

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
CAMPUS BAIXADA SANTISTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPRODUTOS E BIOPROCESSOS  
(PPGGB)

JULIA DE ALMEIDA MONTEIRO DA SILVA

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO EM CENÁRIOS FUTUROS  
DE ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA SOBRE A POPULAÇÃO DE *Nitokra* sp.  
(Copepoda: Harpacticoida)**

SANTOS  
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
CAMPUS BAIXADA SANTISTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPRODUTOS E BIOPROCESSOS  
(PPGBB)

JULIA DE ALMEIDA MONTEIRO DA SILVA

**EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO EM CENÁRIOS FUTUROS  
DE ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA SOBRE A POPULAÇÃO DE *Nitokra* sp.  
(Copepoda: Harpacticoida)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioprodutos e Bioprocessos da  
Universidade Federal de São Paulo  
para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências, área de concentração:  
Bioensaios e Ecotoxicologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Rodrigo  
Brasil Choueri

SANTOS  
2022

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado com os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

de Almeida Monteiro da Silva, Julia.  
D278ee EFEITOS DA  
CONTAMINAÇÃO POR CHUMBO EM CENÁRIOS FUTUROS DE  
ACIDIFICAÇÃO OCEÂNICA SOBRE A POPULAÇÃO  
DE Nitokra sp. . / Julia de  
Almeida Monteiro da Silva; Orientador Rodrigo  
Brasil Choueri; Coorientador . -- Santos,  
2022.

52 p. ; 30cm

Dissertação (Mestrado -  
Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos) -- Instituto  
Saúde e Sociedade, Instituto do Mar, Universidade Federal  
de São Paulo, 2022.

1. mudanças climáticas.  
2. acidificação oceânica. 3. metais. 4. poluição. 5.  
copépodes. I. Brasil Choueri, Rodrigo , Orient. II.  
Título.

CDD 660.6

Julia de Almeida Monteiro da Silva

**Efeitos da contaminação por chumbo em cenários futuros de acidificação oceânica sobre a população de *Nitokra* sp. (Copepoda: Harpacticoida)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências” e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Bioprodutos e Bioprocessos

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Neves Granito  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Rodrigo B. Choueri  
Orientador  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Augusto Cesar  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Denis Abessa  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Lucas Buruaem  
Universidade Federal de São Paulo

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Fernando Perina  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Santos, outubro de 2022

Dedico essa dissertação a minha avó Eulália por ter pavimentado  
o caminho que eu percorri até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Rodrigo Brasil Choueri, por aceitar me acompanhar nesse processo, confiando na minha trajetória sem nunca ter me visto antes da seleção. Ao longo desses dois anos pude acompanhar uma parte da sua trajetória e aprender com ela.

À Aline Vecchio, pela ajuda dentro e fora do laboratório, pela paciência na construção do sistema experimental e por me guiar em todas as etapas, desde o início até o final desse projeto.

Gustavo Mosso, pela ajuda nas manutenções dos cultivos, disciplinas e montagem do sistema experimental.

Aos colegas do laboratório F pela ajuda sempre que possível.

Aos meus amigos, por terem me dado a força necessária para passar por essa trajetória em meio a diversas mudanças. Em especial a família Alves: Matheus, Yeda e Carlos, por me acolherem como uma irmã e filha em momentos que nem eu sabia que precisava de ajuda.

Aos meus familiares, por entenderem, mais uma vez, a minha ausência, mas também por fazerem dos momentos em que estive presente o ânimo necessário para que eu continuasse a estudar. Por todo carinho e apoio mesmo sem entender metade de tudo que apresento neste trabalho.

Por último, mas não menos importante, minha avó Eulália, que me fez ser quem sou hoje sem nunca soltar a minha mão. Esse e qualquer outro objetivo alcançado na minha trajetória serão sempre dedicados a você. Queria que tivesse dado tempo de ver essa etapa concluída nesse plano, mas com certeza está do meu lado na conclusão como estive ao longo do processo.

“The distance is nothing when one has a motive.”  
— **Jane Austen, Pride and Prejudice**

## RESUMO

A absorção pelos oceanos de CO<sub>2</sub> emitido à atmosfera pelas atividades humanas altera o sistema carbonato da água do mar, levando, entre outras consequências, ao fenômeno de acidificação oceânica. Um dos grupos que podem ser afetados pela acidificação são os copépodes, que também são organismos reconhecidamente sensíveis à contaminação por metais-traço. Considerando que a acidificação oceânica pode interagir com a toxicidade de metais, é importante conhecer os efeitos interativos entre estes estressores sobre este grupo de organismos que contribuem significativamente aos serviços ecossistêmicos marinhos/estuarinos. Porém, estudos ecotoxicológicos tradicionais com copépodes avaliam normalmente respostas como mortalidade, crescimento somático e reprodução, não considerando respostas diretas em nível populacional. O objetivo deste trabalho, portanto, é avaliar respostas populacionais em *Nitokra* sp., um copépode estuarino tropical, frente à contaminação da água por chumbo (Pb) em cenários de acidificação induzido por aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no meio marinho. Foram realizados 4 tratamentos de contaminação (controle; 0,001; 0,01; 0,1mg/L de Pb, estabelecidos em ensaio piloto) e três níveis de pH (controle, reduzido em 0,4 e reduzido em 0,8 unidades de pH). Para realização do ensaio, 10 fêmeas ovadas foram utilizadas para dar início às populações experimentais em cada tratamento. A avaliação das populações foi realizada através da contagem de náuplios, copepoditos, fêmeas ovadas e número de adultos a partir de submostras retiradas das unidades experimentais a cada 7 dias até o 21º dia de exposição. Os resultados demonstram que o aumento da acidificação tem potencial de alterar a toxicidade de chumbo na população de organismos-teste, dependendo do nível de acidificação, bem como da concentração do contaminante. Observou-se efeito interativo do pH e do Pb, onde o efeito do pH depende da concentração do metal e vice-versa. A exposição ao Pb provocou aumento da população nos pHs mais ácidos. No pH mais alto observou-se menor população na concentração mais alta, por efeito protetivo. A manutenção e/ou estabilidade e resiliência de ecossistemas marinhos é dependente da conservação de populações de organismos que são base de cadeia trófica, como por exemplo de copépodes. Isso se coaduna com diferentes Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU, mais diretamente o de número 14, voltado à conservação e uso sustentável de oceanos, mares e serviços ecossistêmicos marinhos.

