE <i>Kalliapseudes schubartii</i></b> .....	<b>13</b>
<b>5. O PETRÓLEO E O ECOSSISTEMA MARINHO</b> .....	<b>17</b>
5.1. A situação brasileira.....	20
5.2. A legislação brasileira.....	23

<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
6.1. Caracterização do local de coleta.....	26
6.2. Adequação do <i>Kalliapseudes schubartii</i> em laboratório.....	28
6.2.1. Coleta e aclimação.....	28
6.2.2. testes com variáveis ambientais.....	30
6.3. Alimentação.....	33
6.3.1. Preparo da dieta alimentar.....	34
6.3.1.1. Ração em flocos para peixes tropicais.....	34
6.3.1.2. Ração microfloculada de alevinos.....	34
6.3.1.3. Condições de cultivo da <i>Tetracelmis graciles</i> e manutenção das culturas.....	35
6.4. Testes com substâncias de referência.....	37
6.4.1. Preparo das soluções-teste.....	38
6.4.2. Validade do teste.....	38
6.5. Testes de Toxicidade com Petróleo.....	39
6.5.1. Preparo das soluções-teste e seleção dos organismos.....	40
6.5.2. Validade do Teste.....	43
6.6. Caracterização Granulométrica e Análise de Matéria Orgânica.....	43
<b>7. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS</b> .....	45
<b>8. CONTROLE DA QUALIDADE DOS ENSAIOS</b> .....	46
<b>9. EXPRESSÃO DE RESULTADOS E CÁLCULOS ESTATÍSTICOS</b> ..	48
<b>10. RESULTADOS</b> .....	50
10.1. Estatística Descritiva.....	50
10.2. Efeito da Temperatura e Salinidade.....	51
10.3. Substâncias de Referência.....	53

10.3.1. Parâmetros físico-químicos.....	54
10.4. Testes de Toxicidade com Petróleo.....	55
10.5. Granulometria e Matéria Orgânica.....	56
10.6. Análise Química do Sedimento.....	62
<b>11. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
11.1. Escolha de Organismos-teste.....	63
11.2. <i>K. schubartii</i> como Organismo para Testes de Toxicidade.....	64
13.2.1. Informações sobre a biologia e ecologia da espécie.....	64
13.2.2. Alta taxa de sobrevivência sob condições controladas.....	65
13.2.3. Pouca sensibilidade as variáveis naturais do sedimento, como tamanho das partículas e conteúdo orgânico.....	65
13.2.4. Disponibilidade e abundância na natureza.....	67
13.2.5. Importância ecológica e econômica.....	67
11.3. Alimentação.....	67
11.4. Temperatura e Salinidade.....	68
11.5. Substâncias de Referência.....	70
11.6. Testes de Toxicidade com Petróleo.....	70
<b>12. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>13. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>76</b>

## Lista de Figuras

---

Figura 1. Tanaidáceo bentônico <i>Kalliapseudes schubartii</i> .....	16
Figura 2. Comportamento de óleo derramado no mar e principais processos envolvidos.....	18
Figura 3. Área de coleta.....	28
Figura 4. Vista superior do béquer, mostrando onde o <i>K. schubartii</i> construiu tubos.....	32
Figura 5. Vista lateral do béquer mostrando onde o <i>K. schubartii</i> construiu tubos.....	32
Figura 6. Aspecto da câmara de cultivo de microalgas.....	37
Figura 7. Agitador utilizado no preparo da FOA.....	41
Figura 8. Ilustração do contraste entre a FOA, e água do mar limpa.....	41
Figura 9. Processo de mistura do sedimento com a FOA.....	42
Figura 10. Plástico inserido no interior do béquer para evitar ressuspensão significativa do petróleo para a coluna d'água.....	42
Figura 11. Demonstração dos organismos distribuídos aleatoriamente...	43
Figura 12. Diminuição gradual da porcentagem de sobrevivência do <i>K. schubartii</i> conforma aumento da temperatura nos testes de adequação...	52

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1: Percentual estimado de diferentes fontes de poluição marítima por petróleo.....	18
Tabela 2: Descrição dos principais acidentes com derramamento de petróleo.....	22
Tabela 3: Descrição dos tratamentos experimentais, com as combinações entre temperaturas e salinidades testadas.....	31
Tabela 4: Descrição e concentrações das substâncias utilizadas na produção do meio de cultura f/2.....	35
Tabela 5. Substâncias e concentrações utilizadas, para preparo das soluções estoque.....	36
Tabela 6. Número de sobreviventes analisados estatisticamente quanto a normalidade em arcoseno, raiz e log.....	50
Tabela 7. Resultados de arcoseno analisados estatisticamente quanto a homocedasticidade.....	51
Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência do <i>K. schubartii</i> e valores de “p” entre os tratamentos 1 e 6 dos testes de temperatura e salinidade.....	51
Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência do <i>K. schubartii</i> e valores de “p” entre os tratamentos 7 e 12 dos testes de temperatura e salinidade.....	52
Tabela 11. Valores de oxigênio dissolvido (OD) analisado no início e final dos testes de temperatura e salinidade.....	53
Tabela 12. Resultados da CL50/96h dos testes de toxicidade conduzidos com zinco e dodecil sulfato de sódio (DSS).....	54
Tabela 13. Variação da salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD) analisados nos testes com substâncias de referência.....	54

Tabela 14. Média percentual da sobrevivência do <i>K. schubartii</i> durante o teste preliminar com sedimento contaminado por petróleo, nas diferentes concentrações avaliadas.....	55
Tabela 15. Resultado da CL50/10dias obtido no teste de toxicidade definitivo com petróleo.....	55
Tabela 16. Resultado do teste com a substância de referência DSS realizado em paralelo com o teste com petróleo.....	56
Tabela 17. Parâmetros físicos e químicos das soluções do teste com a substância DSS, testada paralelamente ao teste de toxicidade definitivo com petróleo.....	56
Tabela 18. Resultado da análise granulométrica realizada com amostra de sedimento original, utilizado nos testes de temperatura e salinidade.....	58
Tabela 19. Resultado da análise granulométrica realizada com amostra de sedimento limpo, utilizado nos testes de temperatura e salinidade.....	59
Tabela 20. Resultado da análise granulométrica realizada com amostra de sedimento original, utilizado nos testes de toxicidade com petróleo.....	60
Tabela 21. Resultado da análise granulométrica realizada com amostras de sedimento limpas, utilizado nos testes de toxicidade com petróleo.....	61
Tabela 22. Resultados de HPA da amostra do sedimento do ponto de coleta do <i>K. schubartii</i> .....	62

## **Lista de Quadros**

---

Quadro 1. Parâmetros de enquadramento para descartes de efluentes – Artigo 21 da Resolução CONAMA 20/86.....	24
---	----

# **1. INTRODUÇÃO**

---

## **1.1. Os Impactos no Ambiente Marinho**

No Brasil, a linha costeira perfaz 7491 km de extensão (Nipper, 2000). Na maior parte dessa extensão, atividades relacionadas à pesca, turismo, e principalmente à extração de recursos minerais ocorrem diariamente. Por outro lado, são correntes preocupações relacionadas à preservação do meio ambiente, especialmente nas regiões próximas aos grandes centros urbanos, onde diferentes ecossistemas (baías, estuários, mangues etc) estão com seus habitats naturais comprometidos por essas atividades excessivas e em muitos casos indiscriminadas. Porém, não são apenas essas atividades que provocam impactos negativos ao meio ambiente. Outros três processos ou reações (antropogênicas ou naturais), também causam alterações significativas, muitas vezes irreversíveis, nos ecossistemas marinho. Primeiramente, os efeitos físicos, principalmente aqueles relacionados às mudanças na temperatura da água, provocados por hidroelétricas, matéria orgânica em excesso, e mudanças drásticas do clima de maneira natural, que tem como consequência principal à extinção das espécies (Chapman, 1995). Segundo, as mudanças bióticas, como competição, predação, evolução ou introdução de novas espécies, que propiciam grandes alterações nas populações originais (Goldberg, 1995). O terceiro efeito está relacionado com mudanças ecológicas causadas por poluição química, que proporciona toxicidade à biota marinha (Chapman, 1995).

Os potenciais efeitos tóxicos de substâncias químicas na biota marinha, podem ser avaliados através de testes de toxicidade. Por isso, a toxicologia evoluiu, devido principalmente, pelo interesse público, tanto quanto pelo interesse governamental. Conseqüentemente, houve um aumento das pesquisas nos centros universitários, em órgãos privados e laboratórios industriais, provocando o enaltecimento da toxicologia nas décadas de 60 e 70, estimulando o desenvolvimento das novas áreas científicas, como a ecotoxicologia (Sousa, 2002).

## **1.2. A Ecotoxicologia**

A ecotoxicologia é uma ciência que compreende a interação entre a ecologia e a toxicologia (Chapman, 1995; Baird *et. al.*, 1996), tendo como objetivo principal compreender e prever os efeitos de substâncias químicas em comunidades biológicas, sob circunstâncias reais de exposição. Esta ciência tornou-se uma importante ferramenta na avaliação de como substâncias químicas afetam diferentes organismos e populações, fornecendo subsídios para avaliar e proteger adequadamente a qualidade ambiental (Chapman, 2002, Calow, 1996).

Nipper & Carr (1997) consideram dois compartimentos do sedimento (água intersticial e sedimento integral) em testes de ecotoxicidade. Sendo que, ambos podem ser estudados tanto isoladamente, quanto em conjunto (Burton & Scott, 1992).

Segundo Carr (1998), os testes com água intersticial são geralmente conduzidos no estágio de vida inicial dos organismos marinhos e estuarinos,

tais como gametas e embriões de equinodermos, moluscos, copépodos, poliquetas ou mesmo larvas de peixes. Os resultados dos testes devem ser interpretados como um sinal de advertência, adiantando potenciais impactos de contaminantes na biota bentônica, devido à elevada sensibilidade de alguns organismos aos contaminantes disponíveis na fase líquida do sedimento (Chapman *et. al.*, 2002).

Testes de toxicidade utilizando o sedimento integral vêm sendo realizados desde a década de 80 objetivando de uma avaliação concreta dos impactos de contaminantes na biota bentônica (Plesha *et. al.*, 1988; Bretelet *et. al.*, 1989). Assim, podem-se estabelecer critérios de qualidade de sedimento e identificar áreas com contaminantes tóxicos a organismos bentônicos (Swartz *et. al.*, 1985; Scott & Redmond, 1989)

Muito embora a metodologia de contaminação dos sedimentos ainda não esteja padronizada (Chapman, 1997), diferentes métodos vêm sendo utilizados com eficácia (Ditsworth *et al.* , 1990; Environment Canadá, 1992). No Brasil, testes com sedimento integral foram realizados com anfípodos, e algumas espécies de crustáceos (Costa & Zamboni, 1998).

Para realização de testes ecotoxicológicos com sedimento integral, os parâmetros ecológicos, (alimentação e tamanho do grão sedimentar) devem ser analisados antes dos parâmetros toxicológicos. Quanto aos parâmetros físico-químicos, estes devem ser determinados antes, durante e depois dos testes de toxicidade, para que estes fatores não influenciem na toxicidade do produto ou na saúde dos organismos.

Testes ecotoxicológicos com sedimento total têm como metodologia básica analisar seu grau de toxicidade comparando-o a um sedimento controle

(ausente de contaminantes) que possua características semelhantes (Chapman *et. al.*, 2002). A dificuldade, neste caso, está na definição de qual substância específica causou a toxicidade no organismo. Para isso, devem ser realizados testes de toxicidade a partir de sedimentos contaminados com uma substância específica. Pode-se assim, monitorar a contaminação e descobrir com precisão (através de análise química) qual a concentração do tóxico que provocou o efeito esperado no organismo.

Testes de toxicidade associados com análises químicas e estudos sobre a composição da comunidade bentônica são altamente recomendadas para fornecer informações detalhadas sobre o impacto ecológico de sedimentos contaminados, porque esta composição de estudos forma a “Tríade de Qualidade de Sedimentos” (ver: Long & Chapman, 1985).

### **1.3. Testes de Toxicidade**

Os testes de toxicidade podem ser classificados como “agudos” ou “crônicos”, em função do tempo de exposição dos organismos à substância tóxica e do tipo de efeito a ser observado (Rand *et. al.*, 1985). Sendo que, as respostas da biota aos poluentes são distribuídas pelo tempo, algumas ocorrendo imediatamente após o evento poluidor ou respondendo a um estímulo contínuo e longo.

Nos testes agudos, organismos são expostos a altas concentrações de um contaminante por um curto período de tempo, geralmente 48 a 96 horas, e os resultados são analisados estatisticamente para obtenção da CL

(concentração letal) ou CE<sub>p</sub> (concentração efetiva) a uma dada porcentagem dos organismos (Nipper, 2002; Rand & Petrocelli, 1985).

Nos testes crônicos são observados efeitos letais ou subletais, como inibição do crescimento, reprodução e alterações morfológicas. Estas observações ocorrem durante um período de exposição considerado longo, geralmente de 48 horas a 10 dias, dependendo do ciclo de vida do organismo-teste (Nipper, 2002, Rand & Petrocelli, 1985). Os resultados são analisados estatisticamente para obtenção da CL ou CI (concentração inibitória a uma dada porcentagem da população-teste). Geralmente, o valor da porcentagem mais utilizada é 50%, resultando na CL<sub>50</sub> (concentração da amostra que é letal a 50% dos organismos expostos), CE<sub>50</sub> (concentração da amostra que causa um efeito subletal a 50% dos organismos expostos), ou CI<sub>50</sub> (concentração da amostra que é inibitória a 50% dos organismos expostos) (Nipper, 2002).

Outro método para a análise dos dados de testes com concentrações seriadas consiste na aplicação de testes de hipóteses para obtenção da concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). CENO é considerada a menor concentração que for significativamente diferente da amostra controle. CEO é considerada a maior concentração que difere significativamente da amostra controle por apresentar efeito adverso (Nipper, 2002; Lotufo & Abessa, 2000). Entretanto, a utilização desses índices e a tomada de decisões são questionadas por vários autores, como Chapman *et. al.*, (1996); Chapman, (1997); e Mastroti, *et al.*, (1997), especialmente pela dependência direta do intervalo de concentrações escolhidas, sendo então, recomendado o uso em conjunto com as CLs para serem utilizadas para fins de proteção ambiental.

## **1.4. As Substâncias de Referência**

Uma das formas de se avaliar as condições fisiológicas de um organismo-teste é através da realização de testes de sensibilidade com uma ou mais substâncias tóxicas de referência. O método consiste em submeter o organismo-teste em diferentes concentrações da substância-teste, e desta maneira, obter a faixa de sensibilidade desse organismo para posterior realização de bioensaios. Valores fora da faixa de sensibilidade encontrada não garantem que os organismos encontram-se em ótimas condições para serem utilizados (CETESB, 1983).

### **1.4.1. Zinco**

A maioria do zinco na água do mar é complexada ou absorvida, mantida livre de concentrações de zinco iônicas abaixo deste nível, exceto em estuários contaminados pesadamente (Bryan & Langston, 1992 bioacu).

O zinco é um micro nutriente essencial a numerosos sistemas enzimáticos e a biossíntese hormonal de plantas ([Ernst et al., 1992](#)).

O zinco metálico é usado na produção de ligas ou na galvanização de estruturas de aço, podendo também ser um aditivo de certas borrachas e tintas.

Uma das ligas mais importantes de zinco é o bronze, que consiste na mistura deste elemento com o cobre. O zinco pode ainda utilizar-se como eléctrodo nas vulgares pilhas secas.

Os principais compostos de zinco são o óxido (ZnO), utilizado na indústria cerâmica, borrachas e tintas. O sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) tem aplicação na indústria têxtil e no enriquecimento de solos pobres em zinco. O cloreto de zinco é usado para preservar madeiras bem como desodorizante em diversos fluidos. Enquanto mineral, o zinco encontra-se na crosta terrestre, associado a outros metais como o cobre e o chumbo. Os depósitos de zinco estão dispersos por todo o mundo, sendo muito vulgar encontrar massivos depósitos de zinco com bastante ferro misturado.

