



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista - Unidade I



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPRODUTOS E BIOPROCESSOS

RAFAEL KEIJI KUREKI

**EFEITOS DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS POR METAIS EM CENÁRIOS
FUTUROS DE ACIDIFICAÇÃO E AQUECIMENTO DO MEIO MARINHO SOBRE A
PRODUÇÃO DE PROLE DA ESPÉCIE *Nitokra* sp.**

**SANTOS
2021**

Campus Baixada Santista - Unidade I
Av. Ana Costa, n.º95 – 1.º andar – Vila Mathias
Santos – SP – Brasil – CEP: 11060-001
Tel: (55) 13 3239-0111 – www.unifesp.br





Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista - Unidade I



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPRODUTOS E BIOPROCESSOS

RAFAEL KEIJI KUREKI

EFEITOS DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS POR METAIS EM CENÁRIOS FUTUROS DE ACIDIFICAÇÃO E AQUECIMENTO DO MEIO MARINHO SOBRE A PRODUÇÃO DE PROLE DA ESPÉCIE *Nitokra* sp.

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos pela Universidade Federal de São Paulo.

Orientador: Rodrigo Brasil Choueri

**SANTOS
2021**

Campus Baixada Santista - Unidade I
Av. Ana Costa, n.º95 – 1.º andar – Vila Mathias
Santos – SP – Brasil – CEP: 11060-001
Tel: (55) 13 3239-0111 – www.unifesp.br



R136e Kureki, Rafael Keiji .
EFEITOS DE SEDIMENTOS CONTAMINADOS POR METAIS EM
CENÁRIOS FUTU-ROS DE ACIDIFICAÇÃO E AQUECIMENTO DO
MEIO MARINHO SOBRE A PRODUÇÃO DE PROLE DA ESPÉCIE
Nitokra sp.. / Rafael Keiji Kureki; Orientador
Rodrigo Brasil Choueri; Coorientador . -- Santos,
2021.
52 p. ; 30cm

Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação em Bioprodutos
e Bioprocessos) -- Instituto Saúde e Sociedade,
Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo,
2021.

1. Mudanças Globais. 2. Contaminação. 3. Valores de
Qualidade de Sedimentos. 4. Copépodos. 5.
Estressores múltiplos. I. Choueri, Rodrigo Brasil ,
Orient. II. Título.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri pela paciência e ensinamentos, os quais servirão para minha vida profissional e pessoal. Admira-me muito a dedicação e o desempenho pelo que faz e trabalha.

As minhas amigas Mariana, Christiane, Aline, Amanda, Giani, Fernanda e Laís que me ajudaram de alguma forma a realizar este trabalho e por tudo que vivemos no laboratório. A Ana Carolina, Thallia e Michelle que mesmo de longe acreditaram na minha jornada. Em especial, a minha amiga Laila Maira que além de acreditar e mostrar minhas próprias qualidades, orientou-me em diversos momentos. Anja, muito obrigado!

A todos meus familiares que mesmo de longe estiveram torcendo por mim e me apoiando, em especial a minha mãe Jandira, que sempre me incentivou e apoiou em tudo que faço, principalmente por acreditar em mim, obrigada por simplesmente existir. Às minhas irmãs Tamires, Cindy, Gabriela e Eduarda pelo carinho, amor, afeto, além de torcerem por mim e me darem força. Ao meu padrasto, madrasta e pai por também acreditar no meu sonho de ser um pós-graduado e às minhas sobrinhas Lavinia e Helena por me fazer acreditar no amor. Ao meu amado Paulo por respeitar e entender todo o processo de construção do meu trabalho.

À ALS LABORATÓRIOS LS LTDA pelas análises realizadas nas dependências da empresa.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao estudo (proc. n. 2017/07351-4).

*“E agora, José?
A festa acabou,
a luz apagou,
o povo sumiu,
a noite esfriou,
e agora, José?
e agora, você?
você que é sem nome,
que zomba dos outros,
você que faz versos,
que ama, protesta?
e agora, José?” [...]*

*[...] “E agora, José?
Sua doce palavra,
seu instante de febre,
sua gula e jejum,
sua biblioteca,
sua lavra de ouro,
seu terno de vidro,
sua incoerência,
seu ódio — e agora?*

*Com a chave na mão
quer abrir a porta,
não existe porta;
quer morrer no mar,
mas o mar secou;
quer ir para Minas,
Minas não há mais.
José, e agora?” [...]*

*[...] “Sozinho no escuro
qual bicho-do-mato,
sem teogonia,
sem parede nua
para se encostar,
sem cavalo preto
que fuja a galope,
você marcha, José!
José, para onde?”*

(Carlos Drummond de Andrade)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de deslocamento de íons metálicos para forma aquosa devido ao aumento de íons de H⁺. Fonte: adaptado de Baird; Cann (2011)..... 14
- Figura 2. Desenho experimental do ensaio de *Nitokra* sp. em sedimentos contaminados com metais e expostos a cenários de mudanças climáticas. Legenda: AQI: Análise Química Inicial; AQF: Análise Química Final..... 18
- Figura 3. O sistema de injeção de CO₂ e sistema de caixa hermética adaptado de Lee et al. (2016). Fonte: adaptado de De Orte et al. (2014b).....22
- Figura 4. Estágios de vida da espécie *Nitokra* sp.. Legenda: a) fêmea adulta (sem bolsa de ovos); b) copepodito; c) náuplio.23
- Figura 5. Análises sedimentológica segundo a escala de Wentwhorth e porcentagem de predomínio dos grãos.....25
- Figura 6. Médias e desvio-padrão (n=4) dos resultados da produção de prole para a exposição de metais no sedimento (Concentração 1 e Concentração 2) e controle sedimento em diferentes meios de exposição de pH (7,70; 7,10 e 6,70), em temperatura a 25°C. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes. Letras minúsculas comparam níveis de contaminação em cada nível de pH. Letras maiúsculas comparam níveis de pHs em cada nível de contaminação (letras maiúsculas em fundos branco, cinza claro e preto referem-se a comparações de pH em sedimento controle, C1 e C2 de contaminação, respectivamente).30
- Figura 7. Médias e desvio-padrão (n=4) dos resultados da produção de prole para a exposição a metais no sedimento (Concentração 1 e Concentração 2) e controle sedimento em dois meios de exposição de pH (7.70 e 7.10) e temperatura (25 e 27°C). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes. Letras minúsculas comparam níveis de contaminação em cada nível de pH. Letras maiúsculas comparam níveis de pHs em cada nível de contaminação (letras maiúsculas em fundos branco, cinza claro e preto referem-se a comparações de pH em sedimento controle, C1 e C2, respectivamente). Letras maiúsculas vermelhas em itálico comparam níveis de temperatura em cada nível de contaminação e em cada nível de pH (letras maiúsculas em fundos branco, cinza claro e preto referem-se a comparações de pH em sedimento controle, C1 e C2, respectivamente, em cada nível de temperatura).....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos parâmetros físico-químicos dos meios de exposição e concentrações nominais de metais utilizados nos ensaios de produção de prole de <i>Nitokra</i> sp.	18
Tabela 2. Resultados dos parâmetros salinidade (Sal), oxigênio dissolvido (OD) e temperatura (Temp) no ensaio de toxicidade com sedimento. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2; NT) não testado.	26
Tabela 3. Resultados das variações médias e desvio padrão de pH em cada sistema teste. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2; NT) não testado.	26
Tabela 4. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando a variação média de pH nos tratamentos bifatoriais. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) degrees of freedom; SS) Sum of Squares; MS) Mean Squares; p(perm) valor de p permutacional.	27
Tabela 5. Resultado dos valores de p de Monte Carlo obtidos da análise de PERMANOVA pareada (pairwise test) avaliando os dados de monitoramento de pH. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.	27
Tabela 6. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando a variação média de pH nos tratamentos trifatoriais. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) degrees of freedom; SS) Sum of Squares; MS) Mean Squares; p(perm) valor de p permutacional.	28
Tabela 7 Resultado dos valores de p de Monte Carlo obtidos da análise de PERMANOVA pareada (pairwise test) avaliando os dados de monitoramento de pH, considerando as combinações dos fatores temperatura, pH e contaminação. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.	28
Tabela 8. Especificação do sistema carbonato para o ensaio com metais no sedimento em diferentes cenários de aquecimento e acidificação. Alcalinidade total (AT), carbono inorgânico total (CIT), bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}); pressão parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$); estado de saturação para calcita (Ω Cal), estado de saturação para aragonita (Ω Arag). Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.	29
Tabela 9. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito dos fatores pH (3 níveis) e contaminação (3 níveis) e a interação entre eles sob a produção de prole da espécie <i>Nitokra</i> sp.. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) degrees of freedom; SS) Sum of Squares; MS) Mean Squares; p(perm) valor de p permutacional.	31

Tabela 10. Valores de p de Monte Carlo, resultados da análise de PERMANOVA pareada (pairwise test) avaliando efeito da interação entre fatores pH e contaminação na produção de prole da espécie *Nitokra* sp. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.....31

Tabela 11. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da dos fatores temperatura, pH e contaminação e a interação deles sob a produção de prole da espécie *Nitokra* sp. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) degrees of freedom; SS) Sum of Squares; MS) Mean Squares; p(perm) valor de p permutacional.33

Tabela 12. Valores de p de Monte Carlo, resultados da análise de PERMANOVA pareada (pairwise test) avaliando efeito da interação entre fatores temperatura, pH e contaminação na produção de prole da espécie *Nitokra* sp. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.34

Tabela 13. Valores de CE_{50} sob as concentrações de TEL de cada metal nos diferentes meios de exposição.35

Tabela 14. Concentrações de cobre, chumbo, mercúrio e zinco adotados por países que utilizam protocolos baseados em TEL/PEL.40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	17
3.2	HABITAT E CULTIVO DOS ORGANISMOS	19
3.3	COLETA, ARMAZANAMENTO E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DO SEDIMENTO	20
3.4	FORTIFICAÇÃO DO SEDIMENTO (<i>SEDIMENT SPIKING</i>)	21
3.5	SISTEMA DE INJEÇÃO DE CO ₂ , CONTROLE DE pH E TEMPERATURA	21
3.6	ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO DE <i>Nitokra</i> sp.	22
3.7	ANÁLISE DO SISTEMA CARBONATO	23
3.8	FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS	24
4	RESULTADOS	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	25
4.2	VARIAÇÃO DE pH	26
4.3	SISTEMA CARBONATO	28
4.4	EFEITO INTERATIVO DO pH E CONTAMINAÇÃO SOBRE A REPRODUÇÃO DE <i>Nitokra</i> sp.	29
4.5	EFEITOS INTERATIVOS DA TEMPERATURA, pH, CONTAMINAÇÃO SOBRE A FECUNDIDADE DE <i>Nitokra</i> sp.	32
4.6	RESULTADOS DE CE ₅₀	35
5	DISCUSSÃO	36
	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	APÊNDICES	53

RESUMO

Modificações na temperatura e no pH de águas marinhas e oceânicas foram identificadas e tem movimentado esforços para compreender seus efeitos nos organismos. A biota marinha enfrenta ainda a contaminação química. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de contaminação de metais (Cu, Pb, Zn e Hg) no sedimento sob cenários de aquecimento e acidificação marinha na produção de prole do copépodo *Nitokra* sp.. Foram realizados ensaios com desenhos experimentais bifatorial (pH e contaminação) e trifatorial (temp., pH e contaminação). O ensaio bifatorial mostrou que o pH baixo isoladamente, independente da contaminação, assim como nível de contaminação mais alto testado (C2), para qualquer pH, provocaram a redução na produção na prole de *Nitokra* sp.. No ensaio trifatorial, a temperatura de 27°C aumentou a produção de prole em todos os tratamentos. A interação da temperatura a 27°C e o pH moderado reduziu a produção de prole nos sedimentos sem contaminação e no nível de contaminação intermediário (C1). Ambientes acidificados podem atrasar a eclosão de ovos, interferindo na produção da prole de copépodos. Já a temperatura influencia diretamente no aumento da produção de prole. Os metais em sedimentos podem potencializar sua toxicidade sobre os organismos em cenários de acidificação. Portanto, os metais quando combinados aumentam a toxicidade e o ambiente acidificado reduz a prole da espécie *Nitokra* sp. O presente estudo mostrou que a combinação dos fatores pH, temperatura e contaminação exerce efeito sob a produção de prole do organismo e subsidia a discussão sobre a necessidade de atualização dos guias de qualidade de sedimentos.

PALAVRAS-CHAVES: Mudanças Globais, Contaminação, Poluição, Copépodos, Estressores múltiplos.

1 INTRODUÇÃO

Estudos acerca da mudança climática global tem sido amplamente discutidos nas últimas décadas e evidências da influência humana no sistema climático impulsionadas pelo crescimento econômico e populacional foram identificadas (BLUNDEN; ARNDT, 2019; IPCC, 2007, 2014). Desde o início da revolução industrial tem ocorrido um aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO_2) devido às atividades humanas (BLUNDEN; ARNDT, 2019). Durante o mesmo período, foi identificado a redução em 0,1 no potencial hidrogeniônico (pH) marinho devido a absorção do CO_2 presente na atmosfera. (BLUNDEN; ARNDT, 2019). O aumento do CO_2 na atmosfera também causou aquecimento dos oceanos nas últimas décadas (CHENG et al., 2017). Segundo o Relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), estima-se para os ambientes marinhos o aumento na temperatura da superfície em 2°C e uma diminuição do pH de 0,3-0,4 unidades até 2100 (IPCC, 2007).