**Palavras-chave:** mudanças climáticas, acidificação oceânica, metais, poluição, copépode, ecotoxicologia



## ABSTRACT

The absorption by the oceans of CO<sub>2</sub> emitted into the atmosphere by human activities alters the carbonate system of seawater, leading, among other consequences, to the phenomenon of ocean acidification. One of the groups that may be affected by acidification are copepods, which are also organisms known to be sensitive to contamination by trace metals. Considering that ocean acidification can interact with metal toxicity, it is important to know the interactive effects between these stressors on this group of organisms that contribute significantly to marine/estuarine ecosystem services. However, traditional ecotoxicological studies with copepods normally evaluate responses such as mortality, somatic growth and reproduction, not considering direct responses at the population level. The aim of this work, therefore, is to evaluate population responses in *Nitokra* sp., a tropical estuarine copepod, to lead (Pb) water contamination in acidification scenarios induced by increased CO<sub>2</sub> concentration in the marine environment. Four contamination treatments were performed (control; 0.001; 0.01; 0.1mg/L of Pb, established in a pilot test) and three pH levels (control, reduced by 0.4 and reduced by 0.8 pH units). To carry out the test, 10 ovate females were used to start the experimental populations in each treatment. Populations were evaluated by counting nauplii, copepodites, ovate females and the number of adults from subsamples taken from the experimental units every 7 days until the 21st day of exposure. An interactive effect of pH and Pb was observed: the pH effect depends on the metal concentration and vice versa. Exposure to Pb caused an increase in the population at more acidic pHs. At the highest pH, a smaller population was observed at the highest concentration, due to a protective effect. The maintenance and/or stability and resilience of marine ecosystems is dependent on the conservation of populations of organisms that form the basis of the trophic chain, such as copepods. This is in line with different Sustainable Development Goals of the UN 2030 Agenda, more directly number 14, which aim the conservation and sustainable use of oceans, seas and marine ecosystem services.

**Keywords:** climate change, ocean acidification, metals, pollution, copepods, ecotoxicology

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 1.1 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....   | 7  |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 8  |
| 2.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....   | 8  |
| 2.2 CULTIVO DOS ORGANISMOS ( <i>Nitokra</i> sp.).....   | 9  |
| 2.3 SISTEMA DE INJEÇÃO DE CO <sub>2</sub> E CONTROLE DE pH.....   | 10 |
| 2.4 ESPECIAÇÃO DO SISTEMA CARBONATO DA ÁGUA.....  | 11 |
| 2.5 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE.....   | 12 |
| 2.5.1 Fortificação ( <i>spiking</i> ) dos meios experimentais com Pb                                    |    |
| 2.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS POPULACIONAIS EM<br><i>Nitokra</i> sp.....                        | 12 |
| 2.7 CÁLCULO DA TAXA DE CRESCIMENTO POPULACIONAL   |    |
| 2.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....   | 14 |
| 2.8.1 Efeitos interativos entre acidificação e contaminação por Pb                                      |    |
| 3. RESULTADOS.....  | 15 |
| 3.1 Controle de qualidade dos ensaios   |    |
| 3.2 Efeito do Pb, pH e tempo de exposição sobre a população de <i>Nitokra</i> sp.                       |    |
| 3.3 Efeito do Pb, pH e tempo de exposição sobre os diferentes estágios de vida<br>de <i>Nitokra</i> sp. |    |
| 3.4 Cálculo da taxa de crescimento populacional   |    |
| 3.5 Sistema carbonato   |    |
| 4. DISCUSSÃO .....  | 34 |
| 5. CONCLUSÃO.....   | 39 |
| BIBLIOGRAFIA.....   | 40 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Desenho experimental dos pilotos, teste e análise química a serem realizadas no âmbito do presente estudo.

**Figura 2.** Médias e desvio padrão das subamostragens realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8, 7.2 e 7.6.

**Figura 3.** Médias e desvio padrão das sub amostragens realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8. pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida Náuplio.

**Figura 4.** Médias e desvio padrão das sub amostragens realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8. pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida Copepodito.

**Figura 5.** Médias e desvio padrão das sub amostragens realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8. pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida Adulto.

**Figura 6.** Médias e desvio padrão das taxas de crescimento populacional do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8. pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Parâmetros físicos – químicos de controle de qualidade dos ensaios. Controle = 0,000 mg/L; Baixa = 0,001 mg/L; Moderada = 0,01 mg/L; Alta = 0,1 mg/L.

**Tabela 2.** Médias de valores de pH por tratamento.

**Tabela 3.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA das variáveis Tempo, Concentração e pH.

**Tabela 4.** Resultados do teste pareado da variável Tempo

**Tabela 5.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Concentração e pH nos níveis do fator “Concentração” e pH 6.8, 7.2 e 7.6.

**Tabela 6.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Concentração e pH nos níveis do fator “pH”.

**Tabela 7.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH e interações sobre o tamanho populacional de náuplios de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

**Tabela 8.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração e pH sobre o tamanho populacional de náuplios de *Nitokra* sp, comparando os níveis do fator “Concentração” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

**Tabela 9.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH e interações sobre o tamanho populacional de copepoditos de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

**Tabela 10.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração e pH sobre o tamanho populacional de copepoditos de *Nitokra* sp,

comparando os níveis do fator “Concentração” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

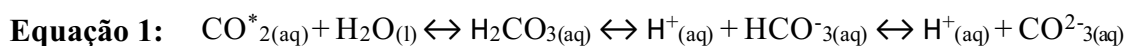
**Tabela 11.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH e interações sobre o tamanho populacional de adultos de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

## 1. INTRODUÇÃO

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) identifica o pH, temperatura, concentração de oxigênio e disponibilidade de alimentos como os quatro principais fatores que afetam a estrutura, funcionamento e capacidade adaptativa do ecossistema marinho (IPCC, 2021). Estes fatores estão sujeitos a perturbações consideráveis nas projeções futuras de mudanças climáticas (IPCC, 2021).

Dados de 2014 mostram que, entre os anos de 1750 e 2011, foram liberados para a atmosfera  $2040 \pm 310$  Gt de  $\text{CO}_2$ , gás produzido principalmente pela queima de combustíveis fósseis, sendo que 30% deste valor foi absorvido pelos oceanos (IPCC, 2014). Apesar da capacidade do oceano em absorver este gás ser estimada em 50% da quantidade produzida até hoje, este processo levaria séculos para acontecer por conta da demora na exportação do carbono da superfície para águas profundas (Maier-Reimer & Hasselmann, 1987). Além disso, a absorção de  $\text{CO}_2$  pelo oceano altera o sistema carbonato da água do mar, fazendo com que seja diminuída sua capacidade tampão e a camada superficial do mar fique sobrecarregada de  $\text{CO}_2$  (Bergstrom, 2016).