A entrada de zinco nos oceanos é derivada principalmente por deposição aérea, sendo entre 11.000 e 60.000 toneladas métricas de zinco dissolvido e particulado que são depositados dessa maneira para dentro dos oceanos anualmente (Jickells, 1995 bioaccumulation). Adicionalmente, 6.000 toneladas de zinco dissolvidos entram nos oceanos a cada ano pelos rios.

Na Antártica, a alta concentração de zinco é derivada do ressurgência de águas profundas ricas deste composto.

A concentração de zinco em estuários e águas costeiras é frequentemente muito mais alta comparada ao oceano aberto (Morse *et al.*, 1993; Law *et al.*, 1994 bioaccumulation).

O zinco é um micronutriente para todos os organismos marinhos, sendo um cofator de aproximadamente 300 enzimas (Vallee & Auld, 1990 bioacui).

Por ser um micronutriente, numerosas espécies de animais marinhos mostram-se capazes de acumular e regular o zinco nos tecidos até mesmo em concentrações consideradas altas (Luoma & Bryan, 1982; Armiard *et al.*, 1985; Vale & Mendes, 1986; Ahsanullah & Williams, 1991). O acúmulo do zinco por organismos pode ocorrer da água, alimento e/ou sedimentos.

Pelo fato dos organismos marinhos poderem regular altas taxas residuais de zinco nos tecidos pela água, alimentação e sedimento, este é apenas moderadamente tóxico para alguns organismos marinhos porém, famílias de poliquetos, copépodos e ostracóides são muito sensíveis ao zinco (bioac1).

Microalgas utilizam o zinco como nutriente em concentração máxima de 0,00065µg/L, inibindo seu crescimento em concentrações acima deste (Sunda & Huntsman, 1992 bioac).

Macroalgas marinhas são insignificamente pouco sensíveis comparados ao fitoplâncton (Filho *et al.*, 1997 bioac).

Não é possível estimar a concentração de zinco nos tecidos de animais marinhos que podem ser esperado a ser associado com efeitos adversos nos próprios animais ou seus consumidores, incluindo mo homem (bioac.3)

O zinco é difícil de analisar apuradamente em amostras ambientais devido as múltiplas fontes de zinco no ambiente humano (bioacc 4).

#### **1.4.2. Dodecil sulfato de sódio (DSS)**

O dodecil sulfato de sódio, é utilizado em grandes quantidades, na dispersão de manchas causadas por vazamentos de petróleo e na indústria em geral como agente tensoativo (<http://www.usp.br/agen/repgs/2003/pags/174.htm>).

Este composto vem sendo usado ao longo dos anos para diferentes finalidades e usos distintos a saber, banhos de espuma, cremes emolientes, cremes depilatórios, loções para mãos, xampus, dentifrícios, além de produtos como os detergentes sanitários. Este uso tem sido motivado em razão das suas

propriedades detergente, molhante, espumógena, emulsificante e solubilizante. Cabe ressaltar que estas características são comuns à todos os tensoativos e não somente aos dois em questão (<http://www.consciencia.net/comportamento/saude/lss.html>).

### **1.5. Escolha da Espécie-Teste**

Segundo ALPHA (1995); DeWitt *et.al.*, (1988) e Soares-Gomes *et.al.*, (2000), a escolha de uma espécie-teste é baseada em alguns critério como: (a) biologia e ecologia da espécie; (b) alta taxa de sobrevivência sob condições controladas; (c) pouca sensibilidade às variáveis naturais do sedimento, como tamanho das partículas e conteúdo orgânico; (d) disponibilidade e abundância na natureza; (e) importância ecológica e econômica.

No Brasil, os primeiros testes avaliando a toxicidade em organismos marinhos foram realizados por Araújo *et. al.* (1987), utilizando náuplios de *Artemia* sp, e por Nascimento *et. al.*,(1998), utilizando a ostra de mangue *Crassostrea rhizophorae*.

Os testes agudos com *Artemia* sp (CETESB, 1987) e *Mysidopsis juniae*, (CETESB, 1992a), além do teste crônico com *Lytechinus variegatus* (CETESB, 1992b), estão entre os poucos testes já padronizados no país.

Com relação aos testes de toxicidade com sedimento, Brendolan e Soares-Gomes (2003) não encontraram no Brasil publicações citando espécies psamobênticas (bentos de sedimento não consolidado) utilizadas em testes toxicológicos tendo o petróleo como contaminante. Os autores encontraram as espécies *Costoanachis sertulariarum* (gastrópoda) (Sousa & Tommasi 1997),

*Hyalella azteca* (Zamboni, *et. al.*, 1998), *Gammarus aequicauda* (César *et. al.*, 1997), *Gammarus locusta* (anfípoda) (Costa *et. al.*, 1996), *Kalliapseudes schubartii* (tanaidáceo) (Costa & Zamboni, 1998) e *Tiburonella viscana* (anfípoda) (Abessa, *et. al.*, 1998) com potencial para serem utilizadas com o tal propósito. Porém, nenhuma delas é uma espécie padrão adotada por agências ambientais locais.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Gerais**

Verificar a potencialidade de adequação do *Kalliapseudes schubartii* da Lagoa de Itaipu às condições de laboratório para ser utilizado em testes toxicológicos com sedimento contaminado com petróleo.

## **2.2. Específicos**

- 1) Determinar as condições ótimas de temperatura e salinidade do *K. schubartii* para manter a população dessa espécie sob boas condições fisiológicas;
- 2) Verificar a melhor dieta alimentar para o *K. schubartii*.
- 3) Analisar o grau de sensibilidade do *K. schubartii* através de testes de toxicidade com as substâncias de referência zinco e dodecil sulfato de sódio;
- 4) Realizar teste de toxicidade aguda com sedimento contaminado com petróleo para determinar a CL50/96h sob o *K. schubartii* com base nos testes de sensibilidade.

## **3. APLICABILIDADE**

---

A utilização de testes ecotoxicológicos com *Kalliapseudes schubartii* e sedimentos contaminados com petróleo, apresentam as seguintes aplicações:

- estimar o impacto agudo ou crônico da poluição por petróleo em um ambiente sedimentar específico a partir da avaliação de sua toxicidade sob o organismo-teste;
- testes agudos com *K. schubartii* podem integrar o componente “toxicidade” da “Tríade de Qualidade de Sedimentos”;
- favorecer a identificação e o mapeamento de locais com maior ou menor nível de degradação, sendo importante instrumento para estudos de impacto ambiental e programas de monitoramento de qualidade ambiental;
- gerar dados que auxiliem no estabelecimento de critérios para qualidade de sedimentos;
- gerar dados que auxiliem na formação de estratégias e metodologias corretas para recuperar e/ou preservar o ambiente marinho e estuarino estudado;
- gerar dados que auxiliem o estabelecimento de limites para o descarte e/ou lançamento de efluentes com petróleo no mar, principalmente nas regiões costeiras.

#### **4. A ESPÉCIE *Kalliapseudes schubartii***

---

A ordem Tanaidacea, incluída na subordem Peracarida, é o menor grupo dentre os crustáceos Eumalacostracos (Ogle *et. al.*, 1982).

Os tanaidáceos são crustáceos bentônicos que até o presente momento foram encontrados a partir da desembocadura do Rio da Prata, no Uruguai, até a Ilha Grande (RJ), no Brasil (Lang, 1956; Almeida, 1994). A maioria dos tanaidáceos habitam a zona litorânea, ocorrendo da zona entremarés até a região abissal, podendo fazer parte da infauna, fauna epibêntica e epifauna (Holdich & Jones, 1983).

Os tanaidáceos vivem enterrados no sedimento, construindo tubos em forma de U ou vivendo em pequenos orifícios ou fendas nas rochas (Barnes, 1996; Gardiner, 1975; Johnson & Attramadal, 1982).

Os tanaidáceos, em geral, são depositívoros, sendo o seu principal alimento detritos e organismos associados, porém, existem tanaidáceos suspensívoros que se alimentam de algas, diatomáceas e outros materiais que estejam ao redor das aberturas de seus tubos (Ogle *et. al.*, 1982).

Os tanaidáceos suspensívoros pertencem à família Kalliapseudidae, que inclui a espécie *Kalliapseudes schubartii*. O tanaidáceo bentônico *Kalliapseudes schubartii* apresenta alta densidade e abundância em diversos pontos do litoral brasileiro. Lana & Guiss (1991) e Couto *et. al.*, (1995) observaram que na Baía de Paranaguá (PR) esta espécie é praticamente dominante durante todo o ano. Leite (1995) encontrou um resultado semelhante na Praia do Araçá (SP) e Rosa-Filho & Bemvenuti (1998) observaram que *K. schubartii* é a espécie dominante na Lagoa dos Patos (RS). Nucci (2001) observaram esta espécie sendo a mais abundante e com maior densidade em praias com sedimento fino a muito fino no Canal de São Sebastião (SP).

O *K. schubartii* também pode construir seus tubos em áreas compostas basicamente por areia, com baixas proporções de silte e argila. Em locais como estes *K. schubartii* constrói seus tubos em menores profundidades em relação às áreas onde o sedimento é mais fino (Rosa-Filho & Bemvenuti, 1998).

A espécie *K. schubartii* faz parte da dieta alimentar de vários organismos, entre eles o siri-azul (*Callinectes sapidus*), o camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) e o bagre marinho (*Netuma* sp), além de compor mais de 90% da dieta alimentar da corvina (*Micropogonias furnieri*) (Araújo, 1987; Couto *et. al.*, 1995; Figueiredo, 1996).

Do ponto de vista reprodutivo, os tanaidáceos desenvolvem seus embriões e larvas em uma bolsa marsupial presente nas fêmeas, de onde emergem juvenis totalmente desenvolvidos ou em estágios larvais avançados (Thiel, 1999) (Figura 1). O juvenil passa por dois estágios larvais (manca I e II) e um estágio “neutro” (manca III ou “neutra”) (Ogle, 1982). Este estágio juvenil “neutro” pode desenvolver-se em macho ou fêmea. Quando machos estão presentes na população, os juvenis (no estágio “neutro”) sofrem metamorfose somente para fêmeas. Quando machos estão ausentes na população, juvenis desenvolvem-se tanto machos como fêmeas (Modlin & Harris, 1989). Além disto, durante a ausência de machos, fêmeas podem potencialmente tornar-se machos. Estes machos secundários diferem levemente na morfologia em relação ao primeiro (Holdish & Jones, 1983; Leite & Leite, 1997). Casos como este são chamados de protogenia, isto é, reversão de sexo de fêmea para macho. Dentre os tanaidáceos, a protogenia parece estar associada a três características: (1) pouca mobilidade das fêmeas, (2) baixa

abundância de machos, devido à alta mortalidade e (3) intensa competição entre machos (Highsmith, 1983).

Em relação à competição, a protogenia pode surgir quando machos pequenos são impedidos por machos maiores de copular com a fêmea, sendo vantajoso tornar-se macho somente quando atingir um tamanho que possa competir com outros machos (Warner, 1988). Segundo Leite & Leite (1997), o *K. schubartii* apresenta duas formas distintas de machos, indicando que esta espécie poderia ser um hermafrodita em potencial. Existem poucos estudos que analisaram os estágios do desenvolvimento marsupial e pós-marsupial, ciclo de vida e fase larval de espécies de tanaidáceos, incluindo a espécie *K. schubartii*. Tais estudos são importantes, principalmente quando se tem em vista a utilização desta espécie em testes ecotoxicológicos.

Zamboni & Costa, (2002) citam que pela posição trófica, por ser parte da infauna de ambientes estuarinos, ser escavador e suspensívoro, *K. schubartii* credencia-se como organismo para teste de ecotoxicidade, pois tem relação de total dependência com o sedimento e com os contaminantes encontrados nas suas diferentes fases.



Figura 1: Tanaidaceo bentônico *Kalliapseudes schubartii*.

## **5. O PETRÓLEO E O ECOSSISTEMA MARINHO**

---

Dentre todos os produtos químicos o petróleo é um dos mais preocupantes em termos ambientais, principalmente pelos efeitos tóxicos potenciais à diferentes organismos.

Atualmente, o petróleo é o mineral marinho mais explorado no Brasil (CIÊNCIA-HOJE, 2003), sendo que o setor brasileiro de petróleo e gás demonstra, a cada ano, enorme potencial de crescimento econômico-financeiro, devido principalmente ao sucesso exploratório de novos campos petrolíferos no território nacional.

O petróleo é formado por uma mistura de compostos orgânicos gasosos, líquidos e sólidos. Ao todo, 75% do óleo cru e refinado, possuem hidrocarbonetos de peso molecular que varia entre 16 a 20.000, divididos em quatro classes: n-alcanos ou parafinas, isoparafinas ou alcanos ramificados, cicloalcanos e aromáticos. Compostos contendo oxigênio, nitrogênio, enxofre e metais completam os 25 % das substâncias restantes do produto (Albers, 1995).

É difícil determinar a quantidade total de petróleo que chega ao ambiente marinho, mas estima-se que são aproximadamente 1,7 a 8,8 milhões de toneladas métricas por ano (Flores, *et. al.*, 1998). Este tipo de poluição marítima pode ser proveniente de diversas fontes (Tabela 1).

Tabela 1: Percentual estimado de diferentes fontes de poluição marítima por petróleo (Clark 1997)

<b>Transporte</b> (operações com navios, acidentes com petroleiros, despejos de lastro)	23.5%
--	-------

<b>Instalações fixas</b> (refinarias costeiras, explorações “off-shore”, terminais)	7.6%
<b>Fontes naturais</b>	10.6%
<b>Transferência de poluição atmosférica para o mar</b>	12.7%
<b>Outras fontes</b> (descargas urbanas, municipais, industriais)	45.6%

Quando o petróleo entra em contato com a água superficial marinha, vários são os processos físico-químicos que atuam alterando sua composição e toxicidade tais como: evaporação, dissolução, oxidação fotoquímica, dispersão, emulsificação e sedimentação (Figura 2) (Crapez, 2001).

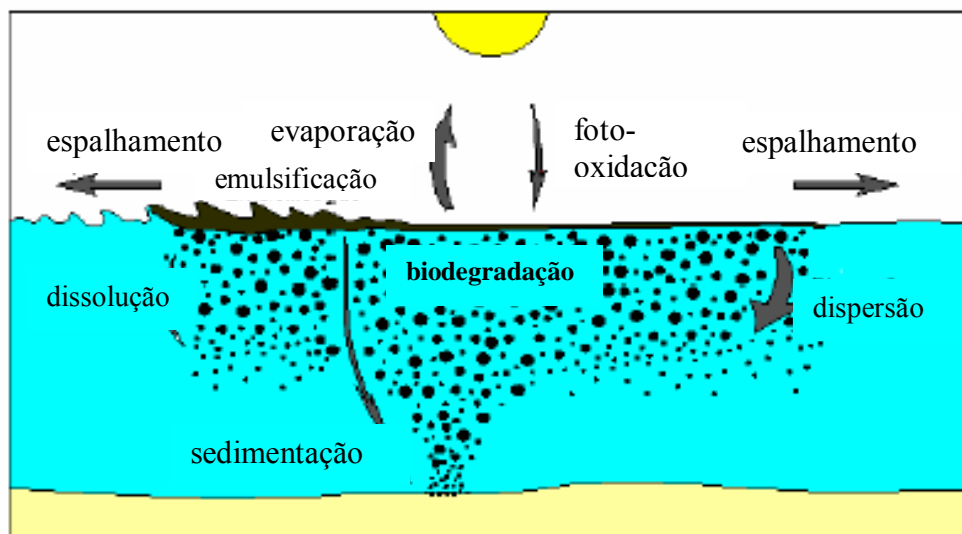


Figura 2: Comportamento de óleo derramado no mar e principais processos envolvidos (ITOPF, 2003).