A redução do pH dos oceanos e mares é denominado de acidificação, que como consequência desequilibra todo o sistema carbonato (FEELY; DONEY; COOLEY, 2009). O sistema carbonato em seu estado natural funciona da seguinte maneira: CO_2 atmosférico dissocia-se na água para formar ácido carbônico (H_2CO_3) e esse também se dissocia para formar prótons (H^+) e íons bicarbonato (HCO_3^-). Por sua vez, as formas de HCO_3^- se dissociam para formar íons de carbonatos (CO_3^{2-}). Como resultado da elevação dos níveis de dissolução de CO_2 na água, a concentração de prótons aumenta e, portanto, diminui pH, que desfavorece as concentrações das espécies químicas de CO_3^{2-} (FEELY; DONEY; COOLEY, 2009). A diminuição de CO_3^{2-} reduz o estado de saturação de carbonato de cálcio (CaCO_3), que afeta diretamente organismos calcificadores (DONEY et al., 2009; ORR et al., 2005).

Outra alteração tem ocorrido com o aumento da retenção de calor na atmosfera e, conseqüentemente, no aquecimento em mares e oceanos (BALMASEDA; TRENBERTH; KÄLLÉN, 2013). Estimativas mostram que os oceanos absorvem mais de 80% do calor no planeta (LEVITUS, 2005). A partir de 1998 ocorreu um aumento significativo da temperatura nas bacias oceânicas até as camadas de 2000 metros de profundidade, com o Oceano Atlântico experimentando um dos maiores registros de aquecimento (CHENG et al., 2017).

As zonas costeiras são mais vulneráveis aos impactos da acidificação e aquecimento devido à complexidade hidrológica (aporte de água doce, correntes e marés), do sedimento, topografia e os impactos das atividades humanas (BINDOFF et al., 2019; LU et al., 2018). Espera-se em zonas costeiras uma maior redução no pH sob cenário de acidificação, pois essas áreas podem se acidificar através de outros mecanismos (eutrofização, escoamento fluvial e ressurgência costeira), além da dissolução do CO₂ atmosférico (STRONG et al., 2014). Com relação a temperatura, projeta-se que o aquecimento de águas costeiras cause maior salinização em regiões rasas, mudanças na distribuição de espécies, expansão das áreas sob condições de hipóxia e anóxia devido a aportes de nutrientes (BINDOFF et al., 2019).

Os parâmetros físico-químicos de ambientes marinhos interferem diretamente na fisiologia e ecologia dos organismos (HARLEY et al., 2006). Por exemplo, diferentes temperaturas afetam a distribuição dos indivíduos, visto que a resistência aos limites termais é determinante para todas as etapas do ciclo de vida (BRANCO et al., 2013; KLEISNER et al., 2017; MADEIRA et al., 2016; SHAMA, 2015). O aumento da temperatura no ambiente marinho pode ocasionar a mortalidade em massa, aumento de doenças, hipóxia, branqueamento de corais, invasões de espécies, mudanças fenológicas na dinâmica da cadeia alimentar planctônica, limitação fisiológica no consumo de oxigênio e aumento dos custos de metabolismo (GIBSON et al., 2011). Ademais, o pH marinho regula funções biológicas importantes como equilíbrio ácido-base, respiração, renovação de energia, metabolismo, crescimento, calcificação e reprodução. Por isso, variações na pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂) e, conseqüentemente, no pH podem comprometer todos esses processos biológicos (DONEY et al., 2009; MILLER et al., 2013; PÖRTNER; LANGENBUCH; REIPSCHLÄGER, 2004; ZHANG et al., 2011a).

Simultaneamente às mudanças climáticas, a biota marinha está sujeita aos efeitos de outro estressor, a contaminação química (CHAPMAN, 2006; DELORENZO, 2015; LU et al., 2018). Metais potencialmente tóxicos, por exemplo, embora sejam naturalmente encontrados em ambientes aquáticos e nos sedimentos devido a processos geológicos (LU et al., 2018), são frequentemente detectados em concentrações acima das naturais nas regiões costeiras que apresentam atividades antropogê-

nicas (CETESB, 2019). As fontes comumente ligadas a esses elementos incluem atividade de mineração, efluentes industriais (indústria siderúrgica, indústria química, refinarias, entre outros), efluentes domésticos (emissários, áreas sem cobertura de saneamento básico, introduções clandestinas), áreas portuárias, precipitação atmosférica, escoamento superficial de áreas agrícolas e urbanas (FÖRSTNER, 1979; LU et al., 2018). Os metais com potencial ecotoxicológico frequentemente reportados em sedimentos costeiros são o zinco (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr), chumbo (Pb), níquel (Ni), arsênico (As), mercúrio (Hg) e cádmio (Cd) (LU et al., 2018).

A deposição de metais em sedimentos ocorre por meio processos de (i) sorção e troca catiônica, principalmente em sedimentos de baixa granulometria; (ii) precipitação de hidróxidos, óxidos e carbonatos; (iii) mecanismos de adsorção, floculação, polimerização e precipitação da matéria orgânica, que desempenham um papel importante na transferência de metais entre as fases dissolvida e sólida e (vi) como constituintes de minerais (FÖRSTNER, 1979; FÖRSTNER; PATCHINEELAM, 1981).

Como resultado da elevação dos níveis de dissolução de CO₂ na água, a concentração de íons de H⁺ aumenta, o que leva os íons metálicos sobre a superfície do sedimento se deslocarem e retornarem para a fase aquosa (Figura 1) (BAIRD; CANN, 2011; FEELY; DONEY; COOLEY, 2009). Os metais adsorvidos em sedimentos inorgânicos, principalmente na superfície das partículas de argila, criam uma camada externa de cátions ligadas eletrostaticamente a uma camada interna dos sedimentos, também eletricamente carregada. Dependendo da concentração de cátions na água, os cátions adsorvidos nas partículas sedimentares são suscetíveis de serem trocados por eles (BAIRD; CANN, 2011).

Em metais ligados a substâncias orgânicas no meio marinho, acredita-se que a presença dos grupos funcionais ligantes (fenólicos e carboxílicos) presentes na matéria orgânica podem ser responsáveis pela quelação dos metais e exibirem dependência de carga em função do pH. Com isso, um ambiente mais ácido influenciaria esses ligantes orgânicos, acarretando a liberação de formas livres de metais de volta para a água (MILLERO et al., 2009). Desta forma, a acidificação pode tornar os metais biodisponíveis e mais tóxicos para a biota (DE ORTE et al., 2014b; MILLERO et al., 2009; PASSARELLI et al., 2017; WANG et al., 2015).

dos Princípios Canadenses para a Qualidade dos Sedimentos e para a Proteção da Vida Aquática (CCME, 1995; HÜBNER; ASTIN; HERBERT, 2009). O menor limite (TEL) representa a concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos adversos para os organismos aquáticos. O maior limite (PEL) representa a concentração acima da qual são frequentemente esperados efeitos adversos para os organismos. Na faixa entre TEL e PEL situam-se os valores onde ocasionalmente espera-se a ocorrência de tais efeitos. Esses valores-guia são baseados nas concentrações totais e na probabilidade de ocorrência de efeitos deletérios na biota em decorrência da sua exposição a esses níveis de concentração (SARAIVA, 2007).

Os valores de TEL/PEL canadense derivam de valores de relatórios publicados para águas costeiras do estado da Flórida (MACDONALD et al., 1996) e esses, por sua vez, foram derivados do *Biological Effects Database for Sediments* (BEDS). O BEDS é um conjunto de dados químicos e biológicos, com origem dos primeiros estudos americanos relacionados com o *National Status and Trends Program* (NSTP) organizado por meio da *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) e desenvolvido por Long e Morgan (1990) (HÜBNER; ASTIN; HERBERT, 2009; LONG; MACDONALD, 1998). O objetivo deste projeto era determinar o status e avaliar a saúde ambiental das águas estuarinas e costeiras dos EUA pela coleta e análise anuais de bivalves, peixes de fundo e amostras de sedimento. Esse programa é considerado o primeiro grande avanço no desenvolvimento de valores de orientação (HÜBNER; ASTIN; HERBERT, 2009).

No Brasil existe apenas valores-guia para sedimentos dragados, que são estabelecidos pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), cuja resolução nº 454 de 2012 estabelece os valores que norteiam o descarte do sedimento em todo território do país (BRASIL, 2012). Os valores dessa resolução foram baseados nos protocolos americano (*Approach to Assessment of Sediment Quality in Florida Coastal Waters*) e canadense (*Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*) (CHOUERI et al., 2009). Como não existem padrões de qualidade para sedimentos na legislação brasileira, o estado de São Paulo, por exemplo, por meio da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), utiliza os valores-guia de sedimentos baseados em TEL/PEL na avaliação da qualidade do sedimento nas regiões costeiras do estado.

Os resultados são publicados no Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo, o qual inclui a avaliação da qualidade do sedimento (CETESB, 2019; SARAIVA, 2007).

A qualidade do sedimento pode ser avaliada por meio de linhas de evidências como análises químicas, ensaios ecotoxicológicos e avaliações ecológicas (estudo da estrutura de comunidades bentônicas) (ABESSA; SOUSA; TOMMASI, 2006; ALBUQUERQUE; ABESSA, 2006; SIMPSON; BATLEY, 2016). Como ferramenta ecotoxicológica de avaliação de sedimento, no país, são utilizados os ensaios crônico e agudo com copépodos Harpacticoidas (*Tisbe biminiensis* e *Nitokra* sp.) (FENILI, 2012; LAVORANTE et al., 2013; LOTUFO; ABESSA, 2002; RIBEIRO; SOUZA-SANTOS, 2011).

Os copépodos da ordem Harpacticoida são usados frequentemente na ecotoxicologia marinha devido suas características, tais como o ciclo de vida curto; importância como componente ecológico na cadeia trófica, distribuição ampla nos ambientes marinhos e estuarinos, hábitos que favorecem a interação com o sedimento e sensibilidade a diversos contaminantes. Além disso, esses copépodos podem ser criados em condições de laboratório a baixo custo, o que permite um estoque contínuo de organismos em diferentes estágios do ciclo de vida (KWOK et al., 2015; LAVORANTE et al., 2013; LOTUFO; ABESSA, 2002; RIBEIRO; SOUZA-SANTOS, 2011).

Os valores orientadores nos protocolos de qualidade ambiental dos sedimentos são estabelecidos sob um cenário ambiental sem considerar possíveis mudanças climáticas. Desta maneira, os critérios de qualidade ambiental atuais (água e sedimento) podem se tornar obsoletos dada as alterações nas propriedades, biodisponibilidade e, portanto, toxicidade dos contaminantes com as mudanças ambientais globais (LU et al., 2018). Por isso, as pesquisas nesse contexto são necessárias para que se conheçam o risco ecológico de cenários futuros de alteração do meio marinho, e assim fornecer subsídios para ações de gestão, como a atualização e criação de critérios de qualidade de sedimento para uma proteção eficaz do ambiente marinho.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produção de prole do copépodo *Nitokra* sp. sob o efeito de metais no sedimento em condições de aquecimento e acidificação do meio marinho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Avaliar a produção de prole do copépodo *Nitokra* sp. sob o efeito combinado da acidificação e aquecimento do meio marinho;
- Avaliar a produção de prole do copépodo *Nitokra* sp. sob o efeito de diferentes metais no sedimento em concentrações inferiores a valores de TEL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Respostas biológicas sobre a produção de prole do copépodo bentônico *Nitokra* sp. foram avaliadas frente à manipulação de contaminação do sedimento e condições de aquecimento e acidificação.

As exposições dos sedimentos fortificados com metais foram acompanhadas de exposições a sedimentos não fortificados, cujas respostas representaram o controle negativo de contaminação. Foram expostas quatro réplicas biológicas e oito réplicas de análise química por tratamento (Figura 2). As concentrações nominais de metais para a contaminação/ fortificação foram baseados no *Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life* (CCME, 2002). Estes contaminantes foram testados em concentrações inferiores ao *Threshold Effects Level* (TEL) e pipetados a partir de soluções estoques para cada metal no sedimento (Tabela 1).

O tratamento bifatorial contou com pH em condições sem acidificação (7,70), acidificação moderada (7,10) e alta (6,70), em temperatura a 25°C, com sedimento controle e sedimentos fortificados com duas concentrações de metais. Testou-se para o tratamento trifatorial duas condições de pH (7,70 e 7,10), duas temperaturas (25°C e 27°C) e sedimentos contaminados (fortificado com duas concentrações distintas de metais) e não contaminado. A Figura 2 apresenta o desenho experimental do trabalho.

Tabela 1. Valores dos parâmetros físico-químicos dos meios de exposição e concentrações nominais de metais utilizados nos ensaios de produção de prole de *Nitokra* sp.