O processo de absorção de  $\text{CO}_2$  pelo oceano envolve uma série de reações que resultam na redução do pH da água (Turley et al. 2006) (Equação 1). Consequentemente, desde a Revolução Industrial, houve uma diminuição de 0,1 no pH das águas superficiais oceânicas, correspondente a um aumento de 26% na acidez da água (Guinotte et al. 2008). Para 2100 estima-se que a diminuição, em média, será de 0.3-0.4 unidades de pH oceânico (IPCC, 2007), o que representa um incremento de 100 a 150% na concentração de íons  $\text{H}^+$  (Orr et al., 2013).



Uma mudança em um potencial estressor onde a resposta do ecossistema é desconhecida, e não necessariamente negativa, é denominada um '*driver*' (Henson, 2017). Devido as mudanças provocadas na abundância de espécies, distribuição, vulnerabilidade a predadores e aptidão competitiva, *drivers* como a acidificação e o aquecimento global podem, conseqüentemente, alterar a dinâmica, estrutura e a biodiversidade dos ecossistemas marinhos (Hiscock et al. 2004, Hall-Spencer et al. 2008, Widdicombe e Spicer 2008, Feng et al. 2009). O dióxido de carbono antropogênico absorvido pelos oceanos, portanto, não apenas altera a química da água do mar, como traz também conseqüências para a biota marinha, influenciando diretamente a fisiologia dos organismos por meio do desequilíbrio acidobásico e da redução da capacidade de transporte de oxigênio (Pörtner et al., 2004).

Os invertebrados marinhos expressam uma variedade de respostas frente a distúrbios no balanço ácido-base (Pörtner, 2008; Whiteley, 2011), desde aquelas espécies mais tolerantes, ou seja, com maior habilidade em regular o pH interno (Gutowska et al., 2010), até aquelas mais sensíveis a alterações, cujos impactos da acidificação oceânica já podem ser observados sobre elas (p.ex.: Mayor et al., 2015). Um dos grupos taxonômicos de importância para os ecossistemas marinhos (Kulkarni et al., 2013) e que podem ser afetados pelo aumento da  $pCO_2$ /diminuição de pH são os copépodes. Tais organismos contribuem significativamente aos serviços ecossistêmicos (Bron et al., 2011), sendo parte da cadeia trófica e servindo de alimento.

Estudos indicam alguma variabilidade do efeito da acidificação oceânica em copépodes, demonstrando que a exposição a níveis de acidificação gerados artificialmente, baseados em previsões para um futuro próximo, tiveram impactos negativos no crescimento e na reprodução de copépodes (Cripps et al., 2014; Vehmaa et al., 2016; Fitzner et al., 2012; Thor e Dupont, 2015). Enquanto outros, sugerem que os

organismos possam se aclimatar fisiologicamente em resposta à exposição de longo prazo a alto pCO<sub>2</sub> (Thor e Dupont, 2015). Pode-se dizer também que a resposta à acidificação dos copépodes pode ser modulada por outros estressores como temperatura (Garzke et al., 2016; Hildebrandt et al., 2014; Vehmaa et al., 2012) e metais (Li et al., 2017, Pascal et al., 2010; Wang et al., 2017).

A contaminação química por metais-traço é outro estressor importante para os ecossistemas marinhos. Há vasta literatura reportando efeitos de metais-traço sobre copépodes marinhos, especialmente avaliando respostas em nível subindividual, empregando respostas fisiológicas ou através de biomarcadores bioquímicos, ou individual, como desenvolvimento, crescimento, reprodução ou ciclo de vida (Barka et al., 2001; Bielmyer et al., 2006). Algumas evidências observacionais tendem a sugerir que o efeito de diversos estressores juntos pode adicionar ou amplificar o efeito de um único estressor (Crain et al., 2008), tornando de grande importância a elucidação de quando, onde e quais combinações de estressores podem ocorrer, independentemente da resposta do ecossistema marinho às mudanças de vetores ainda não ser clara (Henson, 2017). Por exemplo, conforme o pH diminui, sítios de adsorção de metais em substâncias na água (ex.: matéria orgânica dissolvida, partículas em suspensão, sedimentos de fundo) tendem a ficar menos disponíveis (Crist et al., 1988; Wilde et al., 2006) para sequestrar metais, uma vez que íons H<sup>+</sup> competem os cátions metálicos por estes pontos (Bruland et al., 1991), ficando, portanto, os metais catiônicos divalentes mais solúveis em águas ácidas. Mudanças na especiação de metais têm, como consequência, mudanças no comportamento e no destino dos mesmos na água do mar, afetando a disponibilidade e a toxicidade desses compostos para os organismos marinhos (Millero et al., 2009).

No entanto, um estudo sobre o efeito do pH e/ou da temperatura sobre a toxicidade de Hg para copépodes marinhos mostrou que a acidificação oceânica cria um efeito



decrecente no acúmulo e na toxicidade do metal (Li et al., 2017), mostrando que a resposta pode ser mais complexa. Porém, o comportamento desse elemento pode não ser similar a de outros metais, então para compreendermos tais lacunas e as respostas dos organismos aos estressores, que podem se modificar ao longo das gerações e facilitar o desenvolvimento de aclimatação fisiológica e/ou resposta adaptativa, se fazem necessários estudos multifatoriais.

Contaminantes como o chumbo (Pb) e seus derivados causam grande preocupação por conta de sua presença perniciosa em ambientes aquáticos e por causarem toxicidade em invertebrados (Minetto et al. 2014). Este é comumente encontrado em resíduos de processos industriais de diferentes finalidades como, por exemplo, fabricação de pigmentos para tintas, indústria de mineração e agricultura (Jarup 2003; Tchounwou et al. 2014), além de recentemente ter sido incluído na lista de substâncias provavelmente carcinogênicas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) e Programa Nacional de Toxicologia dos EUA (NTP) (American Cancer Society, 2022).

Dentre as possíveis consequências da exposição ao Chumbo estão tumores cerebrais e renais, além de toxicidade ao sistema imune, sistema reprodutor, fígado e rins (Silbergeld et al., 2000).

Embora exista literatura sobre os efeitos da acidificação, em conjunto ou não com aquecimento e contaminação química sobre copépodes, os estudos são exclusivamente em nível individual ou subindividual (Wang et al., 2018). Forbes & Calow (2002) indicam que a análise da taxa de crescimento populacional é mais robusta para avaliar os riscos ecológicos dos produtos químicos. Sobre os testes ecotoxicológicos tradicionais, cujo principal objetivo é avaliar respostas apicais, ou seja, concentrações que causam efeito observado no indivíduo (Marty et al., 2017), questiona-se até que ponto as variáveis individuais se traduzem em respostas populacionais, ou seja, se mudanças causadas em

nível individual, em diferentes fases do ciclo de vida dos organismos, provocam mudanças em nível populacional (Forbes, 2002).