A composição do petróleo condiciona fortemente a sua toxicidade. As diversas frações do óleo relacionam a sua toxicidade, em curto prazo, com os produtos destilados; e em longo prazo, com os produtos de ação lenta; e de um modo indireto, com os produtos degradados biologicamente (biodegradação)

ou por processos físico-químicos (oxidação fotoquímica). Assim, nos produtos refinados, a toxicidade é maior naqueles com ponto de ebulição mais baixo, enquanto que nos óleos crus, as frações mais voláteis (que são mais solúveis na água) e os compostos aromáticos são mais tóxicos. Estes compostos aromáticos – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) - apresentam diversas características nefastas, entre as quais o fato de serem mutagênicos (quanto maior a fração de PAH na constituição do óleo cru, mais pronunciado este efeito), e carcinogênicos para os mamíferos, porque ativam metabólicos no organismo (Costa, 1999).

Durante o processo de emulsificação, o petróleo modifica-se quanto a sua densidade facilitando sua incorporação à matéria orgânica particulada suspensa na água, formando aglomerados que eventualmente tendem a descer a superfície sedimentar. Crapez (2001) cita que “uma vez no sedimento o óleo pode persistir e exceder 1000 vezes, ou mais que a concentração encontrada na coluna d’água em águas não sujeitas à poluição antropogênica”.

Em áreas de baixa circulação, declividade e com sedimento fino, como os mangues e marismas, o petróleo penetra facilmente no sedimento através dos orifícios abertos por crustáceos, moluscos, anelídeos e raízes das plantas. Estes orifícios auxiliam no processo de oxigenação do meio, porém, em caso de derrames, terminam por promover uma maior percolação do óleo no sedimento. Crapez (2001) cita que “este fenômeno debilita a estabilidade do bentos, diminuindo a oxigenação local, restringindo a degradação bacteriana, diminuindo a diversidade local e dificultando a recuperação ambiental”. Como consequência, as espécies nativas e/ou endêmicas podem desaparecer.

Os prejuízos em relação a pesca são importantes, uma vez que os peixes desaparecem das zonas atingidas e, na maior parte das vezes, esta atividade é suspensa durante algum tempo. Os efeitos na aquicultura, crustáceos e moluscos também são enormes. As espécies filtradoras (como os moluscos) ingerem grande quantidade de tóxicos e morrem, convertendo-se em animais impróprios para consumo humano, com o conseqüente prejuízo para as pessoas que vivem da sua comercialização.

Os prejuízos podem abalar a confiança no mercado, visto que os consumidores podem mostrar receio em adquirir produtos afetados pelo acidente. Surgem assim restrições e punições à atividade de pesca após o derrame, com o intuito de assegurar a confiança no mercado e assegurar a não exploração de recursos contaminados. Um derrame de óleo pode ainda provocar danos diretos nas embarcações e respectivos motores usados na pesca.

### **5.1. A Situação Brasileira**

Devido às explorações de novos campos petrolífero no Brasil, o transporte de petróleo aumentou significativamente em vias marítimas. A principal preocupação com o transporte de petróleo pelo mar está relacionada aos possíveis acidentes com derrames e suas conseqüências.

Nas últimas décadas, em território nacional, um grande número de vazamentos acidentais de óleo ocorreu em operações rotineiras com pequena, média e grande gravidade. Os vazamentos são classificados de pequeno porte

quando a quantidade de óleo é menor que  $< 1\text{m}^3$ , e de grande porte quando a quantidade de óleo de óleo é  $>1000\text{m}^3$  (MARINHA/BRASIL, 2002).

A Tabela 2 mostra os principais acidentes com derramamento de petróleo ou derivados no Brasil, assim como, quantidade, produto e o local do derrame (AMBIENTE/BRASIL, 2003).

Tabela 2: Descrição dos principais acidentes com derramamento de petróleo ou derivados no Brasil, assim como quantidade derramada, tipo do produto e local do derrame.

<b>Data</b>	<b>Quantidade e Produto</b>	<b>Local</b>
<b>Março de 1975</b>	6 mil toneladas de petróleo	baía de Guanabara, RJ
<b>Outubro de 1983</b>	3 milhões de litros de	Betioga, SP

	petróleo	
<b>Julho de 1992</b>	10 mil litros de petróleo	rio Cubatão, SP
<b>Mai de 1994</b>	2,7 milhões de litros petróleo	Praias do litoral norte paulista
<b>Março de 1997</b>	2,8 milhões de óleo combustível	baía de Guanabara, RJ
<b>Agosto de 1997</b>	2 mil litros de óleo combustível	Ilha do Governador, RJ
<b>Outubro de 1998</b>	1,5 milhão de litros de óleo combustível	rio Alambari
<b>Agosto de 1999</b>	3 mil litros de petróleo	rio Igarapé do Cururu e rio Negro, AM
<b>Agosto de 1999</b>	1000 litros de óleo combustível	rio Negro, AM
<b>Novembro de 1999</b>	Óleo combustível	rio Siriri, SE
<b>Janeiro de 2000</b>	1,3 milhão de óleo combustível	baía de Guanabara
<b>Janeiro de 2000</b>	200 litros de óleo diluente	rio Cubatão, SP
<b>Fevereiro de 2000</b>	500 litros de petróleo	rio Paraíba
<b>Março de 2000</b>	18 mil litros de petróleo cru	Praia de Jardim do Éden, RS
<b>Março de 2000</b>	7.250 litros de petróleo	São Sebastião, SP
<b>Junho de 2000</b>	380 litros do combustível	baía de Guanabara
<b>Julho de 2000</b>	4 milhões de litros de petróleo	rios Barigüi e Iguaçu, PR
<b>Julho de 2000</b>	60 mil litros de óleo diesel	Ponta Grossa, PR
<b>Julho de 2000</b>	20 mil litros de óleo diesel	Ponta Grossa, PR
<b>Setembro de 2000</b>	4 mil litros de combustível	córrego Caninana
<b>Novembro de 2000</b>	86 mil litros de petróleo	São Sebastião e Ilhabela, SP
<b>Fevereiro de 2001</b>	4.000 mil litros de petróleo diesel	Córrego Caninana, afluente do Rio Nhundiaquara
<b>Abril de 2001</b>	30 mil litros de petróleo	BR-277 entre Curitiba e Paranaguá
<b>Mai de 2001</b>	35 mil litros de óleo diesel	Área de Preservação Ambiental de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
<b>Mai de 2001</b>	200 mil litros de petróleo	Rio Tietê e do Córrego Cachoeirinha, SP.
<b>Agosto de 2001</b>	715 litros de petróleo	Baía de Ilha de Grande, Angra dos Reis, RJ.
<b>Outubro de 2001</b>	150 litros de petróleo	em São Francisco do Sul, no litoral norte de Santa Catarina.
<b>Outubro de 2001</b>	392 mil litros de petróleo	baía de Paranaguá, PR
<b>Fevereiro de 2002</b>	50 mil litros de óleo combustível	Baía de Guanabara, Rio de Janeiro
<b>Mai de 2002</b>	16 mil litros de petróleo leve	baía de Ilha Grande, na região de Angra dos Reis, RJ
<b>Junho de 2002</b>	15 mil litros de petróleo	região metropolitana de Curitiba, PR
<b>Agosto de 2002</b>	Três mil litros de petróleo	São Sebastião, SP.

## 5.2. A Legislação Brasileira

As atividades do setor petrolífero são controladas em termos ambientais pelo IBAMA, e têm como referência, entre outros instrumentos, as Resoluções CONAMA 20 de 18/06/1986, CONAMA 23 de 07/12/1994, CONAMA 237 de 19/12/1997 e CONAMA 293 de 12/12/2001.

A Resolução CONAMA 20 de 18/06/1986 é genérica e aplica-se a todos os efluentes e substâncias lançados em corpos hídricos receptores. Esta Norma classifica as águas doces, salobras e salinas com base em seus usos preponderantes em nove classes. Para cada classe foram estabelecidos limites e condições específicas com base em parâmetros físicos, físico-químicos, biológicos (coliformes totais e fecais) e químicos. As águas marinhas são classificadas como 5 e 6. O Artigo 21 desta mesma Resolução cita que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, diretos ou indiretamente nos corpos de água, desde que obedçam às condições especificadas no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros de enquadramento para descartes de efluentes – Artigo 21 da Resolução CONAMA 20/86.

<b>pH e oxigênio dissolvido</b>	Entre 5 e 9; e $\geq 5$ mg/l respectivamente
<b>Temperatura</b>	Inferior a 40°C, sendo que a elevação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 30°C.
<b>Materiais sedimentáveis</b>	Até ml/l em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausente.
<b>Regime de lançamento</b>	Com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor.
<b>Óleos e Graxas</b>	Óleos minerais até 20 mg/l Óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/l.
<b>Materiais flutuantes</b>	Ausentes

**Valores máximos admissíveis das seguintes substâncias (mg/l)**

Amônia	5,0 N
Arsênio total	0,5 As
Bário	5,0 Ba
Boro	5,0 B
Cádmio	0,2 Cd
Cianetos	0,2 Cn
Chumbo	0,5 Pb
Cobre	1,0 Cu
Cromo Hexavalente	0,5 Cr
Cromo Trivalente	2,0 Cr
Estanho	4,0 Sn
Índice de Fenóis	0,5 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
Ferro Solúvel	15,0 Fe
Fluoretos	10,0 F
Manganês solúvel	1,0 Mn
Mercúrio	0,01 Hg
Níquel	2,0 Ni
Prata	0,1 Ag
Selênio	0,05 Se
Sulfetos	1,0 S
Sulfitos	1,0 SO <sub>3</sub>
Zinco	5,0 Zn
Compostos Organofosforados e carbamatos totais	1,0 em Paration
Sulfeto de Carbono	1,0
Tricloroeteno	1,0
Clorofórmio	1,0
Tetracloroeto de Carbono	1,0
Dicloroeteno	1,0
Compostos Organoclorados não listados acima (pesticidas, solventes, etc)	0,05

Apesar de não ter utilizado o termo toxicidade, o artigo 12 da Resolução CONAMA 20 de 18/06/1986 ressalta que “os padrões de qualidade estabelecidos nesta Resolução constituem-se em limites individuais para cada substância, e considerando as eventuais ações sinérgicas entre as mesmas, estas ou outras não especificadas, não poderão conferir às águas características capazes de causarem efeitos letais ou alterações de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida”. Veiga (1998) complementou esta informação citando que “esta exigência, no entanto, somente pode ser cumprida com aplicação de testes de toxicidade aos efluentes. Entretanto, esta é uma condição ainda difícil de ser atendida, uma vez que, no Brasil, ainda não se tem definido, em legislação específica os organismos-teste a serem utilizados, e também não possui as metodologias de testes de toxicidade padronizadas juntamente com os limites de toxicidade para efluentes e substâncias químicas a serem atendidos”. Desta forma, os órgãos de controle ambiental acabam se limitando a exigirem o cumprimento dos artigos 19 e 20 que requer análises químicas detalhadas, tanto do efluente, como da água do corpo receptor, tomando por base a lista das condições e limites de concentrações de substâncias químicas descritas nos mesmos.

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **6.1. Caracterização do Local de Coleta**

A Lagoa de Itaipu é um corpo d'água costeiro semi-fechado, de forma circular, com cerca de 1,5 km<sup>2</sup> de espelho d'água. Está localizada no litoral setentrional do município de Niterói, estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22° 57'S e 22° 59'S e as longitudes 43° 01'W e 43° 03'W, sendo a segunda de uma série de lagunas costeiras que se distribuem ao longo do litoral em direção norte.

Esta Lagoa constitui parte do sistema lagunar Piratininga-Itaipú, composto por duas lagunas interligadas por um canal aberto artificialmente na década de 40, denominado canal de Camboatá.

A Lagoa de Itaipu possui um canal de maré que permite uma comunicação com o oceano de caráter restrito, constituindo-se em uma laguna costeira do tipo "Choked Lagoon", segundo Kjerfve (1986). Sua batimetria é bastante alterada, fruto de ações antrópicas que a Lagoa sofreu ao longo dos anos.

Muhe & Albuquerque em 1976 mapearam o fundo lagunar plano, apresentando profundidades não superiores a 90 centímetros de lâmina d'água. Já em 1986, após a abertura e fixação de sua barra, a profundidade chegava, em decorrência das dragagens, a mais de 6 metros no interior da laguna e a 1,5 metros no canal de maré (INPH, 1991).

A hidrodinâmica da região da enseada de Itaipu, que exerce influência sobre o padrão de circulação e grau de agitação das águas lagunares é pouco conhecida, sendo a maioria dos dados utilizados em estudos na região provenientes de cálculos matemáticos baseados nos poucos parâmetros já levantados. A Lagoa é pouco sujeita à ação da força geradora de marés, assim, os principais fatores que atuam no padrão de circulação lagunar são as correntes de maré, e de modo bem subordinado, as correntes geradas por ventos (Lavenère-Wanderley, 1999).

A distribuição granulométrica dos sedimentos superficiais na Lagoa de Itaipu apresenta-se bastante segmentada. Lavenère-Wanderley (1999) identificou cinco classes granulométricas na composição do sedimento de fundo, através da utilização do diagrama triangular de Shepard (1954). Dentre as 5 classes, a mistura entre areias e argilas com silte em quantidade subordinada foi mais representativa. Esta distribuição de classes granulométricas do sedimento de fundo da Lagoa mostra a influência da circulação lagunar e da topografia de fundo na decomposição e retrabalhamento dos sedimentos sobre o fundo lagunar. O sedimento argiloso predominando sobre o fundo lagunar, onde a batimetria é mais suavizada, caracteriza um ambiente de baixa energia e demonstra a influência da dinâmica sobre a deposição dos sedimentos.

Os exemplares de *Kalliapseudes schubartii* foram coletados na região mesolitoral da Lagoa de Itaipú, nas coordenadas, latitude 22° 28' e longitude 43° 02' 39'' (Figura 3).



Figura 3: Área de coleta. A seta indica a localização exata do ponto de coleta do *Kalliapseudes schubartii* na Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ.

## 6.2. Adequação do *Kalliapseudes schubartii* às condições de laboratório

### 6.2.1. Coleta e aclimação

Os exemplares de *Kalliapseudes schubartii* foram coletados numa profundidade aproximada de 15 cm da superfície sedimentar. Os organismos

obtidos foram acondicionados em caixa de isopor contendo uma camada de sedimento local e água do mar, para transporte ao laboratório.

No laboratório, os organismos foram separados visualmente por tamanho. Indivíduos variando entre 0,7 a 1,0 cm de comprimento (excetuando as fêmeas ovígeras quando presentes) foram selecionados, sendo que, de cada lote separado, foi extraída uma sub-amostra por quarteamento (quantidades iguais de indivíduos divididas em quatro partes. Um dos quartos resultantes foi escolhido para nova divisão em quatro partes e assim por diante, cessando-se quando o volume dos quartos for de aproximadamente 10% dos organismos do primeiro quarteamento) para efetuar a medição (Zamboni & Costa, 2002). Em seguida, os indivíduos selecionados passaram por um período mínimo de 48 horas num processo de aclimação, dentro de uma incubadora JP1000 (Prolab), com fotoperíodo de 12 horas luz, aeração constante e alimentação. Para isso, béqueres com capacidade de 1 litro foram previamente preparados com 250g de sedimento de manutenção e 500ml de água de manutenção, onde foram colocados aproximado 30 indivíduos. A temperatura e salinidade foram previamente estabilizadas nas combinações desejadas aos testes.

No laboratório toda água seguiu um processo de limpeza descrito por Badaró-Pedroso (1999) e USGS/BRD (1997) com adaptações. A água foi filtrada em papel de filtro com porosidade de 2  $\mu\text{m}$ , e posteriormente com filtro de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade. A adaptação proposta se refere a um processo de autoclavagem por 30 minutos em temperatura de 121°C para eliminação de fungos, microalgas e bactérias. A água filtrada e autoclavada foi definida como água de manutenção.

Todo sedimento utilizado foi retirado do local de coleta dos organismos. No laboratório, o sedimento seguiu um processo de limpeza descrito por Hernandez *et al.*, (2000) com adaptação. O sedimento foi enxaguado com água destilada, seco, e limpo com água do mar filtrada. Este processo foi realizado para extrair componentes (pedaços de madeira, plásticos, outros organismos etc.) que pudessem influenciar o experimento. A adaptação proposta se refere a um processo de autoclavagem por 30 minutos em temperatura de 121°C para esterilização de fungos e/ou bactérias. O sedimento limpo e autoclavado foi definido como sedimento de manutenção.