Fatores	Controle	Contaminação 1 (C1)	Contaminação 2 (C2)
Temperatura	25 °C	27 °C	-
pH	7,70 (natural)	7,10	6,70
Metais		(37,7% de TEL)	(75,0% de TEL)
Cobre (Cu)	Sem fortificação	7,01 mg kg ⁻¹	14,03 mg kg ⁻¹
Chumbo (Pb)	Sem fortificação	11,33 mg kg ⁻¹	22,65mg kg ⁻¹
Zinco (Zn)	Sem fortificação	46,50 mg kg ⁻¹	93,00mg kg ⁻¹
Mercúrio (Hg)	Sem fortificação	0,05mg kg ⁻¹	0,10mg kg ⁻¹

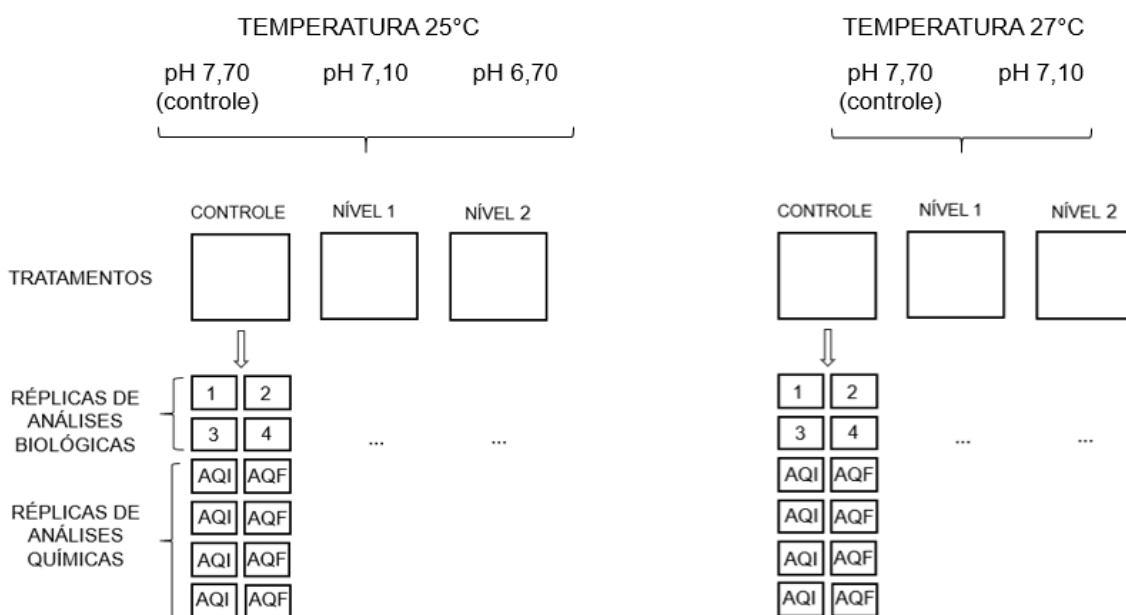


Figura 2. Desenho experimental do ensaio de *Nitokra* sp. em sedimentos contaminados com metais e expostos a cenários de mudanças climáticas. Legenda: AQI: Análise Química Inicial; AQF: Análise Química Final.

A diminuição do pH e o aumento da temperatura em 2°C foram estabelecidos a partir das previsões do relatório do IPCC (2007) para o ano de 2100. Adotou-se valores de pH a partir de 7,70 (pH de equilíbrio do sedimento no controle sem injeção de CO₂). Os estuários do estado de São Paulo apresentam valores entorno do pH adotado como referência para determinar os tratamentos, e a espécie-teste utilizada tem como origem o Estuário Lagunar de Cananéia (CETESB, 2019; LOTUFO; ABESSA, 2002).

3.2 HABITAT E CULTIVO DOS ORGANISMOS

O copépodo *Nitokra* sp. pertence ao Filo Arthropoda, Subfilo Crustácea, Classe Maxillopoda, Subclasse Copepoda, Ordem Harpacticoida, e Gênero *Nitokra* (KWOK et al., 2015). É um copépodo bentônico que possui reprodução sexuada, gerando ovos que são carregados pela fêmea em uma bolsa (LOTUFO; ABESSA, 2002; DAHMS; QIAN, 2004). A eclosão dos ovos origina os náuplios que se metamorfoseiam em copepoditos, até chegarem à vida adulta. A fase náuplio compreende seis estágios e a fase de copepodito cinco estágios (DAHMS; QIAN, 2004; LOTUFO; ABESSA, 2002). Esses organismos são considerados onívoros (HICKS; COULL, 1983). Em culturas de laboratórios a alimentação com algas, principalmente diatomáceas, mostra-se eficiente (CHEN et al., 2018; DAHL et al., 2009; KOCH et al., 2017; WYCKMANS et al., 2007).

A espécie *Nitokra* sp. tem como habitat ambientes estuarinos (LOTUFO; ABESSA, 2002). Os estuários são ambientes de transição entre os sistemas aquáticos dulcícolas e marinhos, com características de variações morfológicas, circulação da água e de salinidade, decorrentes da influência de marés, precipitações e sazonalidades fluviais. Recebem também o aporte de sedimentos e de nutrientes, tanto marinhos como fluviais (SCHAEFFER-NOVELLI, 1991; SCHAEFFERNOVELLI, 1995; SILVA, 2000). A coorte original a partir da qual nossas culturas foram estabelecidas foi coletada na região entre-marés no Estuário Lagunar de Cananéia (SP, Brasil) (LOTUFO; ABESSA, 2002).

A região de origem da espécie modelo, Estuário Lagunar de Cananéia, tem como característica a alternância de períodos com chuvas intensas nos meses de

verão (novembro a março/abril) e períodos mais secos no inverno. A temperatura média da água durante o verão é registrada em torno dos 27,0°C e durante o inverno 19,8°C. Já o pH possui valor médio de 7,77. Entretanto, verifica-se valores de pH próximos a 8 junto às áreas de maior influência marinha e menor que 8 nas áreas mais internas do estuário (AZEVEDO; BRAGA, 2011; CETESB, 2019). Para a salinidade o valor médio na região é de 24, mas com variações causadas por aporte de água doce e maré ao longo do estuário (MIYAO; NISHIHARA; SARTI, 1986; CETESB, 2019).

Os copépodos *Nitokra* sp. foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia e Contaminação Marinha (LECMAR) da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP) através do procedimento de cultivo adaptado de Lotufo e Abessa (2002). O cultivo foi mantido em água marinha reconstruída com Red Sea Salt® em uma salinidade 17, dentro de uma incubadora com temperatura a 25°C, fotoperíodo controlado (12h:12h claro/escuro), sendo alimentado três vezes por semana com uma mistura de ração para peixe. A manutenção das culturas de *Nitokra* sp. foi realizada mensalmente, com troca de 25% da água. As culturas são replicadas a cada manutenção, ou seja, os organismos são filtrados em malha de 0,125 µm e novas culturas são iniciadas. A carta controle referente ao cultivo da espécie *Nitokra* sp. pode ser consultada no Apêndice 1.

3.3 COLETA, ARMAZANAMENTO E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DO SEDIMENTO

Os sedimentos utilizados em todos os ensaios foram coletados em uma área de referência localizado no manguezal da foz do rio Itaguapé (-23,763° S e -45,773° O) no município de Bertioga (SP). Os sedimentos coletados foram transportados em recipiente plástico e armazenados em laboratório sob temperatura constante de 4°C e ao abrigo da luz.

O sedimento foi analisado quanto à granulometria, através de peneiramento seco (DIAS, 2004) e classificado com base na escala de Wentworth (1922). O conteúdo de CaCO₃ foi quantificado através de ataque ácido clorídrico 5N (HCl5N) (HIROTA; SZYPER, 1975) e o teor de matéria orgânica (MO) quantificado através do método de perda de massa por ignição (LUCZAK; JANQUIN; KUPKA, 1997).

3.4 FORTIFICAÇÃO DO SEDIMENTO (*SEDIMENT SPIKING*)

Para realização dos experimentos foram preparadas amostras de sedimento marcado com metais, seguindo metodologia *spiked* adaptada da USEPA (2001). Os sedimentos foram fortificados com metais em solução aquosa. A fortificação foi feita utilizando soluções estoques de cada metal de interesse, preparadas a partir da dissolução padrão das substâncias de sulfato de cobre, cloreto de chumbo, sulfato de zinco e cloreto de mercúrio (grau de reagente) em seu respectivo solvente (água).

O sedimento (composto de 20% de sedimento predominantemente lamoso e 80% de sedimento predominantemente arenoso) foi seco em estufa (4 dias a 60°C) e a umidade foi posteriormente recomposta. As concentrações finais de água foram as mesmas para todos os tratamentos. O sedimento fortificado foi agitado durante 15 minutos. Por fim, o sedimento foi deixado em repouso, resfriado a 4°C e abrigado da luz, para que as substâncias adicionadas pudessem atingir o equilíbrio químico com o sedimento (7 dias para metais) (ASTM, 2014).

3.5 SISTEMA DE INJEÇÃO DE CO₂, CONTROLE DE pH E TEMPERATURA

O sistema de injeção de CO₂ e controle de pH compreendeu uma série de válvulas solenoides conectadas a um computador e uma fonte de injeção automática de CO₂, que permitiu a entrada do gás de forma independente em cada uma das unidades do sistema-teste. Através de um software de controle (Apexfusion®), o pH de cada sistema de exposição foi determinado e, por meio de sensores, monitorado continuamente durante as exposições. Quando detectado um valor de pH 0,04 superior ao estabelecido, este sistema liberava automaticamente o CO₂ em quantidade suficiente para que o valor de pH fosse restabelecido e, desta forma, mantido durante todo o tempo de exposição.

O sistema de caixa hermética adaptado de Lee et al. (2016) foi utilizado, conforme Figura 3. O CO₂ foi infundido indiretamente nos meios de exposição, ou seja, criou-se uma atmosfera em cada caixa. Nas caixas foram acomodados, além dos bé-

queres do sistemas-teste (réplica contendo os organismos e réplicas para análise química), dois béqueres a mais contendo sedimento e água de diluição na mesma proporção utilizada nas exposições dos organismos. Em um dos béqueres o CO₂ foi borbulhado através de injeção direta, enquanto no outro béquer foi mantido o sensor de pH. Desta forma, o CO₂ borbulhado no primeiro béquer foi infundido tanto no béquer de controle de pH quanto nos sistemas-teste.

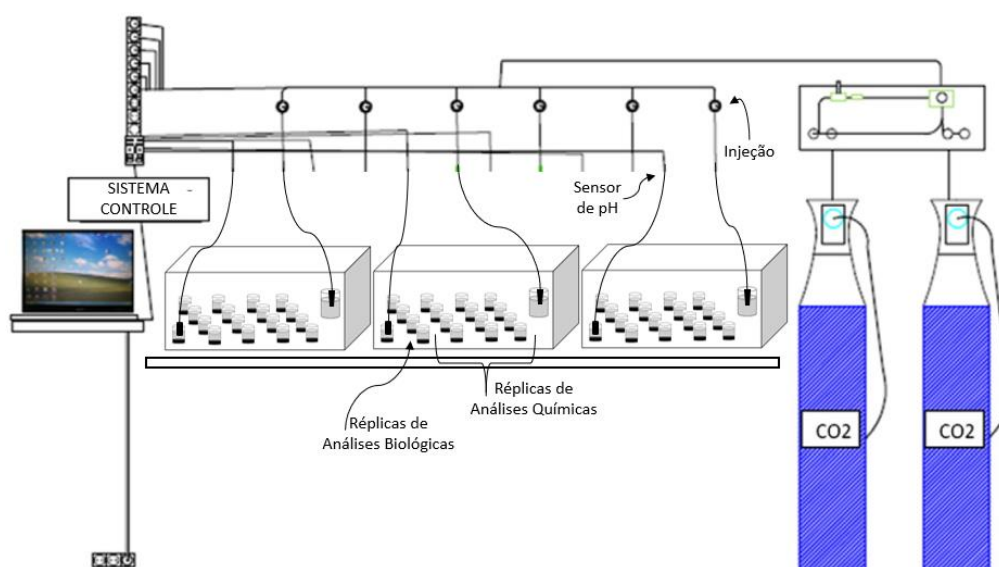


Figura 3. O sistema de injeção de CO₂ e sistema de caixa hermética adaptado de Lee et al. (2016).
Fonte: adaptado de De Orte et al. (2014b).

Para garantir a homogeneidade das temperaturas foram utilizados dois tipos de controle: (i) sala climatizada mantida através de condicionador apresentando função reversa (quente/frio) para a temperatura de 25°C; (ii) banho-maria com controle de termostato para a temperatura de 27°C.

3.6 ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO DE *Nitokra* sp.

As condições dos ensaios com o organismo *Nitokra* sp. foram adaptadas das recomendações de Lotufo e Abessa (2002). O ensaio de toxicidade crônica com sedimento utilizou fêmeas ovígeras do cultivo mantido pelo laboratório LECMAR em béqueres de vidro de 30mL inseridos na caixa hermética, contendo 5mL de sedimento

fortificado com metais nas concentrações determinadas, e 20mL de água de diluição filtrada, em salinidade 17. Os frascos permaneceram em descanso por 24 horas para que o sedimento decantasse e estabilizasse. Quatro réplicas foram preparadas para cada amostra de sedimento, com 7 fêmeas ovígeras em cada. O ensaio foi mantido sem aeração e com fotoperíodo de 12h:12h (luz: escuro) durante 10 dias.

Os parâmetros físico-químicos da água (salinidade, oxigênio dissolvido e amônia) foram mensuradas no início e ao final do ensaio. Ao final do período de teste, as réplicas foram fixadas com 0,5mL formaldeído 10% e coradas com 0,5mL de solução alcoólica de Rosa de Bengala 1%. O efeito sobre a produção de prole foi analisado através da contagem de náuplios e copepoditos (Figura 4). O resultado da soma de ambos foi dividido pelo número de fêmeas adultas adicionadas por réplica.



Figura 4. Estágios de vida da espécie *Nitokra* sp.. Legenda: a) fêmea adulta (sem bolsa de ovos); b) copepodito; c) náuplio.

3.7 ANÁLISE DO SISTEMA CARBONATO

A especiação do sistema carbonato, que consisti nas concentrações de alcalinidade total (AT), carbono inorgânico total (CIT), HCO_3^- , CO_3^{2-} , CO_2 , ppCO_2 , saturação (Ω) de aragonita, Ω calcita, foi caracterizada em todos os ensaios, tanto nos tratamentos contaminados quanto nos controles de contaminação. A alcalinidade total foi medida na água, após o tempo de exposição, através de titulação com HCl (0,1M) e auxílio de titulador automático (Hanna HI 901). Os dados provenientes das análises de pH e alcalinidade total foram utilizados para estimar a especiação do sistema carbonato, através do programa CO_2SYS (PIERROT; WALLACE, 2006), com escala de

pH NBS ($\text{mol kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) e constante de dissociação de Mehrbach et al.. (1973), adaptado por Dickson e Millero (1987).