Copépodes harpacticoides, como o *Nitokra* sp., são importantes componentes da ecologia bentônica, já que constituem parte da cadeia trófica, servindo de alimento para outros organismos como peixes e crustáceos (Ruppert et al., 1996). Estes organismos são comumente empregados em testes ecotoxicológicos. Entre as vantagens da utilização do *Nitokra* sp. para este fim, estão a alta sensibilidade do organismo a contaminantes, grande abundância na comunidade bentônica, facilidade de cultivo em laboratório, sua resistência a variações de salinidade, curta duração do ciclo de vida, além da facilidade encontrada no tamanho do organismo, otimizando o espaço físico por possuir um tamanho pequeno (Lotufo & Abessa, 2002). Seus 13 distintos estágios de vida tornam seu desenvolvimento fácil de rastrear (Kwok et al., 2015), além de um ciclo de vida que dura aproximadamente 20 dias (Lotufo & Abessa, 2002).

Protocolos (ABNT NBR 16723, 2020) ou documentos de orientações para o uso de copépodes em testes ecotoxicológicos comumente se baseiam em respostas apicais, quais sejam: mortalidade (ISO, 1999), reprodução (Lotufo & Abessa, 2002; Marques & Zaroni, 2004) ou ciclo de vida (ASTM, 2004; OECD, 2014). Protocolos ou testes padronizados cuja resposta são parâmetros populacionais, como taxa de crescimento populacional, ainda não foram estabelecidos.

Considerando que raramente os *drivers* em ecossistemas marinhos atuam de forma isolada, podendo ter seu impacto aumentado por diversos fatores de forma aditiva ou sinérgica (Crain et al., 2008; Pörtner, 2010; Gruber, 2011), muitas das mudanças observadas durante as últimas décadas, documentadas em números crescentes em todo o mundo (eventos como colapsos de estoque de peixes, hipóxia severa, reorganização de ecossistemas) (Francis et al., 1998; Lees et al., 2006; Beaugrand et al., 2008; Kirby et al.,

2009; Alheit & Bakun, 2010) foram concomitantes a variações anteriores nas condições climáticas, o que indica uma aproximação entre os processos do ecossistema marinho e o sistema climático global (Francis et al., 1998; Beaugrand et al., 2008; Alheit & Bakun, 2010). Desta forma, são oportunos os estudos que avaliem como os sistemas naturais responderiam caso as projeções relacionadas às alterações ambientais no meio marinho se realizem.

A Organização das Nações Unidas classifica como Objetivo de Desenvolvimento Sustentável de número 14 (Vida na Água) a conservação e uso sustentável de oceanos, mares e recursos marinhos. Para a Agenda 2030, espera-se, dentre muitas propostas, a prevenção e redução significativa da poluição marinha de todos os tipos; a gestão sustentável e proteção de ecossistemas marinhos e costeiros para evitar impactos adversos; minimizar e enfrentar impactos da acidificação dos oceanos por meio da cooperação científica em todos os níveis, entre outros. O aumento do conhecimento científico e o desenvolvimento das capacidades de pesquisa e a transferência de tecnologia marinha a fim de melhorar a saúde dos oceanos se faz necessário (ONU, 2018). Desta forma, a manutenção ou fortalecimento da produtividade e resiliência de ecossistemas marinhos é dependente da conservação de populações de organismos que são base de cadeia trófica, como os copépodes.

Devido às dificuldades de se realizar experimentos multifatoriais ao longo de várias gerações de organismos-teste, efeitos combinados de múltiplos *drivers* permanecem desafiadores em estudos de laboratório. Torna-se, portanto, relevante a realização de ensaios ecotoxicológicos multifatoriais e que avaliem diretamente parâmetros populacionais destes organismos. Portanto, estudos de efeitos interativos de efeitos da acidificação oceânica costeira, aquecimento do meio marinho, e contaminação por metais-traço, sobre populações de copépodes ampliam nossa capacidade de prever

impactos futuros na dinâmica da cadeia alimentar e outros processos ecossistêmicos (Fabry et al., 2008).

Além disso, o fato de que 95% do total de espécies animais é de invertebrados, componentes majoritários de todos os ecossistemas, realizar e monitorar testes populacionais de tais organismos possui importante relevância (Pennafirme e Soares-Gomes, 2005). Tendo isso em vista, este estudo irá avaliar o efeito sob a população de *Nitokra* sp.

### **1.1 HIPÓTESE E OBJETIVOS**

A hipótese do trabalho é que a acidificação de águas costeiras, consequência das alterações climáticas, modifica a toxicidade do chumbo (Pb) para a população de *Nitokra* sp.

O objetivo deste trabalho é avaliar respostas em nível populacional nesta espécie de copépode harpacticóide estuarino tropical frente à contaminação da água, em um cenário de acidificação induzido por aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no meio marinho. Os objetivos específicos são:

(i) Identificar concentrações de efeito observado e não-observado de Pb para os parâmetros populacionais de *Nitokra* sp.

(ii) Avaliar o efeito do Pb, do pH, e possíveis interações, sobre parâmetros populacionais de *Nitokra* sp.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Antes do início dos experimentos, foram realizados testes-piloto para avaliação da repetibilidade de subamostras da população de copépodes nos meios experimentais. Os resultados mostraram que amostras de 10mL, em um volume total de 100mL de meio experimental, retiradas após agitação manual do sistema experimental, apresentavam boa repetibilidade e eram correlacionáveis com a população total de organismos. As concentrações-teste utilizadas também foram previamente estabelecidas através de um teste-piloto partindo de uma concentração estatisticamente significativa retirada do CEPA (Canadian Environmental Protection Act, 1999). A partir da concentração de efeito observado, as demais foram definidas em uma razão de diluição de 10.