#### **6.2.2. Testes com Variáveis Ambientais**

O objetivo desses testes foi definir as condições mais adequadas para manutenção da espécie em laboratório, bem como buscar uma maior compreensão das respostas às variáveis ambientais mais significativas, temperatura e salinidade (Suresh *et al.*, 1995; Ismael e Moreira, 1997; Segnini de Bravo *et al.*, 1998; Drent, 2002). Para isso, organismos previamente aclimatados, que apresentavam aspecto saudável e comportamento normal (capacidade de construir tubos e de movimento) foram expostos a diferentes temperaturas (18, 22, 25 e 28 °C) e salinidades (15, 25 e 35), combinadas entre si, num total de 12 tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos tratamentos experimentais, com as combinações entre temperaturas e salinidades testadas.

<b>Tratamentos</b>	<b>Temperaturas</b>	<b>Salinidades</b>
1	18	15
2	18	25
3	18	35
4	22	15
5	22	25
6	22	35
7	25	15
8	25	25
9	25	35
10	28	15
11	28	25
12	28	35

Para realização dos testes utilizou-se 500 ml de água de manutenção, e 250 g de sedimento de manutenção, em recipiente tipo béquer com capacidade de 1 litro. Vinte e quatro horas antes do início dos testes, os recipientes passaram por um processo de estabilização quanto a aeração, temperatura e salinidade desejadas. Em seguida, 10 indivíduos foram colocados nos respectivos béqueres, e observados durante 2 horas, sendo que os animais mortos ou que não apresentavam capacidade para construir tubos foram substituídos (Figuras 4 e 5).



Figura 4: Vista da parte superior do béquer mostrando alguns pontos onde o *Kalliapseudes schubartii* construiu tubos.

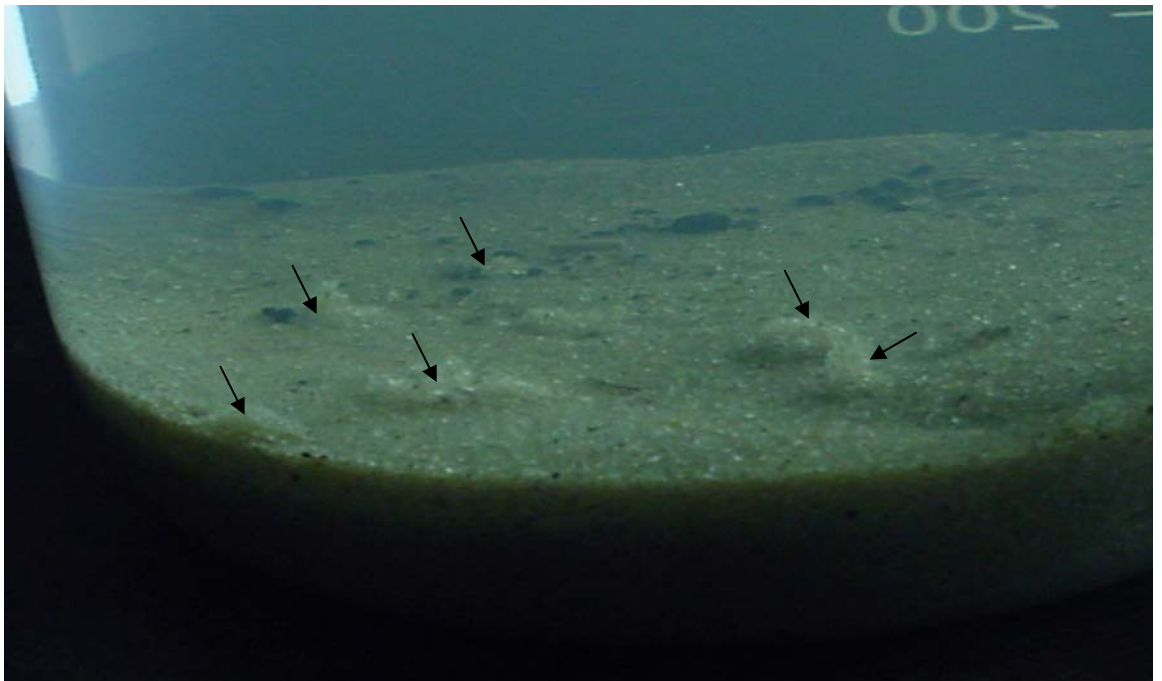


Figura 5: Vista da parte lateral do béquer mostrando alguns pontos onde o *Kalliapseudes schubartii* construiu tubos.

Para aferição diária das salinidades utilizou-se um refratômetro Shibuia e para controle diário da temperatura utilizou-se um termômetro de mínima e máxima no interior da incubadora.

Quando a salinidade apresentou-se acima da faixa desejada para o teste, o ajuste foi feito diluindo a água de manutenção a cada 4 horas, baixando de 4 a 5 unidades de salinidade a cada adição de água doce destilada e altamente purificada por filtração e autoclavagem (Zamboni & Costa, 2002). Em nenhum momento foi necessário ajustar a salinidade à faixa acima da desejada.

Ao final de cada etapa experimental, os recipientes foram retirados da incubadora. Em seguida, a água foi levemente remexida com uma espátula de vidro. Este processo possibilitou a obtenção do sedimento (despejado num recipiente plástico com 30cm de largura por 10cm de altura), sem que os organismos sofressem algum dano. Posteriormente, os organismos puderam ser observados para quantificação do número de mortos nos respectivos tratamentos experimentais.

### **6.3. Alimentação**

O preparo da dieta alimentar do *Kalliapseudes schubartii*, seguiu a metodologia descrita por Costa (1997), com adaptações.

A alimentação dos organismos foi mantida a cada 48 horas com uma solução composta com 0,25ml de ração em flocos para peixes tropicais, e ração microfloculada para alevinos, acrescida com 0,15ml de cultivo da microalga *Tetraselmis gracilis* em concentração de  $1 \times 10^5$  células/500ml.

### **6.3.1. Preparo da dieta alimentar**

#### **6.3.1.1. Ração em flocos para peixes tropicais**

Diluíram-se 5g de ração em flocos para peixes tropicais macerada, em 1000ml de água destilada. A mistura foi agitada mecanicamente até obter uma suspensão homogênea, a qual permaneceu decantando por aproximadamente 12 horas. Ao final das 12 horas, o sobrenadante foi filtrado em malha de 0,45 micrômetro obtendo assim a primeira solução.

#### **6.3.1.2. Ração microfloculada de alevinos**

Diluíram-se 24g de ração microfloculada de alevinos e 7g de fermento biológico tipo ‘Fleischmann‘ em 1000ml de água de manutenção. A mistura foi agitada mecanicamente até obter uma suspensão homogênea, a qual permaneceu decantando por aproximadamente 12 horas. Ao final das 12 horas, o sobrenadante foi filtrado em malha de 0,45 micrômetro obtendo-se a segunda solução.

Ambas as soluções (primeira e segunda) foram misturadas em quantidades iguais e congeladas em frascos de polietileno com capacidade de 50ml.

Este material pode ser utilizado por até seis meses, sendo que, uma vez descongeladas, as soluções podem ser utilizadas no máximo em sete dias.

### 6.3.1.3. Condições de cultivo e manutenção da microalga

#### *Tetraselmis gracilis*

A espécie de microalga utilizada neste estudo foram obtidas da Coleção de Microalgas “Elizabeth Aidar”, do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

O meio de cultura utilizado para cultivo e manutenção da microalga *Tetraselmis gracilis* foi o meio f/2 (Tabela 4) (Gullard & Ryther, 1962) que é amplamente empregado na manutenção de estoques e em experimentos de laboratório. Este meio consiste em água do mar enriquecida com nutrientes inorgânicos e orgânicos de composição conhecida.

Tabela 4: Descrição e concentrações das substâncias utilizadas na produção do meio de cultura f/2.

Nitrato (Solução estoque)	1 ml
Fosfato (Solução estoque)	1 ml
Silicato (Solução estoque)	1ml*
Metais traço (Solução estoque)	1 ml
Vitaminas (Solução estoque)	1 ml
Água do mar	1000 ml **

\* Utilizam-se 2 ml/l da solução estoque de Silicato;

\*\* Faz-se uma diluição de 20 % com água destilada, para compensar a evaporação que ocorre durante a autoclavagem.

Para a preparação do meio de cultivo foi utilizada água do mar filtrada autoclavada a 121°C por 30 minutos. Ao fim da autoclavagem foi feita a mistura do meio com as soluções estoque (Tabela 5), nas proporções adequadas. Sendo logo em seguida procedido à repicagem com a microalga *Tetraselmis gracilis*. O tempo máximo entre o fim da autoclavagem e a

inoculação da cultura foi de 24 horas para equilíbrio da dissolução de gases no meio.

Tabela 5. Substâncias e concentrações utilizadas no preparo das soluções estoque.

---

<b>Solução estoque de Macronutrientes</b>	
1. NaNO <sub>3</sub>	7,5 g / 100 ml
2. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,5 g / 100 ml
3. Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9H <sub>2</sub> O	1,0 g / 100 ml

<b>Solução estoque de Metais Traço</b>	
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,98 g
ZnSo <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,20 g
CoCl <sub>2</sub> . H <sub>2</sub> O	1,05 g
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	18,0 g

<b>Solução estoque de Vitaminas</b>	
Tiamina	100 g
Biotina	0,5 g
Vitamina B12	0,5 g

---

O cultivo e a manutenção da microalga foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500ml de capacidade contendo 250ml de meio de cultura. Recebendo lateralmente uma radiação luminosa de aproximadamente 35 Em<sup>2</sup>.s<sup>1</sup> (medido com um radiômetro Li-Cor, modelo LI-185B) fornecida por lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo de 12 horas luz (Figura 6). A temperatura do laboratório variou aproximadamente entre 18 e 20°C. Diariamente, os frascos foram agitados manualmente induzindo o aumento da reprodução da microalga.



Figura 6: Aspecto da câmara de cultivo de microalgas. As setas indicam a espécie *Tetrastelmis gracilis*.

#### 6.4. Testes com Substâncias de Referência

A determinação da sensibilidade do *Kalliapseudes schubartii* às substâncias de referência seguiu a metodologia descrita em Zamboni e Costa (2002), com adaptações.

O processo de coleta, seleção e aclimação dos organismos utilizados nos ensaios de rotina seguiram metodologia descrita no item 6.2.1.

Os testes de sensibilidade foram divididos em preliminar e definitivos. O preliminar objetivou estimar a faixa de concentração mais provável para a ocorrência de efeito agudo. Determinada esta faixa, os testes definitivos foram realizados com uma série de concentrações de cada substância tóxica, cujos intervalos foram calculados por progressão geométrica com uma razão K.

Assim, os testes de sensibilidade com *K. schubartii* foram agudos, num sistema estático por um período de 96 horas.

Para cada concentração tóxica nos ensaios de rotina, foram utilizados recipientes de polietileno de alta densidade, contendo 180ml de solução e 5 organismos cada, repetidas 3 vezes. Durante os testes, não foi fornecida alimentação, nem aeração, e a temperatura foi mantida constante em  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob fotoperíodo de 12 horas luz.

A cada 24 horas foi realizada a leitura dos testes para a quantificação e remoção dos organismos mortos. A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência. A mortalidade dos animais foi identificada pela ausência de movimentos dos membros.

#### **6.4.1. Preparo das soluções-teste**

Para o dodecil sulfato de sódio foi preparada uma solução-estoque de 100mg/l, a partir da qual obtiveram-se as soluções-teste, nas seguintes diluições: 0,0; 0,1; 1,0; 10; 50 e 100mg/l. A solução-estoque preparada com o zinco foi de 200mg/l, sendo testadas as diluições de 0,0; 0,1; 1,0; 5,0; 10; 20 e 40mg/l.

#### **6.4.2. Validade do teste**

Os resultados foram considerados válidos, quando o percentual de sobrevivência no controle foi maior ou igual a 80% (Zamboni & Costa, 2002).

## 6.5. Testes de Toxicidade com Petróleo

O petróleo utilizado foi o “Canadon Seco”, fornecido pela Refinaria Mangueiras, RJ. O Canadon seco é um petróleo cru extraído na Argentina e classificado como leve, pois possui API de 26,3 (AGÊNCIAESTADO, 1999).

Os testes de toxicidade foram divididos em preliminar e definitivo. O preliminar objetivou estimar a faixa de concentração mais provável para a ocorrência de efeito agudo. Determinado esta faixa, os testes definitivos foram realizados com uma série de concentrações, cujos intervalos foram definidos independentemente de cálculos. Assim, o teste preliminar foi agudo, num sistema estático, por um período de 96 horas.

Num primeiro momento, o teste definitivo teve sua metodologia definida igualmente ao teste preliminar. Porém, após análise visual dos recipientes-teste nas primeiras 96 horas de exposição, verificou-se que o número de organismos mortos não foi suficiente para determinação da concentração letal. Neste caso decidiu-se aumentar esse período de exposição de 96h para 10 dias. Assim, este teste foi finalizado como crônico, num sistema estático, por um período de 10 dias.

Para cada concentração tóxica, foram utilizadas recipientes de polietileno de alta densidade com capacidade de 400ml, contendo 150g de sedimento de manutenção contaminado com petróleo, e 150ml de água de diluição. Foram inseridos 10 organismos em cada recipiente-teste e cada concentração foi repetida 4 vezes. Durante todo período experimental foi fornecida alimentação, aeração constante, temperatura de  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e fotoperíodo de 12 horas luz.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência. A morte dos organismos foi identificada pela ausência de movimentos dos membros.

#### **6.5.1. Preparo das soluções-teste e seleção dos organismos**

O método de preparo das soluções-teste seguiu a metodologia descrita por Tarzwell (1969). Cada concentração testada foi preparada de forma individual, ou seja, sem ocorrer diluição a partir de uma solução-estoque. As concentrações testadas foram 0, 10000, 50000, 100000 e 150000 ppm. Para isso, foram inseridos 0, 20, 60, 120 e 180 ml de óleo em 2 litros de água do mar filtrada em 0,45  $\mu$ m de porosidade. Cada mistura foi agitada em homogeneizador elétrico (Marca Hamilton Beach, modelo nº 936-1) (Figura 7), por 5 segundos a uma velocidade de 13.000 rpm, e colocado para decantar aproximadamente por 2 minutos. Após a decantação, a Fração Dispersa do óleo em Água (FDA) foi retirada sobrando apenas a Fração Óleo-Água (FOA) (Figura 8).



Figura 7. Agitador utilizado no preparo da Fração Óleo-Água.



Figura 8. Ilustração do contraste entre a Fração Óleo-Água e água do mar limpa.

Em seguida a FOA foi misturada no sedimento de manutenção. Este processo foi feito com auxílio de uma bateadeira elétrica, em baixa rotação, durante 10 minutos (Figura 9). O sedimento contaminado ficou em repouso e resfriado durante 24 horas. Após esse período, o sedimento foi homogeneizado manualmente, e dividido nas suas respectivas réplicas, sendo em seguida, inserida água do mar filtrada. Para tentar impedir uma ressuspensão

significativa da solução final do sedimento à coluna d'água, foi colocado um plástico na região superior do sedimento, o qual foi retirado cuidadosamente após inserção total da água (Figura 10). Em seguida foi realizado o processo de seleção aleatória dos organismos (Figura 11) e inserção de 10 organismos em cada réplica.



Figura 9. Processo de mistura do sedimento com a Fração Óleo-Água.



Figura 10. Plástico inserido no interior do béquer para evitar ressuspensão significativa do petróleo para a coluna d'água.