3.8 FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS

O efeito dos fatores fixos pH, temperatura e contaminação, e interações entre eles, sob as respostas de fecundidade de *Nitokra* sp. foram avaliados através de *Permutational multivariate analysis of variance* (PERMANOVA) no programa estatístico *PRIMER6* (versão 6.1.16 e versão PERMANOVA 1.0.6), a partir de uma matriz de distâncias calculada através de distância Euclideana (ANDERSON, 2017). Primeiro, a PERMANOVA bifatorial foi realizada para testar efeito de pH (3 níveis: pH 7.70, pH 7.10 e pH 6.70) e metais (3 níveis: controle, C1 e C2) sobre a fecundidade de *Nitokra* sp.. Posteriormente, foi realizada PERMANOVA trifatorial para testar efeito do pH (2 níveis: pH 7.70 e pH 7.10), metais (3 níveis: controle, C1 e C2) e temperatura (2 níveis: 25 e 27°C) sobre a fecundidade do mesmo organismo. Testes pareados (com permutação de Monte Carlo) foram feitos para detectar entre quais níveis estavam as diferenças significativas eventualmente apontadas pelo teste principal. Caso o termo com resultado significativo fosse referente a interação de fatores, apenas o termo com interação de maior número de fatores era submetido aos testes pareados. Para todos os testes foi utilizado $\alpha=5\%$.

A PERMANOVA não exige a premissa de normalidade da distribuição dos dados, mas pode ser sensível à heterogeneidade das variâncias. Para testar a homocedasticidade foi empregado o teste de Levene (bifatorial ou trifatorial, dependendo da matriz que se estava testando), disponibilizado pela rotina PERMIDISP do programa estatístico *PRIMER 6*.

O efeito da concentração, baseados em TEL (37,7% e 75,0%) para cada metal, também foi avaliada com base na determinação da estimativa da concentração efetiva média para 50% dos organismos (CE_{50}). A estimativa de CE_{50} foi realizada a partir de regressão não linear sobre os dados (porcentagem sobre TEL e produção de prole) logaritmizados. Todos os testes foram realizados no programa estatístico *GraphPad Prism 7*.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO E PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os teores de matéria orgânica e CaCO_3 obtidos nas amostras de sedimento foram de 1,35% e 1,59%, respectivamente. A análise granulométrica demonstrou predominância de areia fina (71,37%), seguido de areia muito fina (23,91%), apresentando uma porcentagem de silte e argila de 0,46% (Figura 5).

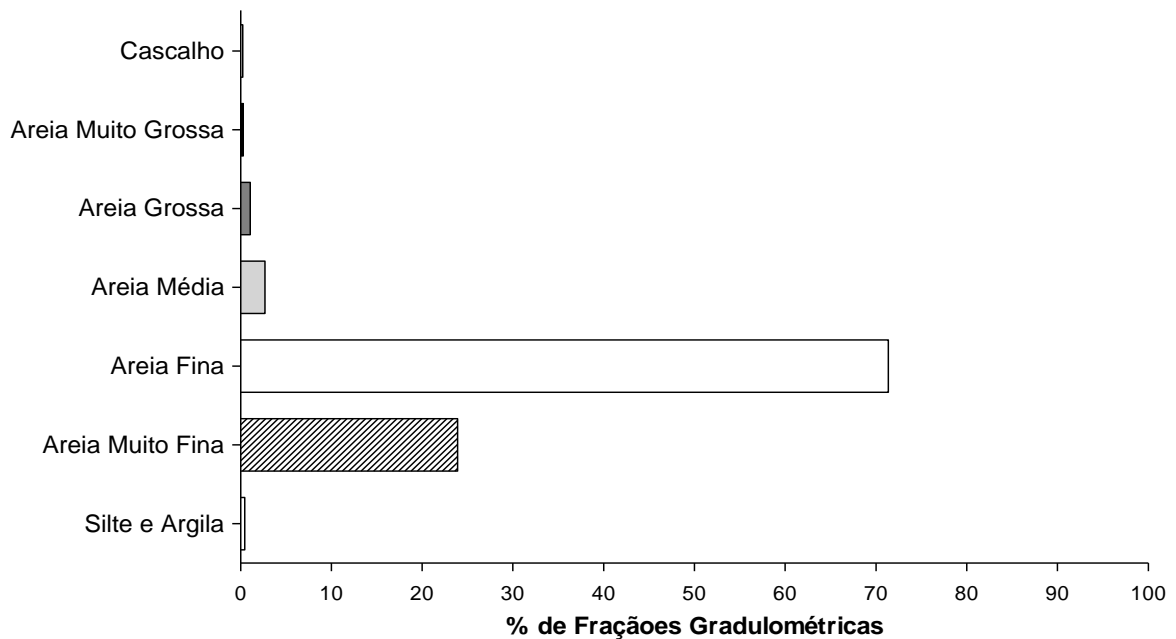


Figura 5. Análises sedimentológica segundo a escala de Wentworth e porcentagem de predomínio dos grãos.

Os parâmetros físico-químicos de oxigênio dissolvido (O.D.), salinidade (Sal) e temperatura (Temp) medidos ao final do ensaio estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos parâmetros salinidade (Sal), oxigênio dissolvido (OD) e temperatura (Temp) no ensaio de toxicidade com sedimento. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2; NT) não testado.

Parâmetros Físico-químicos	Temperatura 25°C								
	7,70			7,10			6,70		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
Salinidade	18	20	20	22	22	22	20	20	20
OD (mg/L)	7,19	7,27	7,66	7,41	7,71	7,86	7,13	7,91	7,54
Temp (°C)	25,12								
Parâmetros Físico-químicos	Temperatura 27°C								
	7,70			7,10			6,70		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
Salinidade	22	22	22	22	22	23	NT	NT	NT
OD (mg/L)	7,05	6,92	7,60	6,67	6,89	6,85	NT	NT	NT
Temp (°C)	27,47								

4.2 VARIAÇÃO DE pH

A Tabela 3 refere-se aos resultados das variações médias diárias em cada sistema teste dos valores de pH, bem como o desvio padrão (σ). Assumiu-se o valor de pH 7,70 como o valor representativo para o pH controle, pH 7,10 e pH 6,70 para os tratamentos de pH, uma vez que a média de pH obtida no experimento demonstrou diferença em relação aos valores pré-determinados como tratamento (pH 7,40; pH 7,10; pH 6,60). Tais diferenças não necessariamente representam a ausência de condições controladas no experimento, uma vez que foi mantida diferença entre 0,4-0,6 unidades de pH entre os tratamentos.

Tabela 3. Resultados das variações médias e desvio padrão de pH em cada sistema teste. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2; NT) não testado.

Temp	Contam.	pH					
		7,70	$\sigma(\pm)$	7,10	$\sigma(\pm)$	6,70	$\sigma(\pm)$
25°C	Cntrl	7,70	0,18	7,15	0,34	6,78	0,24
	C1	7,85	0,21	7,06	0,30	6,77	0,33
	C2	7,57	0,14	7,05	0,25	6,72	0,38
27°C	Cntrl	7,69	0,14	7,18	0,46	NT	NT
	C1	7,69	0,13	6,92	0,28	NT	NT
	C2	7,85	0,05	7,10	0,32	NT	NT

Uma análise de PERMANOVA foi realizada com as médias diárias de pH, objetivando a confirmação de cenários distintos de acidificação entre cada tratamento, tanto para as condições bifatoriais como para trifatoriais. Os tratamentos de pH se mostraram estatisticamente distintos no teste principal nas análises bifatoriais (valores destacados em negrito na Tabela 4). Testes pareados também foram feitos para detectar entre quais níveis estavam as diferenças significativas, indicando diferença entre todos os níveis de pH estipulados, independente das concentrações de metais, como mostra a Tabela 5.

Tabela 4. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando a variação média de pH nos tratamentos bifatoriais. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) *degrees of freedom*; SS) *Sum of Squares*; MS) *Mean Squares*; p(perm) valor de p permutacional.

Fatores	df	SS	MS	Pseudo-F	p(perm)
pH	2	15,280	7,640	102,710	0,001
Concentrações	2	0,271	0,135	1,821	0,163
pH vs. Concentração	4	0,269	0,067	0,906	0,481
Residual	90	6,695	0,074		
Total	98	22,515			

Tabela 5. Resultado dos valores de p de Monte Carlo obtidos da análise de PERMANOVA pareada (*pairwise test*) avaliando os dados de monitoramento de pH. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.

pH	Cntrl	C1	C2
pH 7,70 vs. pH 7,10	0,001	0,001	0,001
pH 7,70 vs. pH 6,70	0,001	0,001	0,001
pH 7,10 vs. pH 6,70	0,008	0,044	0,028

O teste principal da PERMANOVA trifatorial apresentou diferença significativa para o fator pH (valores em negrito na Tabela 6). Também foi realizado o teste PERMANOVA pareada (*pairwise test*) para identificar diferenças significativas nos níveis testados. Os resultados mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois níveis de pH, independente das temperaturas e concentrações de metais (Tabela 7).

Tabela 6. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando a variação média de pH nos tratamentos trifatoriais. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) *degrees of freedom*; SS) *Sum of Squares*; MS) *Mean Squares*; p(perm) valor de p permutacional.

Fatores	df	SS	MS	Pseudo-F	p(perm)
Temperatura	1	0,0033	0,0033	0,0499	0,817
pH	2	0,0682	0,0341	0,5158	0,001
Concentrações	1	13,9170	13,9170	210,5300	0,602
Temperatura vs. Concentração	2	0,5680	0,2840	4,2964	0,016
Temperatura vs. pH	1	0,0303	0,0303	0,4584	0,478
pH vs. Concentração	2	0,3405	0,1703	2,5757	0,086
Temperatura vs. pH vs. Concentração	2	0,1215	0,0608	0,9192	0,413
Residual	120	7,9324	0,0661		
Total	131	22,9810			

Tabela 7 Resultado dos valores de p de Monte Carlo obtidos da análise de PERMANOVA pareada (pairwise test) avaliando os dados de monitoramento de pH, considerando as combinações dos fatores temperatura, pH e contaminação. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.

Temperatura	pH 7,70			pH 7,10		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
T25°C vs. T27°C	0,921	0,053	0,001	0,869	0,259	0,675
pH	T25°C			T27°C		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
pH 7,70 vs. pH 7,10	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001
Contaminação	T25°C		T27°C			
	pH 7,70	pH 7,10	pH 7,70	pH 7,10		
Cntrl vs. C1	0,103	0,504	0,936	0,129		
Cntrl vs. C2	0,056	0,417	0,002	0,664		
C1 vs. C2	0,001	0,908	0,001	0,185		

4.3 SISTEMA CARBONATO

Os valores para a especiação do sistema carbonato são apresentados na Tabela 8. A acidificação dos sistemas testes aumentou a AT e CIT (soma dos HCO_3^- , CO_3^{2-} e CO_2), ou seja, um padrão de aumento à medida que o pH foi reduzido, com os maiores valores nos cenários de menor pH sob qualquer temperatura. O mesmo comportamento foi encontrado para a pCO_2 , em que os maiores valores foram observados nos tratamentos mais acidificados em cada temperatura. A Ω_{Ca} e Ω_{Ar} registraram comportamento inverso a AT e CIT, apresentando valores menores à medida que

o pH diminuía, visto que os menores valores foram encontrados nos cenários mais ácidos para qualquer temperatura. Das espécies do sistema carbonato que compreendem o CIT, apenas o CO_3^{2-} apresentou a tendência de diminuição conforme o pH diminuía, sendo esse comportamento registrado em ambas temperaturas (25°C e 27°C). Os dados registrados eram esperados e se referem aos parâmetros de carbono inorgânico calculados na água ao final do ensaio.

Tabela 8. Especificação do sistema carbonato para o ensaio com metais no sedimento em diferentes cenários de aquecimento e acidificação. Alcalinidade total (AT), carbono inorgânico total (CIT), bicarbonato (HCO_3^-), carbonato (CO_3^{2-}); pressão parcial de CO_2 (pCO_2); estado de saturação para calcita (Ω Cal), estado de saturação para aragonita (Ω Arag). Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.

Fatores		AT ($\mu\text{mol/kg}$)	CIT ($\mu\text{mol/kg}$)	HCO_3^- ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_3^{2-} ($\mu\text{mol/kg}$)	CO_2 ($\mu\text{mol/kg}$)	pCO_2 (μatm)	Ω Ar	Ω Ca	
T25°C	pH 7,70	Cntrl	2427,10	2365,15	2255,70	75,12	34,33	846,60	1,99	1,19
		C1	2408,70	2345,34	2233,70	76,01	35,63	957,60	2,00	1,22
		C2	2049,00	2035,80	1943,90	44,66	47,24	1337,30	1,18	0,73
	pH 7,10	Cntrl	4071,60	4481,63	4022,80	22,36	436,47	13530,80	0,59	0,37
		C1	3996,90	4387,84	3947,60	22,53	417,71	12984,20	0,59	0,37
		C2	3746,00	4174,10	3705,50	18,42	450,18	13993,60	0,49	0,30
	pH 6,70	Cntrl	4663,40	6207,02	4646,10	8,22	1552,70	48400,60	0,22	0,14
		C1	4573,10	5865,68	4553,30	9,36	1303,02	40292,70	0,25	0,15
		C2	4958,20	6256,02	4935,00	10,99	1310,03	40836,10	0,30	0,18
T27°C	pH 7,70	Cntrl	2234,20	2149,12	2035,20	84,94	28,98	876,70	2,23	1,39
		C1	2065,90	1983,82	1878,00	79,25	26,57	810,60	2,09	1,30
		C2	2070,60	2005,21	1904,10	70,24	30,87	944,20	1,85	1,15
	pH 7,10	Cntrl	4269,80	4818,06	4228,40	19,08	570,58	17974,80	0,50	0,32
		C1	5445,70	6051,34	5386,80	27,60	636,94	19905,40	0,73	0,46
		C2	4224,50	4667,72	4174,40	22,98	470,34	14974,60	0,60	0,38

4.4 EFEITO INTERATIVO DO pH E CONTAMINAÇÃO SOBRE A REPRODUÇÃO DE *Nitokra* sp.

A Figura 6 apresenta a produção de prole nos tratamentos em condições bifatoriais. A produção de prole por réplica em cada tratamento está descrita no Apêndice 2. Esses valores foram utilizados para os cálculos de homocedasticidade (disper-

são entre réplicas) e PERMANOVA. Ressalta-se que algumas combinações apresentaram diferença na dispersão, contudo as médias foram suficientemente diferentes pra afirmar que são distintas entre elas e não distintas entre as dispersões.