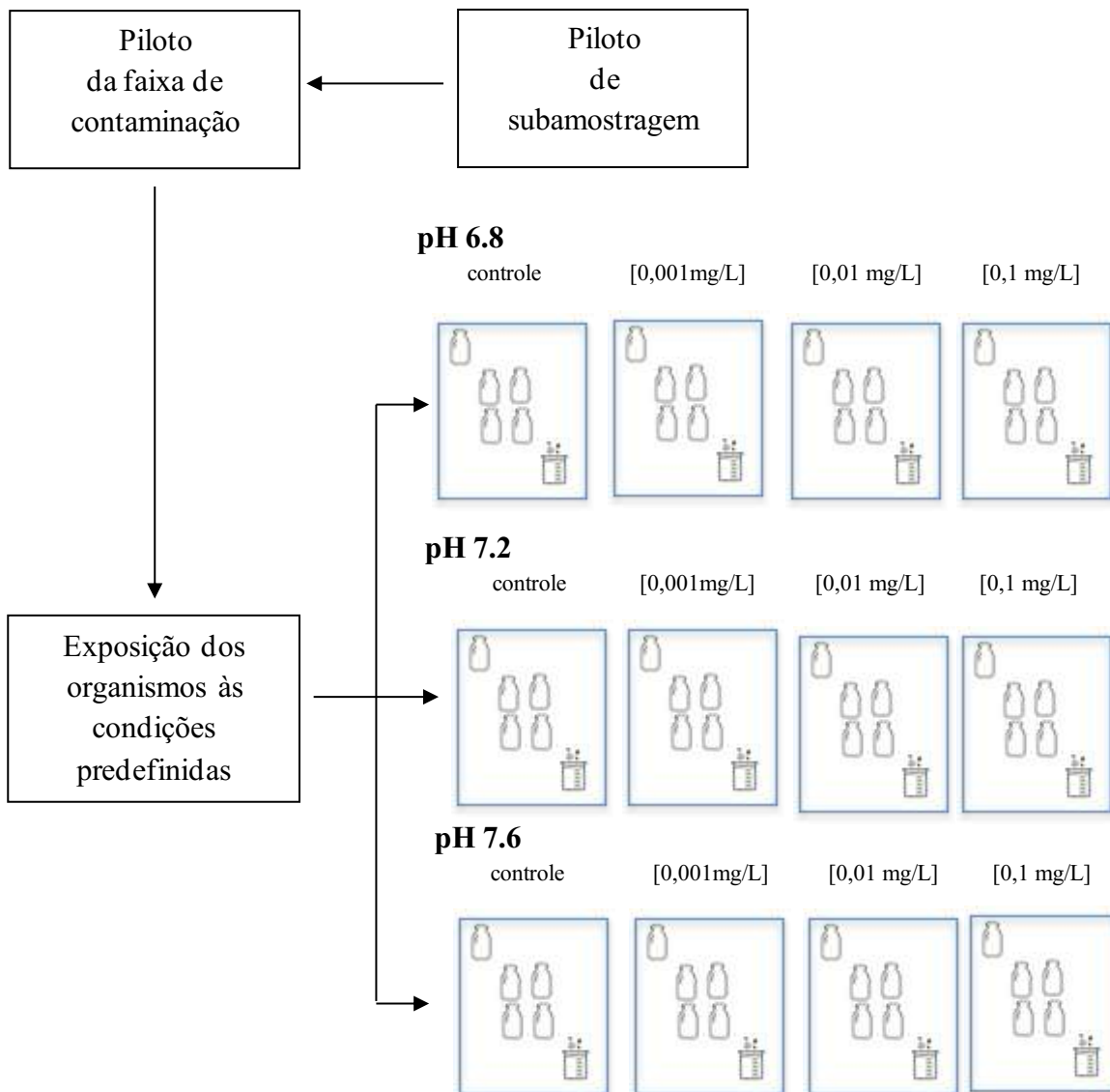
Determinado o procedimento da subamostragem e concentrações-teste, foi realizado ensaio de exposição empregando copépode *Nitokra* sp. a diferentes concentrações de Pb sob variação de pH. As concentrações utilizadas foram Controle (0 mg/L), e as concentrações de Pb, baixa (0,001 mg/L), moderada (0,01 mg/L) e alta (0,1 mg/L). A temperatura de exposição foi mantida em 26 ( $\pm 1$ ) °C e os valores de pH foram estabelecidos a partir do pH natural da água de diluição (água do mar nas mesmas condições utilizadas nos controles de contaminação, i.e., água do mar reconstituída ajustada à salinidade 17 com água destilada) utilizada: controle (não acidificado, em torno de 7,6), diminuição de 0.4 unidade de pH em relação ao controle, e diminuição de 0.8 unidade de pH em relação ao controle. Foi empregado o desenho fatorial completo (todos os níveis de um fator testados em cada um dos níveis do outro fator). A diferença de 0.4 unidade de pH entre os níveis testados é baseada na projeção de acidificação oceânica

para o final do século (IPCC, 2021). Para cada tratamento foram realizadas 4 réplicas, mais uma réplica exclusiva para análises físico-químicas de cada concentração (medição de salinidade, oxigênio dissolvido, pH).

Devido ao grande número de sistemas-teste operando ao mesmo tempo, e para garantir a homogeneidade da temperatura de exposição em todos eles, os ensaios foram realizados em sala climatizada onde a temperatura foi mantida a 25°C através de ar-condicionado apresentando função reserva (quente/frio) em fotoperíodo 12h:12h.

## **2.2 CULTIVO DOS ORGANISMOS (*Nitokra* sp.)**

Para maior controle dos organismos utilizados no teste, foram utilizados cultivos mantidos em laboratório em *Erlenmeyers* com capacidade 1 L, com água destilada salinizada artificialmente (salinidade 17) com sal marinho RedSea®. Os cultivos são mantidos em fotoperíodo 12h/12h (claro:escuro) e temperatura de 25 ± 2 °C e alimentados duas vezes por semana com ração específica. A ração é feita através da hidratação de flocos à base de camarão (NovoColor) em 500 mL de água destilada aerada durante 1 hora. Após decantar, o sobrenadante é retirado e o restante é armazenado a 4°C. Antes de ser fornecida aos cultivos, a porção a ser oferecida é mantida na estufa para equilibrar à temperatura a qual os organismos são mantidos.



**Figura 1.** Desenho experimental dos pilotos, teste e análise química a serem realizadas no âmbito do presente estudo.

### 2.3 SISTEMA DE INJEÇÃO DE CO<sub>2</sub> E CONTROLE DE pH

Neste estudo foi utilizado um sistema de exposição de caixa semi fechada, devido ao ensaio ser realizado em sistemas-teste de pequeno volume (adaptado de Lee et al., 2016). Em uma caixa plástica foram acomodados, além dos sistemas-teste (unidades

experimentais), 2 unidades extras: uma delas contendo água de diluição , cuja finalidade foi apenas acomodar a saída da mangueira de introdução de CO<sub>2</sub> na caixa, enquanto no outro, mantido em condições idênticas às unidades experimentais, foi mantido o sensor para medição do pH em tempo real. Desta forma, o CO<sub>2</sub> borbulhado é difundido pela atmosfera da caixa e se dissolve homogeneamente tanto na água do recipiente de medição de pH, quanto nos meios experimentais do sistemas-teste.

## **2.4 ESPECIAÇÃO DO SISTEMA CARBONATO DA ÁGUA**

O sistema carbonato da água do mar é alterado pelo CO<sub>2</sub>, que modifica concentrações de alcalinidade total (AT), carbono inorgânico total (CIT), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, saturação ( $\Omega$ ) de aragonita e calcita. Foi caracterizada a especiação do sistema carbonato nos meios experimentais a partir da quantificação da AT na água durante e após o tempo de exposição, nos tratamentos controle de contaminação e contaminados, em todos os pHs testados, através de titulação com HCl (0,1M) e auxílio de titulador automático (Hanna HI 901). Com os dados provenientes das análises de pH e alcalinidade total e utilizando-se o programa CO<sub>2</sub>SYS 13 (Millero, 2006), com escala de pH NBS (mol kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O) e constante dissociação de Mehrbach et al. (1973), adaptado por Dickson e Millero (1987), serão estimadas as concentrações das demais espécies do sistema carbonato, além de  $\Omega$  calcita e  $\Omega$  aragonita.