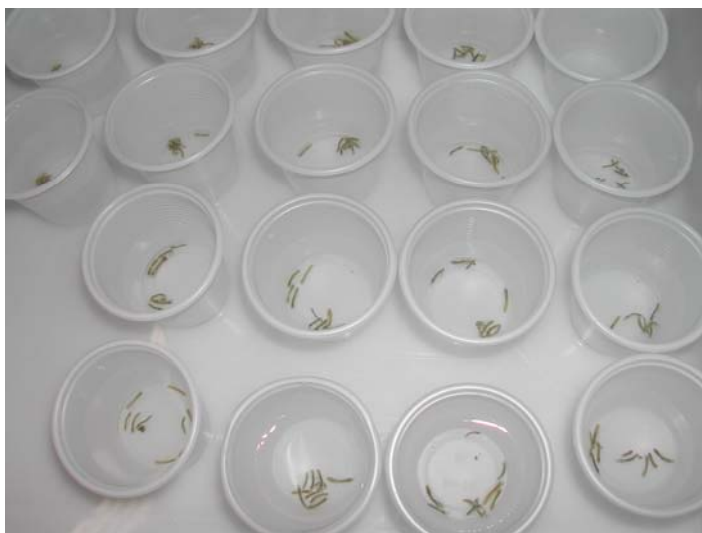


Figura 11. Demonstração dos organismos distribuídos aleatoriamente.

### **6.5.2. Validade do teste**

Os resultados foram considerados válidos, quando o percentual de sobrevivência no controle foi maior ou igual a 80% (Zamboni & Costa, 2002).

## **6.6. Caracterização Granulométrica e Análise de Matéria Orgânica**

Para caracterização granulométrica dos sedimentos utilizou-se o método de peneiramento e pipetagem descrito por Suguio (1973). As análises foram realizadas no Laboratório de Sedimentologia do Departamento de Geologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

As amostras de sedimento foram pesadas em quantidades iguais (60 g), lavadas para retirada de sais, e secas em estufa a 60°C sendo, em seguida, feito o quarteamento.

As frações grosseira e fina dos sedimentos foram selecionadas através de peneiramento em malha de 0,062 mm.

Os sedimentos menores que 16 mm e maiores que 0,062 mm foram analisados através do método da escala de Wentworth; isto é, peneirados em jogo de peneiras seguindo intervalos de  $\frac{1}{2}$  phi de abertura de malha.

Os sedimentos menores que 0,062 mm foram selecionados pelo método indireto da pipetagem baseado na Lei de Stokes.

Todos esses sedimentos foram posteriormente pesados em balança analítica.

A partir dos resultados obtidos, os sedimentos foram classificados às frações granulométricas em cascalho, areia, silte e/ou argila através do software SAG (Sistema de Análise Granulométrica).

Tendo como objetivo verificar se o processo de limpeza realizado modifica as características orgânicas do sedimento, foram analisadas duas amostras de sedimento, uma amostra do sedimento original e uma amostra de sedimento limpa (utilizada nos testes). Para isso, pesou-se 40g de cada sedimento em balança analítica. Em seguida, quantidades crescentes de peróxido de hidrogênio (100%) foram acrescentados nas amostras durante 1 hora. Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso para esfriar, limpas com água (retirada do peróxido) e colocadas para secar em temperatura ambiente e pesadas. A diferença de peso inicial e final foi calculada em porcentagem.

## **7. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS**

---

Paralelamente aos testes de toxicidade foram realizadas análises físico-químicas das amostras para caracterização de: potencial hidrogeniônico (pH) (pHmetro Analyser), oxigênio dissolvido (oxímetro Digimed) e salinidade (refratômetro Shibuya).

As aferições foram realizadas em uma réplica de cada diluição, no início e no final de cada etapa experimental.

## **8. CONTROLE DA QUALIDADE DOS ENSAIOS**

---

O efeito tóxico observado foi estabelecido baseando-se em objetivos que visam identificar uma resposta clara do organismo, inequívoca e facilmente mensurável, resultante da ação tóxica de um determinado tipo de petróleo.

Assim, para *K. schubartii*, o efeito final observado em cada teste foi a letalidade, expressa em CL50 para cada substância tóxica de referência e para o petróleo.

A sensibilidade dos organismos foi avaliada através de testes com substâncias tóxicas padrões, sendo estas, o dodecil sulfato de sódio e zinco.

A coleta da água de manutenção se fez através de galões de plástico com capacidade de 50 litros na praia de Itacoatiara, Niterói, RJ.

Os recipientes plásticos utilizados tanto nos testes de adequação e nos testes de toxicidade seguiram o processo de limpeza sugerido pela ASTM, (1990). Inicialmente foram lavadas uma única vez com detergente neutro, uma única vez com acetona, 3 vezes com água de torneira, ficando posteriormente de molho em ácido nítrico 10% por 12 horas, quando foram enxaguados 3 vezes com água destilada.

As vidrarias que tiveram contato com sedimento foram deixadas de molho por 15 minutos em água de torneira, esfregadas com escova e detergente de laboratório. Posteriormente foram enxaguadas duas vezes com água de torneira, deixadas de molho no ácido nítrico 10% por 12 horas, enxaguadas 2

vezes com água de torneira, enxaguadas 1 vez com acetona, enxaguadas duas vezes com água de torneira e 3 vezes com água destilada, quando foram colocadas a secar em estufa.

As soluções de ácido nítrico 10% foram utilizadas para limpeza de recipientes no máximo de 3 vezes (Anderson *et. al.*, 1990).

## 9. EXPRESSÃO DE RESULTADOS E CÁLCULOS ESTATÍSTICOS

---

Em todos os testes de toxicidade a expressão do resultado foi a CL50.

A CL50 é a resposta média de uma dada população teste, sendo uma estimativa da verdadeira concentração média letal ou efetiva da população inteira. Sempre que um valor de CL50 é dado, fornece também uma medida de variabilidade da população. Os limites de 95% de confiança são importantes, porque definem um intervalo, tal que, se fosse possível calculá-los repetidas vezes, com organismos teste da mesma população, 95% dos intervalos calculados incluiriam a verdadeira CL50 (APHA, 1995).

Valores de CL diferentes de 50% podem e têm sido usados para caracterizar a toxicidade de efluentes. No entanto, o efeito ao nível de 50% da população, e seu intervalo de confiança associado, pode ser calculado com maior grau de precisão. A razão disto é porque a curva típica de concentração-resposta apresenta maior linearidade, e, portanto menor variabilidade, ao nível de 50% de efeito, sendo o intervalo de confiança desta forma mais estreito (APHA, 1995).

O método estatístico utilizado para cálculo da CL50 foi o Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1978).

Os resultados obtidos nos testes de temperatura e salinidade foram analisados quanto à normalidade e homodasticidade. A partir daí, os dados

foram avaliados através de análise de variâncias (ANOVA) unidirecional, seguidos do Teste de comparação múltipla de Tukey (Nipper, 2002).

## 10. RESULTADOS

---

### 10.1. Estatística descritiva

Obteve-se pelo uso de estatística paramétrica. Para tanto, fez-se necessário transformar os dados visando atender as premissas de normalidade e homocedasticidade. Tentativas de transformações foram feitas para arcoseno, raiz e log. A normalidade não foi atingida em nenhum dos casos (Tabela 6), já a homecedasticidade foi alcançada através do arcoseno (Tabela. 7).

Segundo Underwood (1981), a normalidade não é uma premissa intransponível para aplicação de um teste de análise de variância. Sendo assim, manteve-se o uso da estatística paramétrica devido sua robustez em relação a um teste equivalente não-paramétrico.

Tabela 6. Número de sobreviventes analisados estatisticamente quanto a normalidade em arcoseno, raiz e log.

	<b>Shapiro-Wilk W</b>	<b>p</b>
<b>Arcoseno</b>	0,87821	0,00013***
<b>Raiz</b>	0,84708,	0,00002***
<b>Log</b>	0,84555	0,00002***

\*\*\* significativo em nível de 0,1%.

Tabela 7. Resultados de arcoseno analisados estatisticamente quanto a homocedasticidade.

	<b>Teste de Homocedasticidade</b>				
	<b>Hartley</b>	<b>Cochran</b>	<b>Bartlett</b>	<b>df</b>	<b>p</b>
<b>Arcoseno</b>	3,3548	0,3985	3,7902	3	0,2850 ns

ns: não significativo

## 10.2. Efeito da Temperatura e Salinidade

Os maiores valores de sobrevivência foram obtidos nos tratamentos 1, 2 e 3 chegando a 95% de sobrevivência. Os tratamentos 4, 5 e 6 também apresentaram resultados satisfatórios para o objetivo do trabalho, com 92,5, 92,5 e 87,5% de sobrevivência respectivamente (média de 91%). A diferença observada entre os tratamentos 1 a 6 não foi significativa (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência do *K. schubartii* entre os tratamentos 1 e 6 dos testes de temperatura e salinidade.

<b>Tratamentos</b>	<b>Temperaturas (°C)</b>	<b>Salinidades</b>	<b>Sobrevivência média (%)</b>
{1}	18	15	95ns
{2}	18	25	95ns
{3}	18	35	95ns
{4}	22	15	92,5ns
{5}	22	25	92,5ns
{6}	22	35	87,5ns

ns. Não significativo

O *K. schubartii* mostrou-se muito sensível quando exposto a temperaturas acima de 25°C, pois a média de sobrevivência foi de apenas 47% em 25°C (tratamentos 7 a 9) e 33% em 28°C (tratamentos 10 a 12). Nestes

casos, não foi observada diferença significativa entre esses tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência do *K. schubartii* entre os tratamentos 7 e 12 dos testes de temperatura e salinidade.

Tratamentos	Temperaturas	Salinidades	Sobrevivência média (%)
{7}	25	15	47,5ns
{8}	25	25	47,5ns
{9}	25	35	45ns
{10}	28	15	30ns
{11}	28	25	45ns
{12}	28	35	22,5ns

ns. Não significativo

Os resultados mostram que a temperatura é um fator limitante para o tanaidáceo *K. schubartii*, pois a média de sobrevivência (95; 91; 47 e 33%) diminuiu gradualmente com o aumento desta variável (18, 22, 25 e 28°C, respectivamente) (Figura 12).

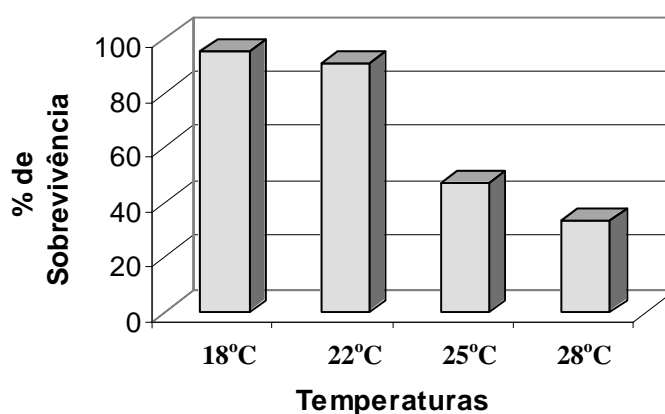


Figura 12. Diminuição gradual da porcentagem de sobrevivência do *K. schubartii* conforma aumento da temperatura nos testes de adequação.

Os resultados demonstram também que salinidades entre 15 e 35 não causam efeitos significativos na sobrevivência do *K. schubartii* (Tabela 10).

Os resultados de OD realizado no início e final dos testes demonstram estar dentro dos limites estabelecidos segundo Rabalis (1998) (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de oxigênio dissolvido (OD) analisado no início e final dos testes de temperatura e salinidade.

Tratamentos	OD (mg/l)	
	Início	Final
1	5,3	6
2	5,6	6,3
3	6	6,5
4	5,9	6,6
5	5,5	6,2
6	5,5	5,9
7	5,5	5,7
8	5,6	6,3
9	5,9	6,3
10	6	6,3
11	5,5	5,7
12	5,6	5,7

### 10.3. Substâncias de Referência

Os resultados da CL50/96h obtidos nos testes com as substâncias de referência dodecil sulfato de sódio e zinco, estão apresentados na Tabela 12.

A CL50/96h média obtida com o DSS foi de 25,90 mg/l (dp = 4,61%), com coeficiente de variação de 17,80%.

A média calculada com os resultados obtidos nos testes conduzidos com zinco foi de 5,80 mg/l (dp = 2,78%), com coeficiente de variação de 47,93%.

Tabela 12. Resultados da CL50/96h dos testes de toxicidade conduzidos com zinco e dodecil sulfato de sódio (DSS).

Teste	**S.C. (%)	Zinco		DSS	
		CL50/96h (mg/l)	IC	CL50/96h (mg/l)	IC
Preliminar*	93	12,94	8,65 – 19,34	40,08	26,01 – 61,76
1	100	8,49	6,10 – 11,80	22,36	17,03 – 29,36
2	100	2,94	1,07 – 8,06	24,23	17,35 – 33,85
3	100	5,98	4,13 – 8,66	31,11	21,16 – 45,72
Média		5,80		25,90	
dp		2,78		4,61	
CV (%)		47,93		17,80	

\* Os resultados dos testes preliminares não foram considerados no cálculo da média.

\*\* Sobrevivência no controle

IC = Intervalo de confiança, dp = desvio padrão, CV = coeficiente de variação.

### 10.3.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os valores de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes em uma réplica de cada diluição. As variações dos resultados encontram-se dentro dos limites estabelecidos (Tabela 13) (Rabalais & Turner, 1998).

Tabela 13. Variação da salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD) analisados nos testes com substâncias de referência.

Substância	Salinidade		pH		OD (mg.L <sup>-1</sup> )	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
DSS	30	32	7,60	8,33	5,17	6,33
Zinco	30	32	7,81	8,34	5,13	7,02

#### 10.4. Testes de Toxicidade com Petróleo

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos no teste preliminar. Neste caso, não foi possível analisar a CL50/96h, pois a mortalidade dos organismos não foi superior a 17,50% (500ppm). A situação controle proporcionou 97,5% de sobrevivência.

Tabela 14. Média percentual da sobrevivência do *K. schubartii* durante o teste preliminar com sedimento contaminado por petróleo, nas diferentes concentrações avaliadas.

Réplicas	Concentrações do petróleo (ppm)					
	0,0	250	500	1000	5000	10000
Média	97,5	92,5	82,5	85	90	85

No teste definitivo, a CL50/10dias obtida para o organismo foi de 105740.50 ppm de petróleo através da Fração Óleo Água (FOA) preparada e misturada ao sedimento. Sendo que a situação controle proporcionou 100% de sobrevivência do *K. schubartii* (Tabela 15).

Tabela 15. Resultado da CL50/10dias obtido no teste de toxicidade definitivo com petróleo.

Teste	Sobrevivência controle (%)	Petróleo	
		CL50/10dias (ppm)	IC
Definitivo	100	105740,50	81785.60 - 136711.76

Paralelamente ao teste com petróleo, foi avaliado a sensibilidade dos organismos através de teste com a substância de referência DSS (CV=17,80%), escolhida por ter apresentado menor coeficiente de variação que o zinco (CV=47,93%).

A CL50/96h do DSS para o *K. schubartii* foi de 8,77mg/l (Tabela 16).

Tabela 16. Resultado do teste com a substância de referência DSS realizado em paralelo com o teste com petróleo.

Teste	Sobrevivência controle (%)	DSS	
		CL50/96h (mg/l)	IC
1	100	8,77	4,21 – 18,29

Os valores de salinidade, pH e oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes em uma réplica de cada diluição. As variações dos resultados encontram-se dentro dos limites estabelecidos (Tabela 17) (Rabalais & Turner, 1998).

Tabela 17. Parâmetros físicos e químicos das soluções do teste com a substância DSS, testada paralelamente ao teste de toxicidade definitivo com petróleo.

Substância	Salinidade		pH		OD (mg.L <sup>-1</sup> )	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
DSS	30	31	8,13	8,30	5,40	5,10

## 10.5. Granulometria e Matéria Orgânica

Os resultados obtidos demonstram que tanto nos testes com temperaturas e salinidades, quanto nos testes de toxicidade com petróleo, não

ocorreu modificação quanto à classificação granulométrica dos sedimentos originais (Tabela 18 e 20), em relação ao sedimento utilizado nos respectivos testes (Tabela 19 e 21). Todos os sedimentos foram coletados no ponto de coleta do *K. schubartii* na Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ, e foram classificados como areia fina.

O sedimento original amostrado no ponto de coleta do *K. schubartii* possui 2,5% de matéria orgânica. Enquanto que o mesmo sedimento, porém passado por um processo de limpeza (sedimento utilizado nos testes) possui 0,8% de matéria orgânica.