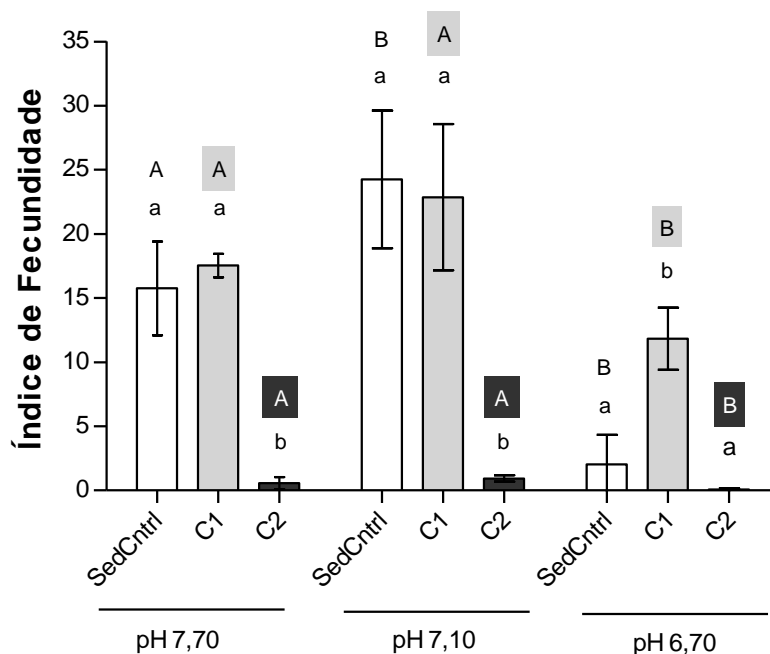


Figura 6. Médias e desvio-padrão (n=4) dos resultados da produção de prole para a exposição de metais no sedimento (Concentração 1 e Concentração 2) e controle sedimento em diferentes meios de exposição de pH (7,70; 7,10 e 6,70), em temperatura a 25°C. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes. Letras minúsculas comparam níveis de contaminação em cada nível de pH. Letras maiúsculas comparam níveis de pHs em cada nível de contaminação (letras maiúsculas em fundos branco, cinza claro e preto referem-se a comparações de pH em sedimento controle, C1 e C2 de contaminação, respectivamente).

O efeito isolado do pH e da contaminação, assim como o efeito das interações entre eles na produção de prole estão descritos na Tabela 9. Todos os fatores, isolados ou em interação, apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$).

A análise pareada (*pairwise test*) da PERMANOVA (valor p de Monte Carlo) foi aplicada para comparar a produção de prole da espécie *Nitokra* sp. entre cada combinação dos meios de exposição de pH (7,70; 7,10 e 6,70) com os níveis de contaminação de sedimento (Tabela 10). A comparação entre cada nível de contaminação (sedimento controle e sedimento contaminado com diferentes níveis de metais), dentro de cada nível de pH, também foi realizada.

Tabela 9. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito dos fatores pH (3 níveis) e contaminação (3 níveis) e a interação entre eles sob a produção de prole da espécie *Nitokra* sp.. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) *degrees of freedom*; SS) *Sum of Squares*; MS) *Mean Squares*; p(perm) valor de p permutacional.

Fatores	df	SS	MS	Pseudo-F	p(perm)
pH	2	782,88	391,44	40,57	0,001
Concentrações	2	1913,70	956,83	99,17	0,001
pH vs. Concentração	4	467,37	116,84	12,11	0,001
Residual	27	260,50	9,65		
Total	35	3424,40			

A comparação do sedimento controle apresentou diferença estatística entre os meios de exposição de pH 7,70 e pH 7,10, com aumento da prole no pH moderado (Figura 6). De maneira oposta, não houve diferença significativa na produção de prole em qualquer nível de contaminação testado, apresentando um pequeno aumento no meio de exposição de pH moderado (7,10). A comparação entre o meio de exposição de pH controle e o de pH baixo (6,70), apresentou diferença significativa tanto para o tratamento controle como para o nível de C1. No entanto, não houve mudança significativa na produção de prole de *Nitokra* sp. entre a comparação desses dois meios de exposição de pH para o nível de C2, apresentando produção de prole muito baixa em qualquer pH. A comparação entre o meio de exposição com pH moderado e com o pH baixo (6,70) apresentou diferença significativa, com diminuição da produção de prole, tanto no controle quanto nos outros dois níveis de contaminação, no meio de exposição com pH baixo (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de p de Monte Carlo, resultados da análise de PERMANOVA pareada (*pairwise test*) avaliando efeito da interação entre fatores pH e contaminação na produção de prole da espécie *Nitokra* sp. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.

pH	Cntrl	C1	C2
pH 7,70 vs. pH 7,10	0,041	0,109	0,247
pH 7,70 vs. pH 6,70	0,001	0,001	0,092
pH 7,10 vs. pH 6,70	0,002	0,005	0,001
Contaminação	pH 7,70	pH 7,10	pH 6,70
Cntrl vs. C1	0,391	0,740	0,002
Cntrl vs. C2	0,001	0,001	0,143
C1 vs. C2	0,001	0,001	0,001

Já o efeito da contaminação nos diferentes pH testados, observa-se que não há diferença significativa na produção de prole de *Nitokra* sp. entre sedimento controle e C1, nos meios de exposição de pH controle (7,70) e com pH moderado (7,10). Contudo, foi encontrada diferença significativa entre níveis de contaminação no meio de exposição de pH 6,70 (pH baixo), com a produção de prole de *Nitokra* sp. maior no nível mais baixo de contaminação em relação ao controle (Figura 5). A comparação entre sedimento controle e a C2 apresentou diferença significativa no meio de exposição de pH 7,70 (controle) e pH 7,10 (moderado), sendo que a maior concentração testada apresentou menores valores de produção de prole em comparação com o sedimento sem nenhum nível de contaminação. Entretanto, o meio de exposição com meio de exposição de pH baixo (pH 6,70), a C2 não apresentou diminuição significativa em relação ao controle, ambos com produção de prole significativamente mais baixas do que os observados na C1. Para a produção de prole na comparação de C1 e a C2, em todos os níveis de pH, houve diferença significativa em que os valores diminuiram na concentração mais alta quando comparado com a menor concentração testada (Figura 6).

4.5 EFEITOS INTERATIVOS DA TEMPERATURA, pH, CONTAMINAÇÃO SOBRE A FECUNDIDADE DE *Nitokra* sp.

Os resultados da produção de prole em condições trifatoriais estão apresentados na Figura 7. A produção de prole por réplica em cada tratamento está descrita no Apêndice 2.

Os resultados do efeito da temperatura, pH e contaminação individualmente e das interações entre eles sob a produção de prole de *Nitokra* sp. (PERMANOVA) estão descritos na Tabela 11. Assim como para as condições bifatoriais, algumas combinações apresentaram diferença na dispersão, contudo as médias foram suficientemente diferentes.

O efeito da interação entre os meios de exposição de pH e contaminação não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), assim como o pH isoladamente. As demais interações apresentaram efeito sobre produção de prole de *Nitokra* sp. Como a inte-

ração de temperatura, pH e concentração apresentaram efeito estatisticamente significativo, desta forma, foi detalhada em testes pareados apenas a interação desses 3 fatores.

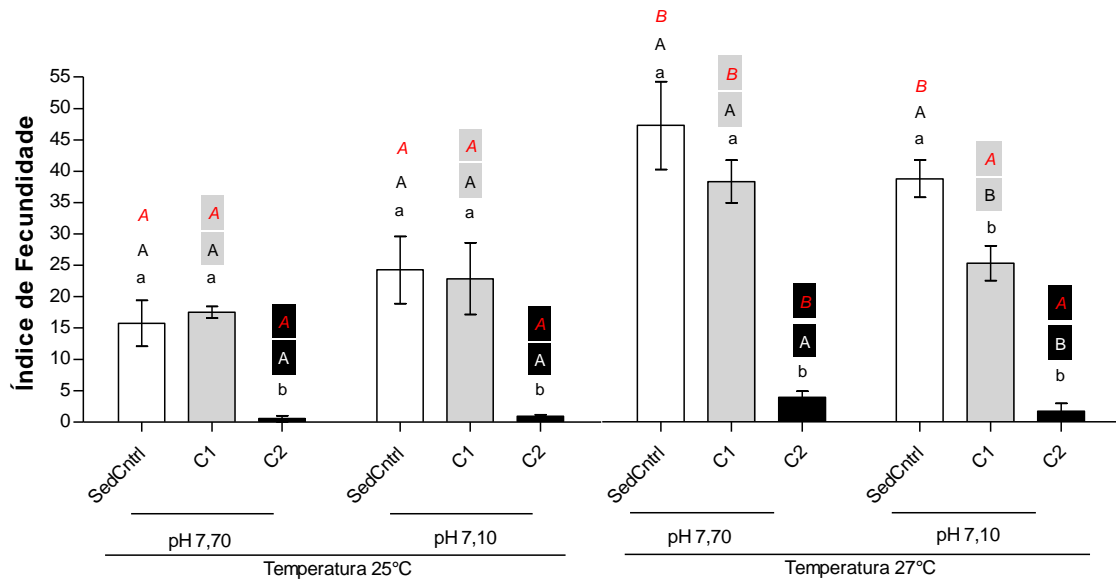


Figura 7. Médias e desvio-padrão (n=4) dos resultados da produção de prole para a exposição a metais no sedimento (Concentração 1 e Concentração 2) e controle sedimento em dois meios de exposição de pH (7.70 e 7.10) e temperatura (25 e 27°C). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significantes. Letras minúsculas comparam níveis de contaminação em cada nível de pH. Letras maiúsculas comparam níveis de pHs em cada nível de contaminação (letras maiúsculas em fundos branco, cinza claro e preto referem-se a comparações de pH em sedimento controle, C1 e C2, respectivamente). Letras maiúsculas vermelhas em itálico comparam níveis de temperatura em cada nível de contaminação e em cada nível de pH (letras maiúsculas em fundos branco, cinza claro e preto referem-se a comparações de pH em sedimento controle, C1 e C2, respectivamente, em cada nível de temperatura).

Tabela 11. Resultados da análise de PERMANOVA avaliando efeito da dos fatores temperatura, pH e contaminação e a interação deles sob a produção de prole da espécie *Nitokra sp.* Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. df) *degrees of freedom*; SS) *Sum of Squares*; MS) *Mean Squares*; p(perm) valor de p permutacional.

Fatores	df	SS	MS	Pseudo-F	p(perm)
Temperatura	1	1605,40	1605,40	128,58	0,001
pH	2	19,31	9,65	0,77	0,426
Concentrações	2	7464,00	3732,00	298,90	0,001
Temperatura vs. Concentração	2	809,75	404,87	32,43	0,001
Temperatura vs. pH	1	478,91	478,91	38,36	0,001
pH vs. Concentração	2	38,25	19,12	1,53	0,243
Temperatura vs. pH vs. Concentração	2	157,35	78,68	6,30	0,002
Residual	35	437,00	12,49		
Total	47	11247,00			

Os resultados da análise pareada (*pairwise test*) da PERMANOVA (valores de p de Monte Carlo) para as comparações entre os níveis de temperatura em cada combinação de pH e contaminação, comparação entre níveis de pH em cada combinação de temperatura e contaminação e, por fim, comparação de cada nível de contaminação em cada combinação de temperatura e pH estão apresentados na Tabela 12.

Os resultados da análise pareada da PERMANOVA indicaram aumento significativo sob a produção de prole de *Nitokra* sp. no meio de exposição com temperatura a 27°C em relação ao meio com temperatura a 25°C no pH controle (7,70), tanto no sedimento controle, com maior aumento, como nos sedimentos contaminados, sendo maior aumento na C1 e um aumento menor na C2. Contudo, no meio de exposição com pH moderado (7,10), o aumento significativo da produção de prole na mais alta temperatura foi observada apenas no sedimento não contaminado, ou seja, em sedimentos contaminados com metais, a temperatura não exerceu efeito incrementadores no meio exposição com pH moderado (Figura 7).

Tabela 12. Valores de p de Monte Carlo, resultados da análise de PERMANOVA pareada (*pairwise test*) avaliando efeito da interação entre fatores temperatura, pH e contaminação na produção de prole da espécie *Nitokra* sp. Valores destacados em negrito indicam $p < 0,05$. Controle) Cntrl; Contaminação 1) C1; Contaminação 2) C2.

Temperatura	pH 7,70			pH 7,10		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
T25°C vs. T27°C	0,002	0,001	0,001	0,006	0,599	0,297
pH	T25°C			T27°C		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
pH 7,70 vs. pH 7,10	0,053	0,119	0,217	0,068	0,003	0,039
Contaminação	T25°C			T27°C		
	pH 7,70	pH 7,10		pH 7,70	pH 7,10	
Cntrl vs. C1	0,172	0,759		0,072	0,001	
Cntrl vs. C2	0,001	0,001		0,001	0,001	
C1 vs. C2	0,001	0,001		0,001	0,001	

Na análise de efeito do pH, foram observados comportamentos distintos nas diferentes temperaturas. Em meio de exposição a 25°C, não houve efeito significativo do pH sobre a toxicidade de metais, em qualquer dos 2 níveis testados. No meio de exposição em temperatura a 27°C, o pH 7,10 (moderado) provoca uma diminuição da

produção de prole de *Nitokra* sp. em relação ao pH 7,70 (alto) em todos os níveis de contaminação de metais no sedimento, exceto sedimento controle.