## **2.5 AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CONTAMINANTE**

### **2.5.1 Fortificação (*spiking*) dos meios experimentais com Pb**

Para a produção da solução estoque (SE) foi utilizado o cloreto de chumbo. A partir de 500 mL de SE foi feita a diluição seriada com o auxílio de pipeta volumétrica, utilizando água do mar reconstituída em diferentes volumes. Para cada tratamento foi produzido um volume único, que depois foi dividido entre as réplicas com o auxílio de uma proveta.

## **2.6 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS POPULACIONAIS EM**

### ***Nitokra* sp.**

Dez fêmeas ovígeras de *Nitokra* sp. foram separadas dos cultivos mantidos em laboratório em fotoperíodo 12h/12h claro: escuro, temperatura controlada de  $26 \pm 2$  °C, em água destilada artificialmente salinizada ajustada à salinidade 17 com sal marinho RedSea® (água de diluição) e acomodadas em garrafas plásticas de 300mL de capacidade, contendo 100mL de meio experimental. Os meios experimentais consistem em somente água de diluição para o tratamento Controle de Pb, e água de diluição fortificada (*spiked*) com Pb, nas devidas concentrações estabelecidas, para os demais níveis de exposição ao Pb a serem testados. Os organismos em cada réplica foram alimentados a cada três dias com 0,22 mL de alimento, feito a partir de ração de peixe industrializada em flocos à base de camarão NovoBel®, hidratada em 1L de água destilada e aerada durante 2 horas. Após decantação, o sobrenadante é retirado e armazenado em geladeira a 4°C. Antes de ser

fornecido aos cultivos, o alimento permanece na estufa para equilibrar sua temperatura por pelo menos 1 hora.

A fim de se construir a curva de crescimento populacional, nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias a população foi subamostrada através de retiradas de amostras de todos os meios experimentais (4 réplicas cada) de volume igual a 10 mL (10% do volume total), após agitação durante 10s, com auxílio de bastão de vidro. A retirada da amostra foi feita com auxílio de pipeta volumétrica, realizando movimentos circulares, de forma a serem retiradas amostras de vários pontos do meio amostral, conforme determinado em ensaios-piloto para testar a viabilidade das subamostragens. O meio experimental, com as mesmas condições de cada tratamento, foi repostado no mesmo volume amostrado. Os organismos foram filtrados, corados e fixados com uma solução de formol e rosa de bengala para em seguida foi feita a contagem com auxílio de lupa Zeiss® com aumento 4x, separando-os em estágios de desenvolvimento: náuplios, copepoditos, adultos e adultas ovíferas.

Para os ensaios, os cultivos foram alimentados diariamente durante os três dias anteriores com 1 mL de ração, a fim de ficarem com as melhores condições para uso.

## **2.7 CÁLCULO DA TAXA DE CRESCIMENTO POPULACIONAL**

A partir do tamanho populacional inicial e final, foi calculada a taxa de crescimento populacional ( $r$ ) para o tempo de exposição (21 dias) de acordo com a fórmula (1), para crescimento exponencial:

$$(1) r = \frac{\ln \left( \frac{N_t}{N_0} \right)}{t}$$

sendo:

$r$  - Crescimento Populacional;

Nt - Número de organismos total;

N0 - Número de organismos inicial;

t - Tempo de exposição.

## **2.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **2.8.1 Efeitos interativos entre acidificação e contaminação por Pb**

Possíveis efeitos dos parâmetros de controle de qualidade do ensaio (ex.: OD, salinidade) sobre a população total de *Nitokra* sp. foram avaliados através de análises de correlação de Pearson.

A avaliação dos efeitos interativos do Pb e acidificação induzida por aumento da concentração de CO<sub>2</sub> foi realizada através da análise do tamanho populacional total. Foi utilizada análise multifatorial de variância Permutacional (PERMANOVA) (Anderson, 2001) para testar o efeito dos fatores sobre número de náuplios, copepoditos, adultos e taxa de crescimento populacional, considerando os fatores fixos: “Concentração de Pb” (quatro níveis: Controle, Pb-baixa, Pb-moderada e Pb-alta), “Tempo” (7, 14 e 21 dias) e “pH” (Controle não acidificado, diminuição de 0.4 unidade de pH em relação ao controle, e diminuição de 0.8 unidade de pH em relação ao controle). Para incluir a informação da variação populacional ao longo do tempo, o resultado obtido em cada tempo de exposição (7, 14 e 21 dias de exposição) foi considerado uma variável dependente e foi realizada Permanova univariada (Anderson et al. 2008). Os testes PERMANOVA para dados univariados foram conduzidos em matrizes de distância Euclidiana. Testes pareados de comparações múltiplas foram realizados quando diferenças significativas foram detectadas ( $p < 0,05$ ), usando valores p de Monte Carlo quando o número de permutações

foi inferior a 50 (no contexto de 999 permutações solicitadas ao programa ao ser executado) (Anderson et al. 2008).

Como a heterogeneidade de variâncias pode afetar os resultados de PERMANOVA, tendo um falso positivo como consequência (Anderson et al, 2008), foi utilizada análise PERMDISP para testar a homogeneidade nos diferentes fatores.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Critério de aceitabilidade dos ensaios**

A tabela 1 apresenta os resultados físico-químicos dos tempos 7, 14 e 21 do teste realizado. A salinidade não interferiu nas respostas obtidas ( $r(34)=-0.13$ ;  $p<0.05$ ). O pH nas análises se manteve, em média, próximo ao esperado no início, mostrando a eficácia do método utilizado para analisar cenários de acidificação em condições laboratoriais. Apesar dos dados de oxigênio dissolvido parecerem baixos, os resultados das análises de correlação de Pearson mostra um coeficiente de correlação negativo ( $r(34)=-0.39$ ), evidência de que o OD não foi fator limitante para o crescimento populacional durante o ensaio.

A tabela 2 apresenta os resultados físico-químicos dos tempos 7, 14 e 21 do teste realizado retirados do equipamento utilizado (ApexFusion). O tratamento controle de acidificação foi acompanhado em tempo real apenas no controle. Os demais foram medidos a cada tempo.