Tabela 18. Resultado da análise granulométrica realizada com amostra de sedimento original, utilizado nos testes de temperatura e salinidade.

D(MM)	PHI	Peso	Frequência %	Frequência Acumulada
2,0000	-1,0	0,0000	0,0000	0,0000
1,4142	-0,5	0,1230	0,1766	0,1766
1,0000	0,0	0,5419	0,7781	0,9548
0,7071	0,5	2,4578	3,5292	4,4839
0,5000	1,0	5,1524	7,3984	11,8823
0,3536	1,5	5,2653	7,5605	19,4428
0,2500	2,0	7,2132	10,3575	29,8003
0,1768	2,5	5,2351	7,5171	37,3175
0,1250	3,0	14,2675	20,4869	57,8043
0,0884	3,5	21,2967	30,5802	88,3845
0,0625	4,0	6,5627	9,4235	97,8079
0,0442	4,5	1,5266	2,1921	100,0000
2,0000	-1,0	0,0000	0,0000	0,0000
		<b>Percentis</b>		
	PHI5		0,535	
	PHI75		3,281	
	PHI16		1,272	
	PHI84		3,428	
	PHI25		1,768	
	PHI95		3,851	
	PHI50		2,810	
	<b>Parâmetros estatísticos</b>			
<b>Mediana</b>		2,810		
<b>Média</b>		2,503		
<b>Selecionamento</b>		0,930		
<b>Assimetria</b>		-0,399		
<b>Curtose</b>		0,898		
<b>Curtose (norm)</b>		0,473		
	<b>Classificação por frequência simples</b>			
<b>Cascalho</b>		0,000		
<b>Areia muito grossa</b>		0,955		
<b>Areia grossa</b>		10,928		
<b>Areia média</b>		17,918		
<b>Areia fina</b>		28,004		
<b>Areia muito fina</b>		40,004		
<b>Silte</b>		2,192		
<b>Arqila</b>		0,000		
	<b>Classificação pela média</b>			
	=> AREIA FINA <=			
	areia moderadamente selecionada / platicurtica/ assimetria muito negativa			
<b>Classificação textural de Folk</b>				
<b>Classificação Larsonneur (Dias/96)</b>		<b>AL1d:</b>	<b>Areia litoclástica fina a m.fina</b>	

Tabela 19. Resultado da análise granulométrica realizada com amostra de sedimento limpo, utilizado nos testes de temperatura e salinidade.

D(MM)	PHI	Peso	Frequência %	Frequência Acumulada
2,0000	-1,0	0,0000	0,0000	0,0000
1,4142	-0,5	0,0620	0,0877	0,0877
1,0000	0,0	0,4521	0,6395	0,7272
0,7071	0,5	3,9563	5,5961	6,3233
0,5000	1,0	9,1023	12,8750	19,1984
0,3536	1,5	5,0807	7,1866	26,3849
0,2500	2,0	8,4851	12,0020	38,3869
0,1768	2,5	5,6358	7,9717	46,3587
0,1250	3,0	12,5199	17,7092	64,0679
0,0884	3,5	20,0235	28,3229	92,3908
0,0625	4,0	4,5232	6,3980	98,7888
0,0442	4,5	0,8563	1,2112	100,0000
0,0313	5,0	0,0000	0,0000	100,0000
		<b>Percentis</b>		
	PHI5		0,382	
	PHI75		3,193	
	PHI16		0,876	
	PHI84		3,352	
	PHI25		1,404	
	PHI95		3,704	
	PHI50		2,603	
		<b>Parâmetros estatísticos</b>		
<b>Mediana</b>		2,603		
<b>Média</b>		2,277		
<b>Selecionamento</b>		1,047		
<b>Assimetria</b>		-0,366		
<b>Curtose</b>		0,761		
<b>Curtose (norm)</b>		0,432		
		<b>Classificação por frequência simples</b>		
<b>Cascalho</b>		0,000		
<b>Areia muito grossa</b>		0,727		
<b>Areia grossa</b>		18,471		
<b>Areia média</b>		19,189		
<b>Areia fina</b>		25,681		
<b>Areia muito fina</b>		34,721		
<b>Silte</b>		1,211		
<b>Arqila</b>		0,000		
		<b>Classificação pela média</b>		
		=> AREIA FINA <=		
		areia moderadamente selecionada / platicurtica/ assimetria muito negativa		
<b>Classificação textural de Folk</b>				
<b>Classificação Larssonneur (Dias/96)</b>			<b>AL1d:</b>	<b>Areia litoclástica fina a m.fina</b>

Tabela 20. Resultado da análise granulométrica realizada com amostra de sedimento original, utilizado nos testes de toxicidade com petróleo.

D(MM)	PHI	Peso	Frequência %	Frequência Acumulada
2,0000	-1,0	0,0000	0,0000	0,0000
1,4142	-0,5	0,0240	0,0344	0,0344
1,0000	0,0	0,3207	0,4594	0,4937
0,7071	0,5	3,2856	4,7062	5,2000
0,5000	1,0	4,8108	6,8909	12,0909
0,3536	1,5	5,5407	7,9364	20,0273
0,2500	2,0	8,0658	11,5533	31,5806
0,1768	2,5	8,0263	11,4967	43,0773
0,1250	3,0	12,5199	17,9333	61,0106
0,0884	3,5	19,5093	27,9448	88,9553
0,0625	4,0	6,8595	9,8254	98,7808
0,0442	4,5	0,8512	1,2192	100,0000
0,0313	5,0	0,0000	0,0000	100,0000
<b>Percentis</b>				
	PHI5		0,479	
	PHI75		3,250	
	PHI16		1,246	
	PHI84		3,411	
	PHI25		1,715	
	PHI95		3,808	
	PHI50		2,693	
<b>Parâmetros estatísticos</b>				
<b>Mediana</b>		2,693		
<b>Média</b>		2,450		
<b>Selecionamento</b>		0,929		
<b>Assimetria</b>		-0,333		
<b>Curtose</b>		0,889		
<b>Curtose (norm)</b>		0,471		
<b>Classificação por frequência simples</b>				
<b>Cascalho</b>		0,000		
<b>Areia muito grossa</b>		0,494		
<b>Areia grossa</b>		11,597		
<b>Areia média</b>		19,490		
<b>Areia fina</b>		29,430		
<b>Areia muito fina</b>		37,770		
<b>Silte</b>		1,219		
<b>Argila</b>		0,000		
<b>Classificação pela média</b>				
=> AREIA FINA <=				
areia moderadamente selecionada / platicurtica/ assimetria muito negativa				
<b>Classificação textural de Folk</b>				
<b>Classificação Larssonneur (Dias/96)</b>			<b>AL1d:</b>	<b>Areia litoclástica fina a m.fina</b>

Tabela 21. Resultado da análise granulométrica realizada com amostras de sedimento limpas, utilizado nos testes de toxicidade com petróleo.

D(MM)	PHI	Peso	Frequência %	Frequência Acumulada
2,0000	-1,0	0,0000	0,0000	0,0000
1,4142	-0,5	0,0450	0,0645	0,0645
1,0000	0,0	0,3207	0,4596	0,5241
0,7071	0,5	3,0854	4,4218	4,9459
0,5000	1,0	5,0108	7,1812	12,1271
0,3536	1,5	5,0808	7,2815	19,4086
0,2500	2,0	8,4851	12,1604	31,5690
0,1768	2,5	9,6358	13,8095	45,3785
0,1250	3,0	15,5199	22,2423	67,6208
0,0884	3,5	19,5093	27,9597	95,5805
0,0625	4,0	2,8595	4,0981	99,6785
0,0442	4,5	0,2243	0,3215	100,0000
0,0313	5,0	0,0000	0,0000	100,0000
Peso Total		69,9052		
		<b>Percentis</b>		
	PHI5		0,504	
	PHI75		3,132	
	PHI16		1,266	
	PHI84		3,293	
	PHI25		1,730	
	PHI95		3,490	
	PHI50		2,604	
		<b>Parâmetros estatísticos</b>		
<b>Mediana</b>		2,604		
<b>Média</b>		2,387		
<b>Selecionamento</b>		0,844		
<b>Assimetria</b>		-0,363		
<b>Curtose</b>		0,873		
<b>Curtose (norm)</b>		0,466		
		<b>Classificação por frequência simples</b>		
<b>Cascalho</b>		0,000		
<b>Areia muito grossa</b>		0,524		
<b>Areia grossa</b>		11,603		
<b>Areia média</b>		19,442		
<b>Areia fina</b>		36,052		
<b>Areia muito fina</b>		32,058		
<b>Silte</b>		0,321		
<b>Arqila</b>		0,000		
		<b>Classificação pela média</b>		
		=> AREIA FINA <=		
		areia moderadamente selecionada / platicurtica/ assimetria muito negativa		
<b>Classificação textural de Folk</b>				
<b>Classificação Larssonneur (Dias/96)</b>			<b>AL1d: Areia litoclástica fina a m.fina</b>	

## 10.6. Análise Química do Sedimento

Os resultados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) da amostra do sedimento da Lagoa de Itaipu, Niterói, RJ, estão apresentados na Tabela 22.

Os resultados obtidos da análise química realizada com uma amostra de sedimento do ponto de coleta do *K. schubartii* mostra que a quantidade total HPA encontrado é de 0,36 mg/kg.

Tabela 22. Resultados de HPA da amostra do sedimento do ponto de coleta do *K. schubartii*.

<b>Substâncias</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>
Naftaleno	0,10
Acenaftileno	nd
Acenafteno	nd
Fluoreno	nd
Fenantreno	0,02
Antraceno	nd
Fluorentano	0,04
Pyreno	0,07
Benz(a)antraceno	0,02
Chryseno	0,03
Benzo(b)fluorentano	0,02
Benzo(k)fluorentano	nd
Benzo(a)pyreno	0,02
Indeno(123-cd)pyreno	0,02
Dibenzo(a,h)antraceno	nd
Benzo(ghi)perylene	0,02
<b>Total</b>	<b>0,36</b>

nd – não detectado

## **11. DISCUSSÃO**

### **11.1. Escolha de Organismos-teste**

Apesar das vantagens de se empregar o cultivo em laboratório de espécies para testes de toxicidade, muitos destes testes dependem de organismos provenientes do campo. Pode-se citar o misidáceo *Mysidium graciles*, o anfípodo *Tiburonella viscana*, os copépodos *Acartia lilljeborgi* e *Temora stylifera*, os bivalves *Crassostrea rhizosphorea* e *Perna perna*, e o equinoderma *Lytechinus variegatus* como alguns exemplos de organismos-teste utilizados no Brasil que ainda não são cultivadas em laboratório.

No entanto, o uso de animais provenientes do campo está condicionado à sua disponibilidade *in natura*. Neste caso, as coletas dos organismos no campo não devem ser realizadas de forma excessiva e sem controle, pela possibilidade de causar uma diminuição significativa do estoque populacional (Badaró-Pedroso *et. al.*, 2002). Adicionalmente, se uma determinada espécie pode fornecer informações importantes a respeito das condições ambientais de determinado local, vale a pena insistir no seu cultivo ainda que este apresente dificuldades (Chapman, 2002).

Segundo Badaró-Pedroso *et. al.* (2002) o cultivo de organismos é extremamente encorajado, pois possibilita o controle de vários fatores (saúde, idade, etc) importantes para obtenção de resultados de qualidade.

É necessário testar o equivalente a espécies “chaves”, ou seja, espécies que contribuem com informações importantes a toda comunidade envolvida.

Outro fato de grande importância, é testar não somente organismos que estão facilmente disponíveis, por envolver menos esforços. Não deve-se hesitar em testar os organismos que estão razoavelmente ou dificilmente disponíveis, pois os resultados obtidos podem proporcionar informações realmente compensadoras (Chapman, 2002).

### **11.2. *K. schubartii* como Organismo para Testes de Toxicidade**

As condições de laboratório testadas no presente estudo mostraram-se adequadas para o desenvolvimento de testes de toxicidade com o *K. schubartii*. Isto pode ser comprovado pelo fato desse tanaidáceo se enquadrar em todos os critérios definidos para escolha de um organismo-teste. São eles: (a) biologia e ecologia da espécie; (b) alta taxa de sobrevivência sob condições controladas; (c) pouca sensibilidade as variáveis naturais do sedimento, como tamanho das partículas e conteúdo orgânico; (d) disponibilidade e abundância na natureza; (e) importância ecológica e econômica.

#### **11.2.1. Informações sobre a biologia e ecologia da espécie**

O item 4 do presente trabalho, possui todas as informações sobre os tanaidáceos em geral, e também sobre o *K. schubartii*. As informações encontradas nas bibliografias mostram considerações importantes sobre o seu habitat, preferência alimentar, reprodução, distribuição, localização,

importância econômica e ecológica e protogenia. Este conjunto de informações sugere caminhos para tentativas de adequar esta espécie em laboratório.

### **11.2.2. Alta taxa de sobrevivência sob condições controladas**

A média de sobrevivência de 95% e 91% nos tratamentos 1 a 6 dos testes com temperaturas e salinidades foram considerados suficientes para realizar futuros testes de toxicidade com a população de *K.schubartii* da Lagoa de Itaipu.

Segundo Zamboni & Costa (2002), resultados só podem ser considerados válidos, quando o percentual de sobrevivência no controle for maior ou igual a 80%. Nos testes com substâncias de referência e com petróleo no presente trabalho, a porcentagem de sobrevivência foi de 100%.

### **11.2.3. Pouca sensibilidade as variáveis naturais do sedimento, como tamanho das partículas e conteúdo orgânico**

Nucci (2001) observou esta espécie sendo a mais abundante e com maior densidade em praias com sedimento fino a muito fino no Canal de São Sebastião (SP).

Rosa-Filho & Bemvenuti, (1998) observaram que o *K. schubartii* pode construir seus tubos em áreas compostas basicamente por areia, mas com baixas proporções de silte e argila. Em locais como estes *K. schubartii* constrói seus tubos em menores profundidades em relação às áreas onde o sedimento é mais fino.

No presente trabalho, análises granulométricas do sedimento do ponto de coleta classificaram-o como areia fina. Isso porque, o sedimento utilizado nos testes foi distribuído igualmente para todos os tratamentos e réplicas, e a sobrevivência do *K. schubartii* se manteve alta no tratamento controle.

Mesmo sem um experimento prévio com diferentes tamanhos de grãos, pode-se dizer que a granulometria não foi um fator estressante para o tanaidáceo *K. schubartii*. Isso porque, o sedimento utilizado nos testes foi distribuído igualmente para todos os tratamentos e réplicas, e a sobrevivência do *K. schubartii* se manteve alta no tratamento controle. Porém, o processo de limpeza do sedimento provocou uma perda de 1,5mg/kg de matéria orgânica. Esta perda pode ter influenciado na toxicidade do petróleo, pois segundo Crapez (2001) os hidrocarbonetos de petróleo tem grande afinidade pela matéria orgânica particulada.

Segundo Asmus (1984), existe uma correlação de sucesso do recrutamento à presença de fundos moles, que favorecem o enterramento de juvenis, pois a espécie tem por estratégia de refúgio cavar tubos em “U” de até 15 cm quando adultos, e em pequenas profundidades quando jovens. Este fato ficou evidenciado visualmente (não foi analisado experimentalmente) durante as coletas, pois os organismos entre 0,7 e 1,0cm (utilizados nos testes) foram encontrados em maior abundância em profundidades de até aproximadamente 15 cm da região sedimentar.

#### **11.2.4. Disponibilidade e abundância na natureza**

De modo geral, o *K. schubartii* apresenta alta densidade e abundância em diversos pontos do litoral Sul-Sudeste brasileiro.

O *K. schubartii* da Lagoa de Itaipu apresenta um padrão de dispersão agrupado, segundo a razão variância/média, ocorrendo uma maior densidade de adultos ocorrendo nos meses de fevereiro e março, e de juvenis nos meses de julho e agosto, indicando prováveis épocas de reprodução e recrutamento, respectivamente (Pennaфирme, 2003).