Em relação ao efeito da contaminação nos diferentes níveis de pH e temperatura testados, C2 apresentou queda significativa na produção de prole em relação ao sedimento controle e C1 em qualquer nível de temperatura ou pH testados. O sedimento controle e C1 não apresentaram diferença significativa em meio de exposição a temperatura de 25°C e pH 7,70 (controle) ou 7,10 (moderado). Já no meio de exposição em temperatura a 27°C e pH controle, a produção de prole no nível de C1 não apresentou diferença significativa em relação ao sedimento controle. Em meio de exposição com pH moderado, houve efeito da temperatura e do pH na toxicidade dos metais já na menor concentração testada (contaminação 1) (Figura 7), o que não aconteceu a 25°C.

4.6 RESULTADOS DE CE₅₀

Os valores de CE₅₀ em meio de exposição com pH moderado e baixo apresentaram tendência de diminuição quando comparado com o pH controle. Considerando as diferentes temperaturas de exposição, também é observada a tendência de diminuição na CE₅₀ no meio de exposição com o pH mais baixo. Entretanto, a diferença apresentada entre as CE₅₀ em meio de exposição a 27°C é menor do que a diferença apresentada em temperatura a 25°C (Tabela 13).

Tabela 13. Valores de CE₅₀ sob as concentrações de TEL de cada metal nos diferentes meios de exposição.

Combinações (bifatorial)	EC₅₀ (aproximado) (% de TEL)
pH 7,70	52, 17
pH 7,10	46, 74
pH 6,70	48, 09
Contaminação (trifatorial)	EC₅₀ (aproximado) (% de TEL)
pH 7,70 vs. 25°C	52, 17
pH 7,10 vs. 25°C	46, 74
pH 7,70 vs. 27°C	51, 25
pH 7,10 vs. 27°C	50, 26

5 DISCUSSÃO

Os resultados dos testes em condições bifatoriais (pH e contaminação) mostraram efeito de redução na produção de prole de *Nitokra* sp. no pH mais baixo (pH 6.7) tanto para o sedimento controle, quanto para o contaminado. Esse resultado pode ser relacionado com o estado de acidose (redução do pH interno) e/ou hipercapnia (aumento de CO₂ interno de um indivíduo por difusão do mesmo gás na água) dos organismos que, para tolerarem o cenário de acidificação, aumentam o investimento fisiológico em mecanismos de “compensação”. Por isso, os organismos podem ter implicações de menor energia disponível para apoiar outros processos essenciais, como crescimento, calcificação e reprodução (PÖRTNER; LANGENBUCH; REIPSchLÄGER, 2004; WANG et al., 2018; WOOD; SPICER; WIDDICOMBE, 2008). Estudos anteriores mostram que a produção de prole de copépodos marinhos e bentônicos em cenários de acidificação é afetada em diferentes estágios. O pH mais ácido diminui a produção e retarda a eclosão de ovos desses organismos (KITA et al., 2013; ZHANG et al., 2011b). Além disso, estudos com outras espécies mostram que a acidificação afeta o desenvolvimento embrionário, causando anormalidades em diferentes estágios de clivagem e a perda de óvulos (FORSGREN et al., 2013; ŚWIEŻAK et al., 2018).

Os diferentes efeitos do pH ácido em copépodos são amplamente discutidos na literatura. Pascal et al. (2010), observaram a mortalidade em 50% dos indivíduos da espécie *Amphiascoides atopus* e *Schizopera knabeni* em um pH de 6,11 e 5,54, respectivamente. No estudo de Lee et al. (2016), os efeitos de mortalidade utilizando a espécie *Tigriopus* sp. foram identificados em pH menor que 5,53. Além disso, os autores também observaram os efeitos sub-letais (imobilização) em valores de pH abaixo de 6,04. Kita et al. (2013), avaliando a mortalidade em náuplios da espécie *Tigriopus japonicus* encontraram valores de tolerância até o pH 5,74.

No pH mais baixo testado no presente estudo (pH 6.7), também foi notado um aumento de náuplios e copepoditos na C1, em comparação ao resultado observado no sedimento controle. Para tal resultado são levantadas duas hipóteses, assumindo que os metais utilizados tenham ficado mais solúveis na água devido ao cenário de acidificação (ARDELAN et al., 2009; DE ORTE et al., 2014a; MILLERO et al., 2009):

(i) o aumento de produção de prole dos copépodos pode ter ocorrido devido a biodisponibilidade dos metais essenciais Cu e Zn (desempenham papel importante em processos fisiológicos e bioquímicos), que estavam em concentrações individualmente seguras (35% dos valores de TEL para cada metal) (BARKA; PAVILLON; AMIARD, 2001; BOSSUYT; JANSSEN, 2003; GUSSO-CHOUERI et al., 2012); (ii) a solubilidade dos metais não-essenciais Hg e Pb, em concentrações baixas, podem ter causado um efeito de Hormese, assim resultando em uma produção de prole relativamente maior na C1 de metais, do que no sedimento controle.

A hormese é um processo no qual a exposição a uma dose baixa de um agente químico ou fator ambiental, que são prejudiciais em doses mais altas, induz um efeito de estímulo no organismo (CALABRESE; BALDWIN, 2003; MATTSON, 2008). Um estudo mostrou que copépodos da espécie *Tigriopus californicus* expostos a dois níveis de radiação UV, produziram mais náuplios que os organismos controle (sem radiação) (HEINE et al., 2019).

A Hormese causada por metais também é encontrada na literatura. A estimulação das funções imunológicas (fagocitose) por concentrações de metais muito baixas (Hg e Zn) em bivalves de água doce foram observados por Sauvé et al. (2002). Em microalgas marinhas, os metais Pb e Al causaram efeitos de estimulação do crescimento em baixas concentrações (SAÇAN; OZTAY; BOLKENT, 2007). O fenômeno de hormese também foi observado com os metais Cu (II), Zn (II), Cd (II) e Cr (VI) em baixas concentrações sob a condição de ensaios de luminescência com bactéria dulcícolas e marinhas, em que houve um aumento da produção de luz acima dos controles (SHEN et al., 2009).

Nos resultados do tratamento com mais alta contaminação por metais (C2), para todos os meios de exposição de pH (7,70; 7,10 e 6,70) e temperatura (25°C e 27°C), notou-se um padrão de redução na produção de prole devido à presença dos metais Cu, Pb, Zn e Hg. Isso sugere que as concentrações consideradas individualmente seguras (75% dos valores de TEL para cada metal) (CCME, 2002), podem afetar diretamente a produção de prole dos organismos testados. Esses resultados indicam que as interações metálicas não devem ser desprezadas, pois mesmo que estejam presentes em quantidades mínimas, suas interações podem gerar um estresse ambiental (FRÍAS-ESPERICUETA et al., 2009).

O efeito de baixa produção de prole do copépodo *Nitokra* sp. observadas na presença dos quatro metais concordam com as observadas por Hagopian-Schlekat, Chandler e Shaw (2001), que avaliaram a mortalidade de *Amphiascus tenuiremis*, expostos a combinação de diferentes metais, sugerindo uma potencialização dos efeitos tóxicos, tanto para efeitos letais como para efeitos sub-letais. Frías-Espericueta et al. (2009) e Verslycke et al. (2003) observaram que combinação de diferentes metais aumentam a mortalidade das espécies *Litopenaeus vannamei* e *Neomysis integer*, respectivamente, mesmo combinadas em concentrações consideradas individualmente seguras.

Além da potencialização da toxicidade dos metais combinados, os copépodos bentônicos podem ingerir partículas de sedimento contaminadas com metal imobilizado (DECHO; FLEEGER, 1988) e, portanto, podendo produzir a toxicidade e bioacumulação nesses organismos causando efeitos de diminuição na produção de prole (ARAUJO et al., 2013; HOOK; FISHER, 2001). A presença de metais, por exemplo, em copépodos marinhos pode afetar a produção de ovos, devido à ligação com enzimas envolvidas na vitelogênese (HOOK; FISHER, 2002), e assim reduzir a produção da prole.

Os resultados observados no presente estudo demonstram que a temperatura de 27°C exerceu efeito de estímulo na produção da prole no meio de exposição com pH alto (7,70), tanto no sedimento controle, quanto nos contaminados, além do sedimento controle em meio de exposição com pH moderado (7,10). O aumento da temperatura pode ser um fator que influencia diretamente na produção da prole. A produção e eclosão de ovos de diferentes espécies de copépodos, até atingirem um ótimo desse parâmetro, pode ser estimulada e, assim, aumentar a produção (BONNET et al., 2007; LI et al., 2009; MATIAS-PERALTA et al., 2005; MILIONE; ZENG, 2008; SANTHANAM; JEYARAJ; JOTHIRAJ, 2013). Além disto, Matias-Peralta et al. (2005) observou que o aumento da temperatura acelera o tempo de maturação da bolsa de ovos (tempo entre o aparecimento da bolsa de ovos e sua eclosão) na espécie *Nitokra affinis*, o que pode resultar em maior produção de prole, especialmente se a espécie-teste do presente estudo realizar, como observado em *Nitokra spinipes*, a capacidade de produzir múltiplas “ninhadas” a partir de reservas armazenadas de esperma (BENGTSSON, 1978).

Em meio de exposição a temperatura de 27°C, quando comparado o sedimento controle e a C1 sob o pH controle (7,70) e o pH 7,10; nota-se uma diminuição da produção de prole de *Nitokra* sp. (estatisticamente significativa em 7,10 e perceptível no pH 7,70, mas não estatisticamente significativa). O efeito da C1 nestes níveis de pH não acontece a 25 °C. Com isso, é evidenciado uma interação da temperatura com metais (C1), assim como os metais e pH. A temperatura pode influenciar a liberação de determinados metais do sedimento para água (LI et al., 2013), potencializando a toxicidade (BAI; WANG, 2020; DINH et al., 2020; LI et al., 2013). Estudos mostram que metais sob condições de temperaturas elevadas reduzem a produção de prole de copépodos (BONNET et al., 2007; MATIAS-PERALTA et al., 2005; MILIONE; ZENG, 2008; SANTHANAM; JEYARAJ; JOTHIRAJ, 2013). Adicionalmente, e como discutido anteriormente, a acidificação desencadeia diferentes efeitos em copépodos marinhos e bentônicos, sendo a redução de prole um dos efeitos frequentemente relatados pela literatura.

Ademais, os efeitos da acidificação sobre os copépodos podem ser potencializados com a interação de metais. Estudos com sedimento mostram que ambientes com o pH ácido (pH baixo e moderado) causa aumento de formas iônicas livres de metais inorgânicos (complexos fortes de hidróxido e carbonato) e orgânicos, que além de alterar a mobilidade, aumentando a concentração na água, transforma-se em espécies mais tóxicas (DE ORTE et al., 2014b; MILLERO et al., 2009; PASSARELLI et al., 2017). Desta forma, acredita-se que a acidificação e a temperatura potencializaram a toxicidade de metais em concentrações que não causam efeito, somados ao esforço fisiológico dos organismos devido às mudanças dos próprios fatores físico-químicos da água, reduziram o número de prole da espécie teste.

Os resultados de CE₅₀ dão suporte aos resultados da PERMANOVA reforçando o efeito dos diferentes metais e dos fatores pH e temperatura sob a toxicidade desses elementos metálicos. Os valores de CE₅₀ evidencia ainda mais o efeito do pH (moderado e baixo) na toxicidade dos metais. No entanto, o tratamento de meio de exposição com pH baixo (6,70) apresentou CE₅₀ maior que a CE₅₀ em meio de exposição de pH moderado. Dessa forma, é importante ressaltar que o efeito da toxicidade não foi reduzido, mas sim subestimado frente a outro estressor. O mesmo acontece com meio de exposição a temperatura de 27°C, em que a CE₅₀ apresentou valores

maiores que as CE_{50} em meio de exposição a 25°C. Além disso, o valor da CE_{50} (52,17%) no tratamento controle, ou seja, sem injeção de CO_2 e aumento de temperatura, indica que concentrações abaixo de TEL já podem causar efeito sob a biota. As CE_{50} obtidas alertam acerca dos níveis considerados seguros por países que adotam VGQS com base no princípio de TEL/PEL.

A C2 testada representou 75,0% de valores de TEL para cada metal (14,03 $mg\ kg^{-1}$; 22,65 $mg\ kg^{-1}$; 0,10 $mg\ kg^{-1}$, e 93,00 $mg\ kg^{-1}$, para os metais cobre, chumbo, mercúrio e zinco, respectivamente). Esses valores estão abaixo do que é preconizado como seguro nos VGQS Canadense, da cidade de Quebec, do Estado da Flórida, nos E.U.A, e no Brasil (Tabela 14). Todos utilizam como abordagem o princípio de TEL/PEL (CCME, 1995; BRASIL, 2012; HUBNER, ASTIN, HERBERT, 2009; QUÉBEC, 2007; MACDONALD et al., 1996). Os VGQS apresentam a limitação em não considerar possíveis interações aditivas, negativas ou antagônicas de misturas químicas (KWOK et al., 2014b). Assim como os resultados do presente estudo, outros trabalhos mostraram a interação de diferentes metais, mesmo que em concentrações consideradas seguras, potencializam o efeito tóxico dos metais (FRÍAS-ESPERICUETA et al., 2009; HAGOPIAN-SCHLEKAT; CHANDLER; SHAW, 2001; VERSLYCKE et al., 2003).

Tabela 14. Concentrações de cobre, chumbo, mercúrio e zinco adotados por países que utilizam protocolos baseados em TEL/PEL.