**Tabela 1.** Parâmetros físico – químicos de controle de qualidade dos ensaios. Controle = 0,000 mg/L; Baixa = 0,001 mg/L; Moderada = 0,01 mg/L; Alta = 0,1 mg/L. O pH foi acompanhado em tempo real em todos os tratamentos com acidificação.

| Tratamento     | Tempo (dias) | Salinidade | T °C | O.D. (%) |
|----------------|--------------|------------|------|----------|
| 6.8 [controle] | 7            | 14         | 25,7 | 36,6     |
| 6.8 [baixa]    | 7            | 14         | 25,6 | 36,5     |
| 6.8 [moderada] | 7            | 14         | 25,8 | 36,4     |
| 6.8 [alta]     | 7            | 14         | 25,7 | 36,3     |
| 7.2 [controle] | 7            | 14         | 25,8 | 37,2     |
| 7.2 [baixa]    | 7            | 14         | 25,9 | 37,0     |
| 7.2 [moderada] | 7            | 15         | 25,8 | 36,6     |
| 7.2 [alta]     | 7            | 15         | 25,8 | 36,6     |
| 7.6 [controle] | 7            | 15         | 25,8 | 42,4     |
| 7.6 [baixa]    | 7            | 14         | 25,8 | 38,1     |
| 7.6 [moderada] | 7            | 14         | 25,6 | 38,3     |
| 7.6 [alta]     | 7            | 14         | 25,6 | 37,2     |
| 6.8 [controle] | 14           | 15         | 25,4 | 34,5     |
| 6.8 [baixa]    | 14           | 15         | 25,8 | 34,6     |
| 6.8 [moderada] | 14           | 14         | 26,0 | 34,6     |
| 6.8 [alta]     | 14           | 14         | 25,9 | 34,5     |
| 7.2 [controle] | 14           | 15         | 25,6 | 34,4     |
| 7.2 [baixa]    | 14           | 15         | 25,7 | 34,2     |
| 7.2 [moderada] | 14           | 15         | 25,5 | 34,2     |
| 7.2 [alta]     | 14           | 14         | 25,7 | 34,3     |
| 7.6 [controle] | 14           | 15         | 25,8 | 33,6     |
| 7.6 [baixa]    | 14           | 15         | 25,7 | 33,8     |
| 7.6 [moderada] | 14           | 15         | 25,8 | 33,9     |
| 7.6 [alta]     | 14           | 15         | 25,8 | 34,4     |
| 6.8 [controle] | 21           | 15         | 23,0 | 51,5     |
| 6.8 [baixa]    | 21           | 15         | 23,0 | 52,6     |
| 6.8 [moderada] | 21           | 15         | 23,3 | 52,6     |
| 6.8 [alta]     | 21           | 15         | 23,1 | 49,9     |
| 7.2 [controle] | 21           | 15         | 23,3 | 50,7     |
| 7.2 [baixa]    | 21           | 15         | 23,0 | 53,0     |
| 7.2 [moderada] | 21           | 15         | 23,5 | 52,1     |
| 7.2 [alta]     | 21           | 15         | 23,0 | 51,6     |
| 7.6 [controle] | 21           | 16         | 22,6 | 35,3     |
| 7.6 [baixa]    | 21           | 15         | 23,0 | 36,4     |
| 7.6 [moderada] | 21           | 16         | 23,0 | 48,5     |
| 7.6 [alta]     | 21           | 16         | 23,1 | 52,3     |

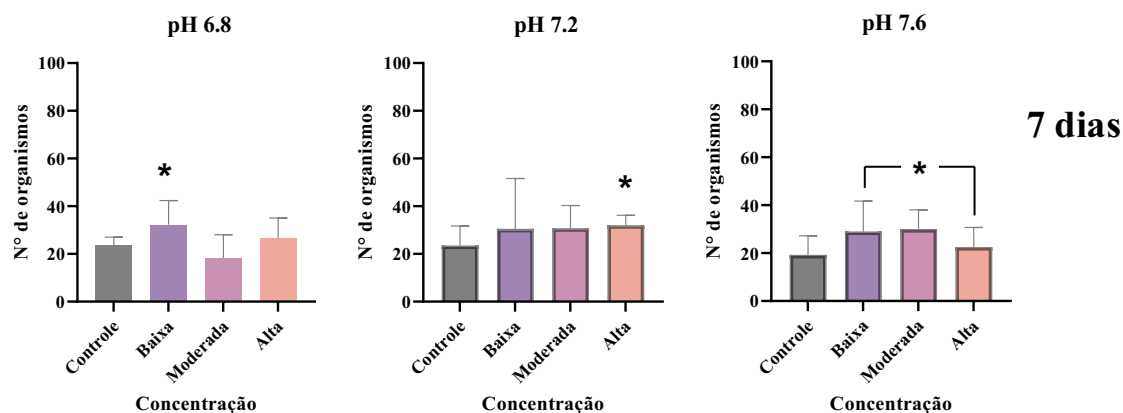
\* porcentagem de saturação O.D.