#### **11.2.5. Importância ecológica e econômica.**

A espécie *K. schubartii* faz parte da dieta alimentar de crustáceos, como o siri-azul (*Callinectes sapidus*) e o camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), do bagre marinho *Netuma* sp, além de compor mais de 90% da dieta alimentar da corvina (*Micropogonias furnieri*) (Araújo, 1987; Couto *et. al.*, 1995; Figueiredo, 1996). Sendo importante na estruturação de cadeias alimentares que englobam espécies comercialmente exploradas.

### **11.3. Alimentação**

A alimentação é um parâmetro essencial, e por isso é muito testada para otimizar o cultivo de várias espécies (Baldwin *et. al.*, 1995; Mourente *et. al.*, 1995; Gama & Zamboni, 1999; Leonardo *et. al.*, 2000; Phatarpekar *et. al.*, 2000).

Segundo Zamboni & Costa (2002), durante a manutenção do tanaidáceo *K. schubartii* em laboratório, e nos próprios testes com sedimento, deve ser oferecida alimentação a cada 48 horas para um lote de 100 animais. Os autores sugerem oferecer 2 ml de uma solução composta de ração de truta fermentada e ração microfloculada para alevinos de peixe e, dependendo da salinidade, 1 ml da alga *Tetracelmis graciles*, ou *Isocrhisys galbana* em concentração de  $1 \times 10^5/l$ .

Neste trabalho, foi oferecida 2,5 ml da solução composta pelas rações de peixes tropicais e pela ração de alevinos de peixes, acrescida (independente da salinidade) de 1,5 mg/l da microalga *Tetracelmis graciles*.

Estas concentrações foram definidas seguindo o sugerido por Zamboni & Costa (2002). Porém, houve a substituição da ração de truta pela ração de peixes tropicais devido à dificuldade de obtenção da primeira.

Como os resultados obtidos durante a adequação do *K. schubartii* foram satisfatórios para o objetivo do trabalho, optou-se por continuar alimentando-os com esta nova dieta.

#### **11.4. Temperatura e Salinidade**

Segundo Kumlu *et. al.* (2000), a temperatura e a salinidade são os dois fatores abióticos que mais afetam o crescimento e a sobrevivência dos organismos aquáticos. Por esta razão, esses parâmetros são largamente estudados para definir as condições mais adequadas de cultivo e/ou manutenção das espécies em laboratório, bem como, para uma melhor compreensão das respostas às variações ambientais.

Zamboni & Costa (2002) descrevem toda a metodologia que pode ser utilizada para alimentação, coleta, manutenção e aclimação do *K. schubartii* em laboratório. Porém, os organismos estudados por esses autores possuem origem na Lagoa dos Patos, RS. Região que possui condições climáticas diferentes da Lagoa de Itaipu, RJ. Sendo assim, decidiu-se realizar todo processo de manutenção e aclimação do *K. schubartii* da Lagoa de Itaipu em laboratório.

Os resultados obtidos demonstram que o *K. schubartii* é muito sensível a temperaturas atmosféricas acima de 25°C.

O aumento da temperatura diminui a concentração de oxigênio dissolvido (OD) da água. Esta informação ajuda a confirmar que a temperatura foi o único fator que afetou a sobrevivência do *K. schubartii*, pois, os dados analisados de OD medidos no início e final dos testes estão dentro dos padrões estabelecidos.

A sensibilidade observada a temperaturas acima de 25°C contrastou com o que foi visualizado na área de coleta. Pois, mesmo não sendo quantificada a temperatura do sedimento e do ar durante as coletas, ficou evidenciado visualmente que existe pouca renovação e fluxo de água no ponto exato de coleta, e exposição intensa dos raios solares. Sugerindo que esta espécie não vive no seu ótimo ambiental para o fator ambiental temperatura. Neste caso, novos estudos, incluindo a quantificação da temperatura do sedimento e do ar, poderão responder mais concretamente a sugestão proposta.

As melhores condições para aclimação do *K. schubartii* da Lagoa de Itaipu foram com temperaturas entre 18 e 22°C e salinidades entre 15 e 35. Nas temperaturas de 25 e 28°C houve diminuição significativa da sobrevivência.

Porém, o comportamento do *K. schubartii* em temperaturas abaixo de 18°C não foi precisado. Assim, decidiu-se então realizar os testes de toxicidade com o tanaidáceo *K. schubartii* a temperatura de 20°C ± 1. Porém, é necessário estudos que venham a ampliar a faixa de temperatura no processo de adequação.

### **11.5. Substâncias de Referência**

Os testes de toxicidade com substâncias de referência são amplamente utilizados em trabalhos de rotina em laboratórios, para avaliar a toxicidade conjunta dos constituintes de amostras ambientais ou efluentes.

O aprimoramento desses testes é imprescindível para a obtenção de resultados mais fidedignos que propiciem maior segurança ao meio ambiente e confiabilidade aos resultados dos testes de toxicidade.

Dentre as substâncias analisadas, o DSS apresentou melhores resultados, com CL50/96h de 25,90 mg/l (dp = 4,61%), e coeficiente de variação de 17,80%.

Por sua vez, o zinco apresentou CL50/96h de 5,80 mg/l (dp = 2,78%), porém com coeficiente de variação de 47,93%. Esta variação de coeficiente indica alta variabilidade entre os testes, e o uso do zinco, portanto, não foi recomendado para os testes com petróleo.

Com relação aos fatores físico-químicos (salinidade, pH e oxigênio dissolvido, as variações dos resultados obtidos encontram-se dentro dos limites estabelecidos (Rabalais & Turner, 1998), demonstrando que estes fatores não influenciaram os resultados dos testes com substâncias de referência.

## 11.6. Testes de Toxicidade com Petróleo

Os resultados obtidos no teste preliminar mostram que não foi possível analisar a CL50/96h, pois a mortalidade dos organismos não foi inferior a 82,5% (500ppm).

No teste definitivo, a CL50/10dias obtida para o organismo foi de 105740.50 ppm de petróleo através da Fração Óleo-Água (FOA) preparada e misturada ao sedimento. Sendo que a situação controle proporcionou 100% de sobrevivência do *K. schubartii*. Porém, no presente trabalho, mesmo que a solução “Fração Óleo-Água“ tenha sido misturada homogeneamente ao sedimento, a ausência da análise química no sedimento no início e no final dos testes, não permite concluir que a concentração letal obtida é realmente a que causou a toxicidade observada no *K. schubartii*.

É importante ressaltar alguns itens que podem ter influenciado na toxicidade do produto, pois a CL50/10dias apresentada no teste definitivo com petróleo foi considerada alta. Segundo Patin (1999) apesar das incertezas, os estudos realizados mostram que as concentrações mínimas de estudos realizados mostram que as concentrações mínimas de hidrocarbonetos de petróleo que causam respostas fisiológicas e bioquímicas (na maioria reversíveis) ou ausência de efeitos variam entre 10 e 1000 mg/l para água.

Tsvetnenko (2002) cita que durante o processo de mistura óleo-água, entre 63% e 95% de hidrocarbonetos presentes nesta mistura volatizam imediatamente durante o processo de preparação.

Como observado nos resultados de granulometria, o processo de limpeza do sedimento não interferiu na sua classificação granulométrica. Porém, os resultados de matéria orgânica mostram uma perda de 1,7% do sedimento original para o sedimento lavado. Esta perda pode ter influenciado na toxicidade do petróleo, pois segundo Crapez (2001) os hidrocarbonetos tem grande afinidade pela matéria orgânica particulada.

A variação dos valores de salinidade, pH e oxigênio dissolvido medidos no início e no final dos testes, em uma réplica de cada diluição, encontram-se dentro dos limites estabelecidos (Rabalais & Turner, 1998). Demonstrando que estes fatores não influenciaram os resultados dos testes de toxicidade com petróleo.

Mesmo não sendo um dos objetivos iniciais do trabalho, durante a avaliação final do teste definitivo com petróleo foi realizado uma avaliação detalhada de alguns parâmetros subletais (capacidade de construir tubos e movimentação) que possivelmente poderiam ser afetados pelo petróleo.

Após 10 dias de exposição do organismo ao sedimento contaminado com petróleo, a concentração de 10000 ppm apresentou letalidade de apenas 15% dos organismos, porém outros 30% não possuíam a capacidade de construir tubos, e a capacidade de locomoção estava comprometida.

Resultados semelhantes foram observados na concentração de 50000ppm, quando 17,5% dos organismos morreram, porém, outros 30% não possuíam a capacidade de construir tubos, e capacidade de locomoção estava comprometida.

Na concentração 100000ppm, os efeitos subletais foram ainda mais visíveis. Dos 200 organismos expostos 45% morreram e outros 55% não

possuíam a capacidade de construir tubos, e a capacidade de locomoção estava comprometida.

Na concentração de 150000 ppm, 60 % dos organismos morreram e outros 27% não possuíam a capacidade de construir tubos e a capacidade de locomoção estava comprometida.

Mesmo a quantidade de organismos não ter superado 60% de mortalidade nos testes com petróleo, a porcentagem de outros organismos que tiveram efeitos subletais importantes comprometidas é em muitas concentrações superior à letalidade.

O efeito letalidade é uma resposta clara do organismo, inequívoca e facilmente mensurável, porém, os efeitos subletais não devem ser menosprezados por envolver mais esforço do pesquisador. Os efeitos subletais devem ser analisados em conjunto com o efeito letalidade para uma melhor compreensão dos reais efeitos de substâncias tóxicas em organismos, e para o desenvolvimento de planos de prevenção e/ou recuperação do ambiente de interesse.

## 12. CONCLUSÕES

---

1. As condições de laboratório testadas no presente estudo mostraram-se adequadas para adequação e testes com substâncias de referência com o *Kalliapseudes schubartii*.
2. O seguimento da metodologia realizada nos testes com petróleo só podem ser definidos como adequados, após um teste definitivo que, ao seu final, seja realizada análise química do sedimento para quantificar hidrocarbonetos que eventualmente tenham-se agrupado no sedimento.
3. Não houve influência da dieta alimentar em relação à sobrevivência do *K. schubartii* durante os testes.
4. Conclui-se que o *K. schubartii* é muito sensível a temperaturas atmosféricas acima de 25°C. Mas, é bem resistente a variações de salinidade ente 15 e 35.
5. Nas temperaturas de 25 e 28°C houve diminuição significativa da sobrevivência. Porém, o comportamento do *K. schubartii* em temperaturas abaixo de 18°C não foi precisado. Assim, para testes de toxicidade com esta espécie deve-se utilizar a temperatura de 20°C±1. Porém, é necessário estudos que ampliem a faixa de temperatura no processo de adequação.
6. O zinco apresentou CL50/96h de 5,80 mg/l (dp = 2,78%), porém com coeficiente de variação de 47,93%. Esta variação de coeficiente indica alta variabilidade entre os testes, e o uso do zinco, portanto, não foi

recomendado para os testes com petróleo. Utilizando-se então o dodecil sulfato de sódio como substância de referência aos testes com petróleo.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

\_\_\_\_\_AGÊNCIAESTADO, 1999. [www.agemat.com.br](http://www.agemat.com.br).

\_\_\_\_\_AMBIENTE BRASIL. 2003. [www.ambientebrasil.com.br](http://www.ambientebrasil.com.br).

\_\_\_\_\_ITPOF. 2003. [www.itopof.com/fate](http://www.itopof.com/fate).

Abessa, D.M.S., Sousa, E.C.P.M., Rachid, B.R.F. et al. 1998. Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a in marine sediments contaminant assessment. Brazilian. Archives of Biology and Technology, 41 (2): 225-230.

Albers, P. H. 1995. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In Handbook of Ecotoxicology. Hoffman, DJ; Rattner, BA; Burton, GA; and Cairns, J (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton: 330-352.

Almeida, M.V.O. 1994. *Kalliapseudes schubarti* Mañe-Garzón, 1949 (Tanaideacea-Crustacea): Dinâmica populacional e interações com a macrofauna bêntica no Saco do Limoeiro, Ilha do Mel (Paraná, Brasil). Curitiba. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, PR: 79.

Anderson, B.S.; Hunt, J.W.; Turpen, S.L. et. Al., 1990. Marine Bioassay project (Fifth Report. California, Water Resources Control Board. 90-13WQ: 183.

APHA, AWWA, WEF. 1995. Standard methods for examination of water and waster. 19. Ed Washington. (1) (part 8000).

Araújo, F.J. 1987. Hábitos alimentares de três espécies de bagres marinhos (Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos (RS), Brasil. *Atlântica*, 7: 47-63.

Araújo, R.P., Momo, K., Gherardi-Golstein, E. *et.al.*. 1987. Marine dispersant program for licensing and research in São Paulo state, Brazil. In: Oil Spill Conference (Prevention Behavior, Control, Clean Up) 10., Baltimore. Proceeding. Washington: American Patroleum Institute: 289-292.

Asmus, M.L. 1984. Estrutura da comunidade associada à *Ruppia marítima* no Estuário da Lagoa dos Patos, RS. Dissertação de mestrado. Departamento de Oceanografia. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande.RS: 154.

ASTM-AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. 1990. D.4447-84. Standad guide for disposal of laboratory chemicals and samples. In: Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, 11: 73-77.

- Badaró-Pedroso, C. 1999. Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, SP: 230.
- Badaró-Pedroso, C.; Reynier, M.V. e Prospero, V.A. 2002. Testes de toxicidade aguda com misidáceos – ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium graciles* (Crsutacea: Mysidacea). In Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. (Nascimento, I. A.; Sousa, E.C.P.M. e Nipper, M., ed). 123-140. Artes gráficas Ltda, Salvador.
- Baird, D.J., Maltby, L., Greig-Smith, P.W., Douben, P.E.T. (Eds.). 1996. Ecotoxicology: Ecological Dimensions. Chapman and Hall, London.
- Barnes, R.D. 1996. Zoologia dos Invertebrados. Quarta edição. Editora Roca: 728-730.
- BRASIL. Resolução nº 20 de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional e critérios de lançamento de efluentes em corpos de água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.11356-11361, 30 jun.1986. Seção 1.
- BRASIL. Resolução nº 23 de 07 de dezembro de 1994. Estabelece critérios para licenciamento das atividades de EXPROPER. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.21345-21346, 30 dez.1994. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 237 de 19 de dezembro de 1997. Estabelece critérios para licenciamento ambiental. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.30841-30843, 22dez.1997. Seção 1.

BRASIL. Resolução nº 293 de 12 de dezembro de 2001. Estabelece critérios para o plano emergencial individual para acidentes de poluição com óleo. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília: 20293-20312.

Brendolan R.A. e Soares-Gomes, A, 2003. Uso do psamobentos em estudos de ecotoxicologia marinha no Brasil: revisão bibliográfica com ênfase em substâncias de petróleo. Segundo Congresso brasileiro de Petróleo e Gás. Rio de Janeiro. Livro de Resumos: 152.

Breteler, R.J.; Scott, K.J.; Shepherd, S.P. 1989. Application of a new sediment toxicity test using the marine amphipod *Ampelisca abdita* to San Francisco Bay sediment. In: COWGILL, U.M.; L.R. Williams (eds). Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Philadelphia, ASTM, 12: .304-314.

Burton, G.A.; Scott, K.J. 1992. Sediment toxicity evaluations: their niche in ecological assessment. Environment. Sciences. Technology, 26, (11): 2068-2075.

Calow, P. 1996. Ecology in ecotoxicology: Some possible 'rules of thumb'. In: Baird, D.J., Maltby, L., Greig-Smith, P.W., Douben, P.E.T. (Eds.), Ecotoxicology: Ecological Dimensions. Chapman and Hall, London: 5-12.

Carr, R.S. 1998. Marine and estuarine porewater toxicity testing. In: Wells, P.G., Lee, K. and Blaise, C., Editors. Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice, CRC Press, Boca Raton, FL: 523–538.

César, A., Silva, S. L. R., Santos, A. R., 1997. Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição. Universidade Santa Cecília, RJ. Apostila, 4ª edição: 9.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1992a. Água do mar – Testes de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* Silva, 1979 (Crustacea-Mysidacea). Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB: 19.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1992b. Água do mar – Testes de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck, 1816 (Equinoderma:Echinoidea). Norma Técnica L5.250. São Paulo, CETESB: 20.