Protocolos baseados em TEL/PEL	Cobre ($mg\ kg^{-1}$)	Chumbo ($mg\ kg^{-1}$)	Mercúrio ($mg\ kg^{-1}$)	Zinco ($mg\ kg^{-1}$)
Valores correspondentes a TEL				
Canadá (CCME, 1995)	18,70	30,20	0,13	124,00
Québec (QUÉBEC, 2007)	19,00	30,00	0,13	120,00
Flórida (MACDONALD et al., 1996)	18,70	30,20	0,13	124,00
Brasil (BRASIL, 2012)	34,00	46,70	0,34	150,00

Outra limitação é que agências reguladoras ambientais, inclusive o CONAMA, adotam VGQS que podem não abordar adequadamente as especificidades de cada local (CHOUERI et al., 2009). Os organismos aquáticos em ecossistemas árticos, temperados e tropicais respondem de forma diferente quando expostas aos metais (CHAPMAN et al., 2006; CHOUERI et al., 2009; WANG et al., 2014; WANG; KWOK;

LEUNG, 2019). Espécies de água doce em regiões temperadas são geralmente mais sensíveis os metais As, Cr, Pb, Hg do que espécies de regiões tropicais, mas ambas não apresentam sensibilidade ao Cu (WANG et al., 2014) . Espécies marinhas de regiões temperadas são mais sensíveis aos metais cromo, chumbo, níquel, enquanto as espécies tropicais são mais sensíveis ao cobre, zinco, mercúrio (WANG; KWOK; LEUNG, 2019). Além disso, determinadas regiões afetam a persistência, bioacumulação, especiação e toxicidade de metais, tanto na água como no sedimento (KWOK et al., 2014). No Brasil, também ocorrem diferenças nas características dos ambientes marinhos e que podem implicar em diferenças no efeito das concentrações limiares de metais da norma vigente (BURUAEM et al., 2012).

Com isso, a atualização dos VGQS se mostra de grande importância. A resolução CONAMA nº 454/12 preconiza a necessidade de sua revisão em até cinco anos, contados da data de sua publicação, contudo, isso ainda não ocorreu. A presença de diversos metais é detectada em todo o litoral do Estado de São Paulo, principalmente em regiões de alta atividade urbana e industrial (CETESB, 2018). Por isso, se desperta a preocupação nas diversas Unidades de Conservações estabelecidas nessas regiões, que também já apresentam concentrações de metais, inclusive os mais tóxicos (mercúrio e chumbo), mesmo que em níveis abaixo do nível 1 da resolução brasileira (CAMPOS et al., 2016; CRUZ et al., 2014; HOFF; FIGUEIRA; ABESSA, 2015; MOREIRA et al., 2019).

Isto posto, a importância da atualização de VGQS mostra-se ainda mais necessária se considerar os cenários de acidificação e aquecimento previsto para os próximos 100 anos. As interações de metais podem ser potencializadas em concentrações ainda mais baixas em ambientes marinhos, devido ao efeito do pH mais ácido e o aumento da temperatura. Os valores de CE_{50} corroboram para essa preocupação, sendo que nos meios de exposição acidificados os valores reduziram, inclusive sob meio de exposição com temperatura a 27°C, sendo nessa temperatura uma redução mais atenuada. Os atuais valores propostos pelo VGQS podem, portanto, se tornar pouco eficazes na proteção à biota devido aos novos cenários, como evidenciado no meio de exposição a temperatura de 27°C, pH moderado e C1.

Como instrumento para gestão frente as mudanças climáticas, O Plano Naci-

onal de Adaptação à Mudança do Clima (PNAM) (BRASIL, 2016), que propõe diretrizes, recomendações e estratégias para a gestão e diminuição do risco climático do país, reconhece a necessidade de proteção das regiões costeiras e marinhas. São propostas pelo plano estratégias em função da acidificação, contudo é identificada a ausência de estratégias para contaminação, tanto de água quando do sedimento.

CONCLUSÃO

Conclui-se com os resultados expostos que a acidificação e a presença de diferentes concentrações de metais (C2), mesmo que consideradas individualmente seguras, afetaram a produção de prole da espécie *Nitokra* sp. nos sedimentos testados. A toxicidade dos metais foi potencializada nos meios de exposição com pH baixo. Já em condições de aquecimento a reprodução da espécie foi estimulada. Além disso, a combinação dos fatores testados (pH a 7,10; temperatura a 27°C e a menor concentração testada) exerceu efeito deletério sob a produção de prole do organismo teste.

As concentrações permitidas de diferentes metais no sedimento se mostram tóxicas quando combinadas, o que sugeri a atualização VGQS. A atualização desses valores-guias é ainda mais necessária se considerar a acidificação e aquecimento causado por mudanças climáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D.; SOUSA, E.; TOMMASI, L. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. **Revista de Geologia**, v. 19, n. 2, p. 253–261, 2006.
- ALBUQUERQUE, H. C. DE; ABESSA, D. Poluição Química em Unidades de Conservação Costeiras e Marinhas do Brasil: Revisão Sistemática e Notas sobre a Produção Científica. **Revista Costas**, n. 1, p. 1–22, 2006.
- ANDERSON, M. J.. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). **Wiley Statsref: Statistics Reference Online**, p. 1-15, 15 nov. 2017.
- ARAUJO, G. S. et al. Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixová-Japuí State Park, SP, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 75, n. 1–2, p. 62–68, out. 2013.
- ARDELAN, M. V. et al. Effects of experimental CO₂ leakage on solubility and transport of seven trace metals in seawater and sediment. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 24, p. 6255–6266, 2009.
- AZEVEDO, J. DE S.; BRAGA, E. S. Caracterização hidroquímica para qualificação ambiental dos estuários de Santos-São Vicente e Cananéia. 2011.
- BAI, Z.; WANG, M. Warmer temperature increases mercury toxicity in a marine copepod. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110861, 2020.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: BookMan, 2011.
- BALMASEDA, M. A.; TRENBERTH, K. E.; KÄLLÉN, E. Distinctive climate signals in reanalysis of global ocean heat content. **Geophysical Research Letters**, v. 40, n. 9, p. 1754–1759, 2013.
- BARKA, S.; PAVILLON, J.-F.; AMIARD, J.-C. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod *Tigriopus brevicornis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 128, n. 4, p. 479–493, abr. 2001.
- BENGTSSON, B.-E. Use of a harpacticoid copepod in toxicity tests. **Marine pollution bulletin**, v. 9, n. 9, p. 238–241, 1978.
- BINDOFF, N. L. et al. Changing Ocean, Marine Ecosystems, and Dependent Communities. In: **IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate**. Cambridge, United Kingdom e New York, USA: [s.n.]. p. 447–588.
- BLUNDEN, J.; ARNDT, D. S. State of the Climate in 2018. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 100, n. 9, p. Si-S306, 2019.

BONNET, D. et al. Comparative seasonal dynamics of *Centropages typicus* at seven coastal monitoring stations in the North Sea, English Channel and Bay of Biscay. **Progress in oceanography**, v. 72, n. 2–3, p. 233–248, 2007.

BOSSUYT, B. T.; JANSSEN, C. R. Acclimation of *Daphnia magna* to environmentally realistic copper concentrations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 136, n. 3, p. 253–264, 2003.

BRANCO, P. C. et al. The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*. **Marine environmental research**, v. 92, p. 95–101, 2013.

BRASIL. Resolução nº454 de 01 de novembro de 2012. **Concelho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA)**. 2012.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Plano Nacional de Adaptação à Mudança do Clima. v. 2, 2016.

BURUAEM, L. M. et al. Contamination of port zone sediments by metals from Large Marine Ecosystems of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 3, p. 479–488, 1 mar. 2012.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Hormesis: the dose-response revolution. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 43, n. 1, p. 175–197, 2003.

CAMPOS, B. G. et al. Using a tiered approach based on ecotoxicological techniques to assess the ecological risks of contamination in a subtropical estuarine protected area. **Science of The Total Environment**, v. 544, p. 564–573, 15 fev. 2016.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas costeiras no estado de São Paulo 2018**. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2019.

CCME. **Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life**. In: **Canadian environmental quality**. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment, 1995.

CHAPMAN, P. M. Emerging substances-emerging problems? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1445, 2006.

CHAPMAN, P. M. et al. Global geographic differences in marine metals toxicity. **Marine pollution bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1081–1084, 2006.

CHEN, Z. et al. Comparative study on the effects of two diatoms as diets on planktonic calanoid and benthic harpacticoid copepods. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 329, n. 3, p. 140–148, mar. 2018.

CHENG, L. et al. Improved estimates of ocean heat content from 1960 to 2015. **Science Advances**, v. 3, n. 3, p. e1601545, 2017.

CHOUERI, R. et al. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: comparison against national and international sediment quality benchmarks. **Journal of hazardous materials**, v. 170, n. 1, p. 320–331, 2009.

CRUZ, A. C. F. et al. Cumulative influences of a small city and former mining activities on the sediment quality of a subtropical estuarine protected area. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 11, p. 7035–7046, nov. 2014.

DAHL, U. et al. Food quality effects on copepod growth and development: Implications for bioassays in ecotoxicological testing. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 351–357, fev. 2009.

DAHMS, H.-U.; QIAN, P.-Y. Life histories of the Harpacticoida (Copepoda, Crustacea): a comparison with meiofauna and macrofauna. **Journal of Natural History**, v. 38, n. 14, p. 1725–1734, 1 jul. 2004.

DE ORTE, M. R. et al. Effects on the mobility of metals from acidification caused by possible CO₂ leakage from sub-seabed geological formations. **Science of the total environment**, v. 470, p. 356–363, 2014a.

DE ORTE, M. R. et al. Metal mobility and toxicity to microalgae associated with acidification of sediments: CO₂ and acid comparison. **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 136–144, maio 2014b.

DECHO, A. W.; FLEEGER, J. Ontogenetic feeding shifts in the meiobenthic harpacticoid copepod *Nitocra lacustris*. **Marine Biology**, v. 97, n. 2, p. 191–197, 1988.

DELORENZO, M. E. Impacts of climate change on the ecotoxicology of chemical contaminants in estuarine organisms. **Current Zoology**, v. 61, n. 4, p. 641–652, 2015.

DIAS, J. Análise granulométrica. **A ANÁLISE SEDIMENTAR E O CONHECIMENTOS DOS SISTEMAS MARINHOS**, v. 29, 2004.

DICKSON, A.; MILLERO, F. J. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. **Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers**, v. 34, n. 10, p. 1733–1743, 1922.

DINH, K. V. et al. Interactive effects of extreme temperature and a widespread coastal metal contaminant reduce the fitness of a common tropical copepod across generations. **Marine Pollution Bulletin**, v. 159, p. 111509, out. 2020.

DONEY, S. C. et al. Ocean acidification: the other CO₂ problem. **Annual review of marine science**, v. 1, p. 169–192, 2009.

FEELY, R.; DONEY, S.; COOLEY, S. Ocean Acidification: Present Conditions and Future Changes in a High-CO₂ World. **Oceanography**, v. 22, n. 4, p. 36–47, 1 dez. 2009.

FENILI, L. H. **Qualidade do sedimento do canal de navegação do Porto de Santos (Santos, SP) após dragagem de aprofundamento: ensaios ecotoxicológicos com *Tiburonella viscana* e *Nitokra* sp.** Dissertação—São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

FORSGREN, E. et al. Elevated CO₂ affects embryonic development and larval phototaxis in a temperate marine fish. **Ecology and evolution**, v. 3, n. 11, p. 3637–3646, 2013.

FÖRSTNER, U. Sources and sediment associations of heavy metals in polluted coastal regions. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 11, p. 849–866, 1979.

FÖRSTNER, U.; PATCHINEELAM, S. R. Chemical association of heavy metals in marine sediment with special reference to pollution in the German North Sea. **ICES Journal of Marine Science**, v. 181, p. 49–58, 1 jan. 1981.

FRÍAS-ESPERICUETA, M. et al. Toxicity of metal mixtures to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Marine environmental research**, v. 68, n. 5, p. 223–226, 2009.

FRITIOFF, Å.; KAUTSKY, L.; GREGER, M. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 265–274, 2005.

GIBSON, R. et al. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. **Oceanogr Mar Biol Annu Rev**, v. 49, p. 1–42, 2011.

GUSSO-CHOUERI, P. K. et al. Effects of dietary copper on life-history traits of a tropical freshwater cladoceran. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 62, n. 4, p. 589–598, 2012.

HAGOPIAN-SCHLEKAT, T.; CHANDLER, G.; SHAW, T. J. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. **Marine Environmental Research**, v. 51, n. 3, p. 247–264, 2001.

HARLEY, C. D. et al. The impacts of climate change in coastal marine systems. **Ecology letters**, v. 9, n. 2, p. 228–241, 2006.

HEINE, K. B. et al. Ultraviolet irradiation increases size of the first clutch but decreases longevity in a marine copepod. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 17, p. 9759–9767, 2019.

HICKS, G.; COULL, B. C. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. **Oceanography and Marine Biology**, v. 21, p. 67–175, 1983.

HIROTA, J.; SZYPER, J. P. Separation of total particulate carbon into inorganic and organic components 1. **Limnology and Oceanography**, v. 20, n. 5, p. 896–900, 1975.

HOFF, N. T.; FIGUEIRA, R. C. L.; ABESSA, D. M. S. Levels of metals, arsenic and phosphorus in sediments from two sectors of a Brazilian Marine Protected Area (Tupinambás Ecological Station). **Marine pollution and assessment of marine status in Latin America**, v. 91, n. 2, p. 403–409, 28 fev. 2015.

HOOK, S. E.; FISHER, N. S. Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. **Marine Biology**, v. 138, n. 6, p. 1131–1140, 2001.

HOOK, S. E.; FISHER, N. S. Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. **Marine Environmental Research**, v. 53, n. 2, p. 161–174, 2002.

HÜBNER, R.; ASTIN, K. B.; HERBERT, R. J. Comparison of sediment quality guidelines (SQGs) for the assessment of metal contamination in marine and estuarine environments. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 11, n. 4, p. 713–722, 2009.

IPCC. **Climate Change 2007: The Physical Science Basis**. Cambridge, United Kingdom e New York, USA: Cambridge University Press, 2007.

KITA, J. et al. Effects of elevated pCO₂ on reproductive properties of the benthic copepod *Tigriopus japonicus* and gastropod *Babylonia japonica*. **Marine pollution bulletin**, v. 73, n. 2, p. 402–408, 2013.

KLEISNER, K. M. et al. Marine species distribution shifts on the US Northeast Continental Shelf under continued ocean warming. **Progress in Oceanography**, v. 153, p. 24–36, 2017.

KOCH, J. et al. Temperature and food quantity effects on the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*: Combining in vivo bioassays with population modeling. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174384, 23 mar. 2017.

KWOK, K. W. et al. Sediment quality guidelines: challenges and opportunities for improving sediment management. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 17–27, 2014a.

KWOK, K. W. et al. Sediment quality guidelines: challenges and opportunities for improving sediment management. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 1, p. 17–27, 2014b.

KWOK, K. W. et al. Copepods as references species in estuarine and marine waters. In: **Aquatic Ecotoxicology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 281–308.

LAVORANTE, B. R. et al. A new protocol for ecotoxicological assessment of seawater using nauplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 95, p. 52–59, 2013.

LEE, C. et al. Lethal and sub-lethal effects of elevated CO₂ concentrations on marine benthic invertebrates and fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 15, p. 14945–14956, 2016.

LEVITUS, S. Warming of the world ocean, 1955–2003. **Geophysical Research Letters**, v. 32, n. 2, p. L02604, 2005.

LI, C. et al. Influences of temperature on development and survival, reproduction and growth of a calanoid copepod (*Pseudodiaptomus dubia*). **TheScientificWorldJournal**, v. 9, p. 866–879, 2009.

LI, H. et al. Effect of pH, temperature, dissolved oxygen, and flow rate of overlying water on heavy metals release from storm sewer sediments. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

LONG, E.; MACDONALD, D. Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 4, n. 5, p. 1019–1039, 1998.

LOTUFO, G.; ABESSA, D. Testes de toxicidade com sediment total e água intersticial estuarinos utilizando copépodes bentônicos. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUZA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (Eds.). **Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria, 2002. p. 163–178.

LU, Y. et al. Major threats of pollution and climate change to global coastal ecosystems and enhanced management for sustainability. **Environmental pollution**, v. 239, p. 670–680, 2018.

LUCZAK, C.; JANQUIN, M.-A.; KUPKA, A. Simple standard procedure for the routine determination of organic matter in marine sediment. **Hydrobiologia**, v. 345, n. 1, p. 87–94, 1997.

MACDONALD, D. D. et al. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 253–278, 1996.

MADEIRA, D. et al. Ocean warming alters cellular metabolism and induces mortality in fish early life stages: a proteomic approach. **Environmental Research**, v. 148, p. 164–176, 2016.

MATIAS-PERALTA, H. et al. Effects of some environmental parameters on the reproduction and development of a tropical marine harpacticoid copepod *Nitocra affinis* f. *californica* Lang. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, n. 8–12, p. 722–728, 2005.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2008.

MEHTA, K. Impact of Temperature on Contaminants Toxicity in Fish Fauna: A Review. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 10, p. 1–6, 1 maio 2017.

MILIONE, M.; ZENG, C. The effects of temperature and salinity on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*. **Aquaculture**, v. 275, n. 1–4, p. 116–123, 2008.

MILLER, G. M. et al. Increased CO₂ stimulates reproduction in a coral reef fish. **Global Change Biology**, v. 19, n. 10, p. 3037–3045, 2013.

MILLERO, F. et al. Effect of Ocean Acidification on the Speciation of Metals in Seawater. **Oceanography**, v. 22, n. 4, p. 72–85, 1 dez. 2009.

MOREIRA, L. B. et al. Sediment quality assessment as potential tool for the management of tropical estuarine protected areas in SW Atlantic, Brazil. **Ecological Indicators**, v. 101, p. 238–248, 1 jun. 2019.

MIYAO, S. Y.; NISHIHARA, L.; SARTI, C. C.. Características físicas e químicas do sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 34, p. 23-26, 1986.

ORR, J. C. et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 681–686, 2005.

PASCAL, P.-Y. et al. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meiobenthic copepods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 12, p. 2201–2208, 2010.

PASSARELLI, M. C. et al. Comparative evaluation of sea-urchin larval stage sensitivity to ocean acidification. **Chemosphere**, v. 184, p. 224–234, 2017.

PIERROT, L.; WALLACE, D. **Programa MS Excel desenvolvido para Cálculos do sistema de CO₂**. Oak Ridge: Centro de Análise de Informação sobre Dióxido de Carbono, Laboratório Nacional de Oak Ridge, Departamento de Energia dos EUA, 2006.

PÖRTNER, H. O.; LANGENBUCH, M.; REIPSCHLÄGER, A. Biological Impact of Elevated Ocean CO₂ Concentrations: Lessons from Animal Physiology and Earth History. **Journal of Oceanography**, v. 60, n. 4, p. 705–718, ago. 2004.

QUÉBEC. **Criteria for the Assessment of Sediment Quality in Quebec and Application Frameworks: Prevention, Dredging and Remediation**. Québec: Environment Canada and Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2007

RIBEIRO, A. C.; SOUZA-SANTOS, L. P. Mass culture and offspring production of marine harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*. **Aquaculture**, v. 321, n. 3–4, p. 280–288, 2011.

SAÇAN, M. T.; OZTAY, F.; BOLKENT, S. Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to Lead and Aluminum: Toxicity and Effects on Ultrastructure. **Biological Trace Element Research**, v. 120, n. 1–3, p. 264–272, 2 out. 2007.

SANTHANAM, P.; JEYARAJ, N.; JOTHIRAJ, K. Effect of temperature and algal food on egg production and hatching of copepod, *Paracalanus parvus*. **Journal of environmental biology**, v. 34, n. 2, p. 243–246, 2013.

SARAIVA, L. B. **Taxa de sedimentação de lodo Dinâmica de sedimentação Lagoa facultativa primária**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SAUVÉ, S. et al. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). **Aquatic Toxicology**, v. 58, n. 3–4, p. 189–200, ago. 2002.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. *Manguezais brasileiros*. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, v. 2, 1991.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: Ecossistema entre a Terra e o Mar. São Paulo: **Caribbean Ecological Research**, p. 64, 1995.

SHAMA, L. N. Bet hedging in a warming ocean: predictability of maternal environment shapes offspring size variation in marine sticklebacks. **Global Change Biology**, v. 21, n. 12, p. 4387–4400, 2015.

SHEN, K. et al. Hormesis response of marine and freshwater luminescent bacteria to metal exposure. **Biological Research**, v. 42, n. 2, 2009.

SILVA, M. Estuários - Critérios Para Uma Classificação Ambiental. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 5, n. 1, p. 23–35, 2000.

SIMPSON, S.; BATLEY, G. **Sediment quality assessment: a practical guide**. [s.l.] Csiro Publishing, 2016.

STRONG, A. L. et al. Ocean Acidification 2.0: Managing our Changing Coastal Ocean Chemistry. **BioScience**, v. 64, n. 7, p. 581–592, 1 jul. 2014.

ŚWIEŻAK, J. et al. Impact of environmental hypercapnia on fertilization success rate and the early embryonic development of the clam *Limecola balthica* (Bivalvia, Tellinidae) from the southern Baltic Sea – A potential CO₂ leakage case study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 136, p. 201–211, nov. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA 823-B-01-002: Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual**. Washington: USEPA, 2001.

VERSLYCKE, T. et al. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 307–315, ago. 2003.

WANG, M. et al. Effects of ocean acidification on copepods. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 17–24, mar. 2018.

WANG, Z. et al. The difference between temperate and tropical saltwater species' acute sensitivity to chemicals is relatively small. **Chemosphere**, v. 105, p. 31–43, 2014.

WANG, Z. et al. Metal release from contaminated coastal sediments under changing pH conditions: Implications for metal mobilization in acidified oceans. **Marine pollution bulletin**, v. 101, n. 2, p. 707–715, 2015.

WANG, Z.; KWOK, K. W.; LEUNG, K. M. Comparison of temperate and tropical freshwater species' acute sensitivities to chemicals: An update. **Integrated environmental assessment and management**, v. 15, n. 3, p. 352–363, 2019.

WENTWORTH, C. K. A scale of grade and class terms for clastic sediments. **The journal of geology**, v. 30, n. 5, p. 377–392, 1922.

WIDDICOMBE, S.; SPICER, J. I. Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: what can animal physiology tell us? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 366, n. 1–2, p. 187–197, 2008.

WOOD, H. L.; SPICER, J. I.; WIDDICOMBE, S. Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1644, p. 1767–1773, 7 ago. 2008.

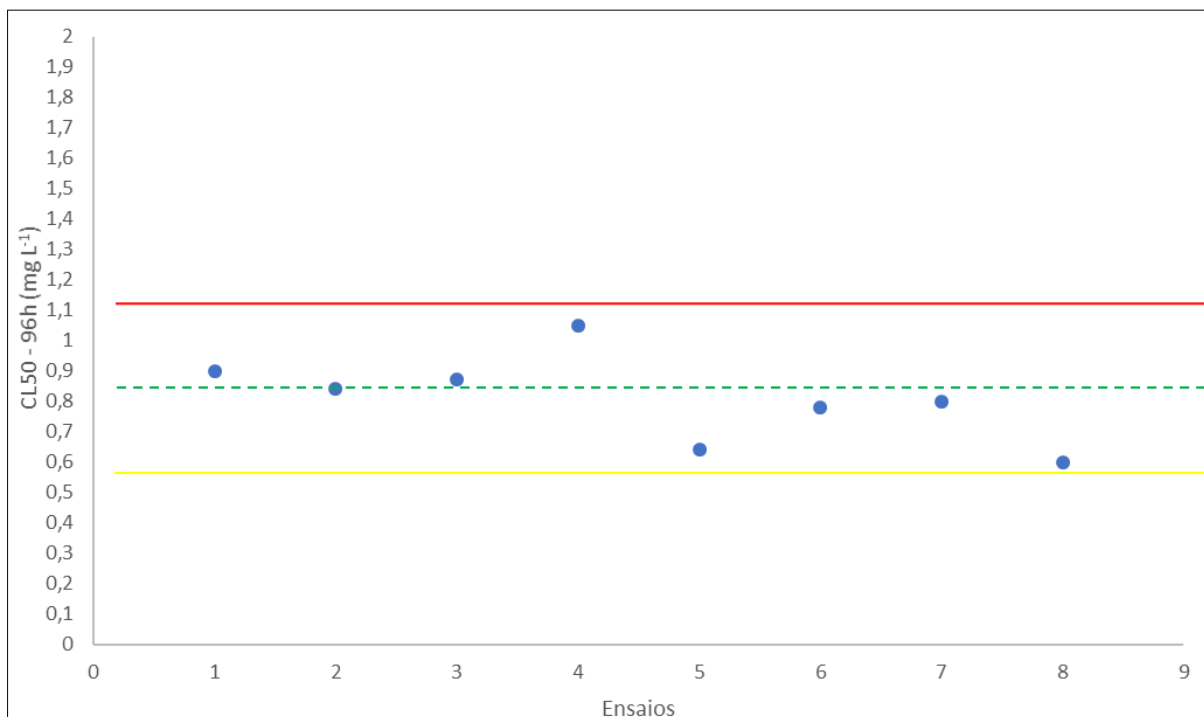
WYCKMANS, M. et al. Effects of food diversity on diatom selection by harpacticoid copepods. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 345, n. 2, p. 119–128, jul. 2007.

ZHANG, D. et al. Impacts of CO₂-driven seawater acidification on survival, egg production rate and hatching success of four marine copepods. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 30, n. 6, p. 86–94, 2011a.

ZHANG, D. et al. Impacts of CO₂-driven seawater acidification on survival, egg production rate and hatching success of four marine copepods. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 30, n. 6, p. 86–94, nov. 2011b.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Carta controle do laboratório para os cultivos de *Nitokra* sp. O ensaio 7 refere-se ao teste de sensibilidade realizado durante o presente estudo.



Legenda: Limite superior (linha vermelha): 1,09; Limite inferior (linha amarela): 0,59; Média (linha tracejada verde): 0,84; Desvio Padrão: 0,13; Coeficiente de Variação (%): 15. Os círculos azuis correspondem aos valores de CL₅₀ dos ensaios de sensibilidade realizados.

APÊNDICE 2. Índices de produção de prole da espécie *Nitokra* sp. por réplica em condições bifatoriais e trifatoriais.

Réplica	T25°C								
	pH 7,70			pH 7,10			pH 6,70		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
R1	17,29	18,71	0,43	29,57	20,71	0,86	1,71	13,14	0,14
R2	10,71	17,71	0,00	28,14	29,86	0,71	0,00	14,57	0,14
R3	15,71	17,14	1,14	20,00	24,43	1,29	1,14	10,00	0,00
R4	19,29	16,57	0,71	19,29	16,43	0,86	5,29	9,57	0,00
Réplica	T27°C								
	pH 7,70			pH 7,10			pH 6,70		
	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2	Cntrl	C1	C2
R1	37,00	40,71	5,00	40,71	24,00	1,86	NT	NT	NT
R2	51,29	39,00	2,86	37,14	23,00	0,86	NT	NT	NT
R3	44,43	33,14	4,14	34,00	22,86	0,57	NT	NT	NT
R4	51,29	36,29	3,14	39,14	28,57	3,29	NT	NT	NT