CETESB-COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 1983. Desenvolvimento de Métodos para o Estabelecimento de Critérios Ecotoxicológicos. Relatório Final, 1.1: 174.

CETESB-COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 1987. L05.021/1987. Água do Mar – Teste de

toxicidade com *Artemia* sp. Método de ensaio. Norma Técnica L5.021.

Chapman, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 7–15.

Chapman, P. M., Wang, F., Germanoc, J. D., Batley, G. 2002. Pore water testing and analysis: the good, the bad, and the ugly. *Marine Pollution Bulletin* 44 (5): 359-366.

Chapman, P.M. 1995. Ecotoxicology and pollution-key issues. *Marine Pollution Bulletin*, 31:167–177.

Chapman, P.M. 1997. OECD Workshop recommends phasing out NOECs for aquatic toxicity test. *Marine Pollution Bulletin.*, 34: 145-146.

Chapman, P.M., Caldwell, R.S., Chapman, P.F. 1996. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environment Toxicology Chemical*, 15: 77-79.

CIÊNCIA-HOJE. 2003. Revista Ciência Hoje. Seção Especial Petróleo e Gás. Novas pesquisas abrem caminho para maior aproveitamento do petróleo e gás brasileiro na produção de derivados, 32: 190.

Clark R. B. 1997. *Marine Pollution*, Fourth Edition, Clarendon Press, Oxford: 220.

- Costa, F.O., Correia, A.D., Costa, M. H. 1996. Acute Marine Sediment Toxicity: A Potential New Test with the Amphipod *Gammarus locusta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 81-87.
- Costa, J.B. 1997. Avaliação da adequabilidade do *Kalliapseudes schubartii* Mane Garzon, 1949 (Crustácea: Tanaidacea) como organismo-teste para utilização em ensaios de toxicidade de sedimentos estuarinos. Monografia, Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. RS.
- Costa, J.B., Zamboni, A.J., 1998. *Kalliapseudes schubartii* (Crustacea: Tanaidacea) como organismo-teste potencial para ensaios de toxicidade de sedimentos estuarinos. Anais do 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, Brasil: 79.
- Costa, M. 1999. Evolução de hidrocarbonetos derramados nas zonas costeiras e estuarinas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal: 25
- Couto, E.C.G; Almeida, M.V.O & Lana., P.C 1995. Diversidade e distribuição espacial da macrofauna bêntica do saco do Limoeiro-Ilha do Mel, Paraná outono de 1990. Boletim do Instituto Oceanográfico, S.Paulo, 11: (supl. especial): 15-30.
- Crapez, M. A. C; 2001. Efeitos dos hidrocarbonetos de petróleo na biota marinha. Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos (3): 255-269.

- DeWitt, T. H., Distworth, G. R., and Swartz, R. C., 1988. Effects of natural sediment features on survival of the phoxocephalid amphipod, *Rhepoxynius abronius*. *Marine Environment Research*, 25: 99–124.
- Ditsworth, G.R.; Schults, D.W.; Jones, J.K.P. 1990. Preparation of benthic substrates for sediment toxicity testing. *Environment Toxicology Chemical*, 16 (9): 1912-1920.
- Drent, J. 2002. Temperature responses in larvae of *Macoma balthica* from a northerly and southerly population of the European distribution range. *Journal Experimental Marine Biology Ecology*, 275: 117-129.
- Environment Canada, 1992. EPS1/RM/26. Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipod. Canadá, Report: 83.
- Figueiredo, G.M. 1996. Cronologia, consumo e dieta alimentar de juvenis e sub-adultos da corvina *Micropogonias furnieri* (Scianidae) no estuário da Lagoa dos Patos, RS, Rio Grande. Dissertação de Mestrado Fundação Universidade do Rio Grande. RS: 88.
- Flores H., A. Andreatta, G. Llona, and I. Saavedra (1998). Measurements of oil spill spreading in a wave tank using digital image processing. *Oil and hydrocarbon spills, modeling, analysis and control*, WIT Press, Southampton, UK: 165-173.

- Gardiner, L.F.;1975. The systematics, postmarsupial development and ecology of the deep-sea family Neotanidae (Crustacea, Tanaidacea). *Smithson. Contributions to Zoology*, 170: 1-275.
- Goldberg, E.D., 1995. Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 152-158.
- Guillard, R.R.L. & Ryther, C.B. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cytotella nana* Husted, and *Detonula convervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., 1978. Thurston, R.V. Trimmed spearman karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environment Sciences Technical*. New York, 7 (11): 714-719.
- Hernández, C., Yañez, R., Rudolph, A. 2000, Toxicit response of *Emerita analoga* (Stimpson, 1857) colected from beaches of South Central Chile. *Bulletin Environment Contaminat Toxicology*, 65: 567-572.
- Highsmith, R.C.; 1983. Sex reversal and fighting behavior-coevolved phenomena in a tanaid crustacean. *Ecology*, 64 (4): 719-726.
- Holdich, D.H. & Jones, J.A.; 1983. The distribution and ecology of British shallow-water tanaid crustaceans (Peracarida, Tanaidacea). *Journal of Natural History*, 17 (2): 157-183.

INPH (INSTITUTO DE PESQUISAS HIDROVIÁRIAS). 1991. Relatório da Campanha de medições hidráulicas-sedimentológico. Lagoas Piratininga e Itaipu: 149.

Ismael, D. & Moreira., G.S. 1997. Effects of temperature and salinity on respiratory rate and development of early larval stages of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman, 1836) (Decapoda, Palaemonidae). *Compositional Biochemical Physiology*. 188A, (3): 871-876.

Johnson, S.B. & Attramadal, Y.B.; 1982. Reproductive behavior and larval development of *Tanais cavolinii* (Crustacea, Tanaidacea). *Marine Biology*, 71 (3): 11-16.

Kjerfve, B. 1986. Comparative Oceanography of Coastal Lagoons. In: D.A. Wolf (Ed), *Estuarine Variability*. *Academy*, 2: 63-81.

Kunlu, M.; Eroldogan, O.T. e Aktas, M. 2000. Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. *Aquaculture*, 188: 167-173.

Lana, P.C. & Guiss, C.; 1991. Influence of *Spartina alterniflora* on structure and temporal variability of macrobenthic associations in a tidal flat of Paranaguá Bay (Southern Brazil). *Marine Ecology Progress Series*, 73: 231-244.

Lang, K.; 1956. Tanaidácea aus Brasilien. *Kieler Meeresf*, 12 (2): 246-260.

- Lavenère-Wanderley A.A.O. 1999. Caracterização ambiental da Lagoa de Itaipú através do entendimento dos processos sedimentares em associação com a dinâmica atual. Dissertação de Mestrado, Curso de Geologia e Geofísica Marinha da Universidade Federal Fluminense: 141.
- Leite, F.P.P. 1995. Distribuição temporal e espacial de *Kalliapseudes schubartii* Mañe-Garzón, 1949 (Tanaidacea, Crustacea) da região de Araçá, São Sebastião (SP). *Archives of Biology and Technology*, 38 (2): 605-618.
- Leite, F.P.P. & Leite, P.E.P. 1997. Desenvolvimento morfológico e dos ovários de *Kalliapseudes schubarti* (Mañe-Garzón, 1949) (Crustácea, Tanaidácea) do Canal de São Sebastião, São Paulo, Brasil. *Brazilian Zoology*. 14(3): 675-683.
- Long, E.R., Chapman, P.M., 1985. A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*. 16: 405-415.
- Lotufo, G.R., Abessa, D.M.S. 2000. Uso de copépodos estuarinos do Estado de São Paulo em testes de toxicidade com sedimentos. In. Encontro de Ecotoxicologia, 6. Reunião da Setac Latino-Americana, 3. São Carlos, 2000. Resumos: 130.
- MARINHA DO BRASIL. 2002. Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM). O ambiente marinho e costeiro do Brasil: vetores de pressão, situação, impactos e respostas. Relatório sobre as

perspectivas do meio ambiente para o Brasil/ Geo- Brasil. Rio de Janeiro. 47: 2002.

Mastroti, R.R., Abessa, D.M.S., Sousa, E.C.P.M. et al., 1997. Toxicity and biodegradability of anionic surfactants in sea water. In: Setac Annual Meeting, 19. San Francisco, 1v.

Modlin, R.F.; Harris, P.A. 1989. Observations on the natural history and experiments on the reproductive strategy of *Hargeria rapax* (Tanaidacea). *Crustacean Biology*. 9 (4): 578-586.

Muehe, D. Albuquerque, G.C. 1976. Batimetria e Sedimentação. *Cadernos de Geociências*. N 10: 53-63.

Nascimento, I.A., Leite, M.B.N., Sansone, G., Pereira, S.A. and Smith, D.H., 1998. Stress protein accumulation as an indicator of impact by the petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil. *Aquatic Ecosystem Health*, 1:101–108.

Nipper, M. 2000. Current approaches and future directions for contaminant-related impact assessments in coastal environments: Brazilian perspective. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3 (4): 433-447.

Nipper, M. 2002. In *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. (Nascimento, I. A.; Sousa, E.C.P.M. e Nipper, M., ed), 21: 245-253. Artes gráficas Ltda, Salvador.

- Nipper, M.G., Carr, R.S., 1997. Comprehensive comparison — porewater versus solid phase tests. In: Niimi, A.J., Parrott, J.L., Spry, D.J. (Eds.), Proceedings of the 24th Annual Aquatic Toxicity Workshop. Canadian Technology Report Fishing Aquatic. Sci. No. 2192, Niagara Falls, Ontario, Canada, : 31–32.
- Nucci. 2001. Diversity and distribution of crustaceans from 13 sheltered sandy beaches along São Sebastião Channel, south-eastern Brazil. Journal Marine Biology. Assessment. U. K. 81: 475-484.
- Ogle, M.M. 1982. Tanaidacea (Crustacea, Peracarida) of the Gulf-of-Mexico. 1- Introduction and an annotated bibliography of tanaidacea previously reported from the Gulf of Mexico. Gulf Research Report. 7(2): 101-104
- Patin, S. A. 1999. Environmental Impact of the Offshore Oil & Gas Industry. Eco Monitor Publishing, East Northport, New York. ISBN 0-967 1836-0-X.
- Pennafirme, S. F.; Brendolan, R. A.; Soares-Gomes, A. Densidade Populacional de *Kalliapseudes schubartii* Mañé-Garzón, 1949 (CRUSTACEA, TANAIIDACEA) da lagoa de Itaipu, Niterói, RJ – dados preliminares”. Livro de Resumos do I Simpósio de Biologia Marinha. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ: 103.
- Plesha, P.D.; Stein, J.E.; Schiewe, M.H. *et. al.*, 1988. Toxicity of marine sediments supplemented with mixtures of selected chlorinated and

aromatic hydrocarbons to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. Marine Environment Research., 25: 85-97.

Rabalais, N.N. & Turner, R.E. (ed), 1998. Coastal hypoxia. Consequences for living resources and ecosystems coastal and estuarine studies. American Geophysical Union, Washington D.C: 463

Rand, G.M., Petroceli, S.R. 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publishing Taylor & Francis, Washington: 115.

Rand, G.M., Wells, P.G., MacCarty, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment: 3-66, Taylor & Francis.

Rosa-Filho, J. S. & C. E. Bemvenuti. 1998. O sedimento como fator limitante para a distribuição de *Kalliapseudes schubarti* Mañe-Garzón, 1949 (Crustácea, Tanaidácea). Monografia Departamento de Oceanografia, Fundação ,Universidade do Rio Grande, Rio Grande.RS:18-35

Scott, K.J.; Redmon, M.S. 1989. The effects of a contaminated dredged material on laboratory populations of the tubicolous amphipod *Ambelisca abdita*. In. COWGILL, U.M.; L.R. Willians. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. ASTM, Philadelphia:289-303.

Segnini de Bravo, M.I.; Nhung, K. S. e Pérez, J.E. 1998. Salinity and temperature tolerances of the green and Brown mussels, *Perna viridis* and *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae). Revista de Biología Tropical. 46 (5): 121-125.

- Shepard, F.P. 1954. Nomenclature Base on sand-silt-clay ratios. *Journal of Sedimentary and Petrology*, 24. (3): 151-158.
- Soares-Gomes, A., Palma, J. J. C. e Silva, C, G., 2000. Causas e conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. *Brazilian Journal of Geophysics*, 18(3): 168.
- Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)–Europe. 1993. Guidance document on sediment toxicity assessment for freshwater and marine environments. In Workshop on Sediment Toxicity Assessment, Renesse, The Netherlands, 8–10 November 1993 (I. R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach, Eds.). SETAC–Europe.
- Sousa, E. C. P. M. 2002. In Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. (Nascimento, I. A.; Sousa, E.C.P.M. e Nipper, M., ed). 1: 123-140. Artes gráficas Ltda, Salvador.
- Sousa, E. C. P. M., Tommasi, L. R., 1997. Toxicidade do efluente derivado do terminal marítimo da Petrobrás sobre o gastrópoda *Costoanachis sertulariarum*. *Revista Brasileira de Oceanografia*. 45: 95–99.
- Suguio, H. Introdução à sedimentologia. Ed. Edgard. Blucher Ltda. 1973.
- Suresh, K. Ahamed, M.S. e Durairaj, G. 1995. Environmental physiology of the mole crab *Emerita asiática*, at a power plant discharg área on the coast of Índia. *Environmental Pollution*. 88: 133-136.
- Swartz, R.C., Schults, D.W., Ditsworth, G.R., DeBen, W.A. and Cole, F.A., 1985. Sediment toxicity, contamination, and macrobenthic

communities near a large sewage outfall. In: Boyle, T.P., Editor, , 1985. Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems, ASTM STP 865, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA: 152–175.

Swartz, R.C.; Kemp,P.F.; Schults, D.W. et.al., 1989. Acute toxicity of sediment from Eagle Harbor, Washington, to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. Environmental Toxicology and Chemistry, 8: 215-222.

Tarzwell, C.M. 1969. Standard methods for determination of relative toxicity of oil dispersants and mixtures of dispersants and various oil to aquatic life. Proc. Joint. Conference on Prevention and Control of Oil Spill. Washington D.C.. API: 179-186.

Thiel, M.; 1999. Duration of extended parental care in marine amphipods. Journal of Crustacean Biology, 19(1): 60-71.

Tsvetnenko, Y., Evans, L. 2002. Improved approaches to ecotoxicity testing of petroleum products. Marine Pollution Bulletin, 45:148-156.

Underwood, A. J. 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. Oceanography and Marine Biology and Annual Review 19: 513-605.

USGC/BRD-GEOLOGICAL SURVEY/BIOLOGICAL RESOURCES  
DIVISION. Marine Ecotoxicological Research Station – TAMU-CC.

1997. Toxicity testing waters to freshwater and marine organisms. 4ed. Cincinnati, EPA/600/4-90/027.

Veiga, L.F. 1998. Estudo da toxicidade marinha de fluídos de perfuração de poços de óleo e gás. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia.

Warner, R.R. 1988. Sex change and the size-advantage mode. Trends in Ecology and Evolution. 3: 133-136.

Zamboni, A. J. 2000. Caracterização ecotoxicológica do estuário da Lagoa dos Patos no entorno da cidade de Rio Grande, RS: fundamentos e técnicas. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo: 193.

Zamboni, A. J., Costa, J. B. 2002. In Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. (Nascimento, I. A.; Sousa, E.C.P.M. e Nipper, M., ed), 15: 155-161. Artes gráficas Ltda, Salvador.

Zamboni, A. J., Dutra, A.; Gama, A. M. et al. 1998. O acidente com o navio “BAHAMAS” no Estuário de Lagoa dos Patos. In: Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia, 5. Anais. Itajaí, 1998, Univali/CTTMar: 10.

Zamboni, A.J., Dutra, A., Gama, A.M., Maurense, N., Medzedovsky, I.G., Montu, M., 1998. O acidente com o navio Bahamas' no porto de Rio Grande, RS: avaliação ecotoxicológica do lançamento de ácido sulfúrico às águas do estuário da Lagoa dos Patos. Anais do 5º

Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia. Universidade do Vale do  
Itajaí, Itajaí, SC, Brasil: 10.