**Tabela 2.** Médias  $\pm$  desvio-padrão de valores de pH por tratamento.

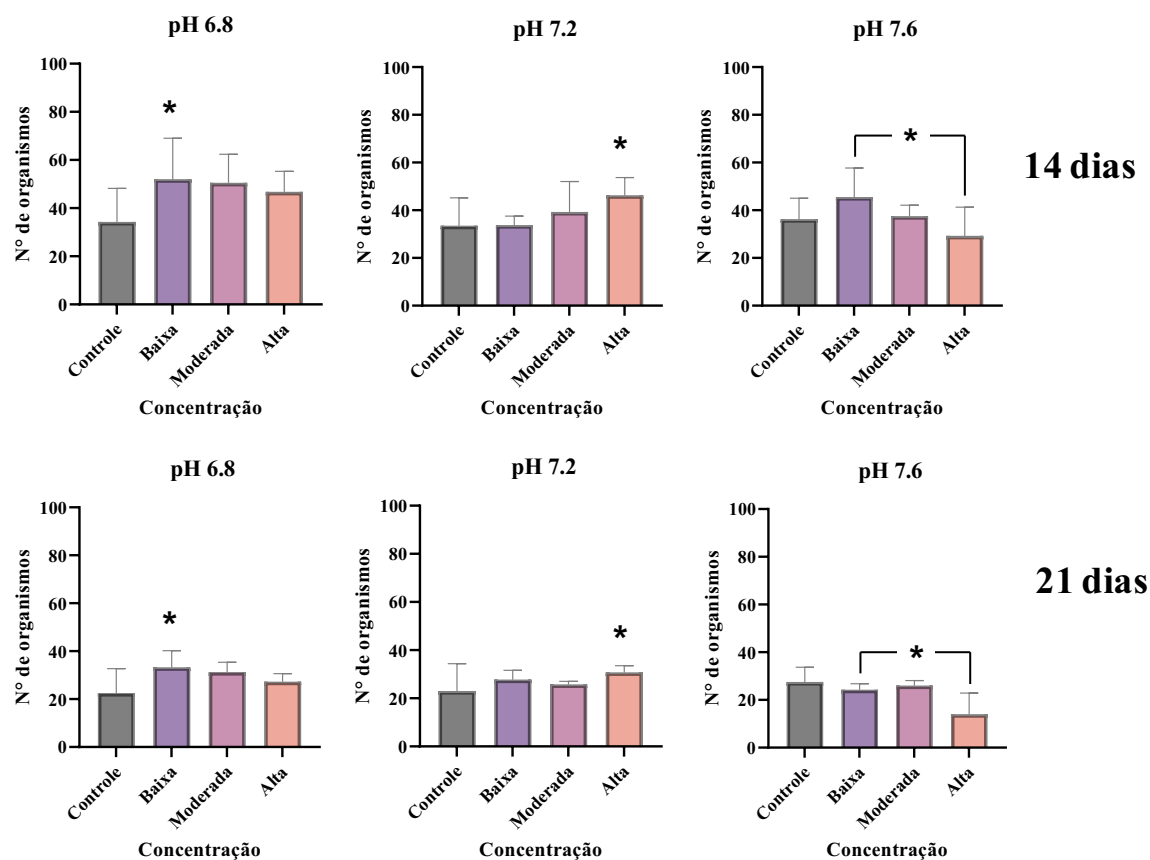
| Tratamento     | pH              |
|----------------|-----------------|
| 6.8 [controle] | 6,91 $\pm$ 0,11 |
| 6.8 [baixa]    | 6,82 $\pm$ 0,08 |
| 6.8 [moderada] | 6,84 $\pm$ 0,19 |
| 6.8 [alta]     | 6,74 $\pm$ 0,09 |
| 7.2 [controle] | 7,18 $\pm$ 0,07 |
| 7.2 [baixa]    | 7,27 $\pm$ 0,19 |
| 7.2 [moderada] | 7,23 $\pm$ 0,08 |
| 7.2 [alta]     | 7,26 $\pm$ 0,11 |
| 7.6 [controle] | 7,60 $\pm$ 0,21 |
| 7.6 [baixa]    | 7,61 $\pm$ 0,13 |
| 7.6 [moderada] | 7,64 $\pm$ 0,11 |
| 7.6 [alta]     | 7,59 $\pm$ 0,05 |

### 3.2 Efeito do Pb, pH e tempo de exposição sobre o tamanho da população total de *Nitokra* sp.

A figura 2 apresenta os resultados de densidade populacional de *Nitokra* sp. em função da concentração de Pb, pH e tempo de exposição.



**Figura 2.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em 7, 14 e 21 dias a partir do início do ensaio, nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) e pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6, respectivamente, para a população total. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.



**Figura 2.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em 7, 14 e 21 dias a partir do início do ensaio, nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) e pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6, respectivamente, para a população total. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.

Através da análise PERMANOVA identificou-se, no teste principal (*main test*), efeito significativo das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH isoladas (Tabela 3) sobre o tamanho populacional total de *Nitokra* sp. Já na análise de interação, apenas a variável Concentração em interação com pH foi significativa.

**Tabela 3.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH e interações sobre o tamanho populacional total de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

| <i>Teste</i>                           | <i>df</i> | <i>SS</i>     | <i>MS</i>     | <i>Pseudo-F</i> | <i>P(perm)</i> |
|--|-----------|---------------|---------------|-----------------|----------------|
| <b>Tempo</b>                           | <b>2</b>  | <b>6351,1</b> | <b>3175,5</b> | <b>35,791</b>   | <b>0,001</b>   |
| <b>Concentração (Co)</b>               | <b>3</b>  | <b>993,3</b>  | <b>331,1</b>  | <b>3,7318</b>   | <b>0,02</b>    |
| <b>pH</b>                              | <b>2</b>  | <b>561,93</b> | <b>280,97</b> | <b>3,1667</b>   | <b>0,045</b>   |
| <i>Tempo (interação com Co)</i>        | 6         | 199,06        | 33,176        | 0,37392         | 0,903          |
| <i>Tempo (interação com pH)</i>        | 4         | 603,44        | 150,86        | 1,7003          | 0,159          |
| <b>Concentração (interação com pH)</b> | <b>6</b>  | <b>1339,7</b> | <b>223,28</b> | <b>2,5166</b>   | <b>0,021</b>   |
| <i>Tempo (interação com Co e pH)</i>   | 12        | 962,28        | 80,19         | 0,90381         | 0,545          |

Nos testes pareados considerando apenas a variável Tempo (Tabela 4), as diferenças foram significativas entre os tempos 7 e 14 dias e 14 e 21 dias, sendo que a população apresentou um aumento em 14 dias, seguida de uma diminuição em 21 dias.



**Tabela 4.** Resultados dos testes pareados para os níveis da variável Tempo, dos níveis de concentração de Pb em cada nível de pH, e dos níveis de pH em cada nível de concentração, sobre o tamanho populacional total de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

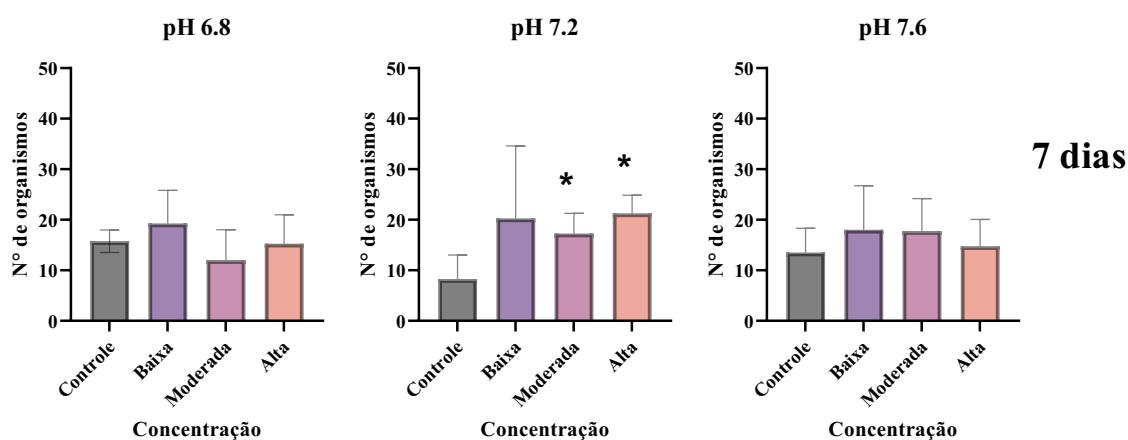
| <i>Fator ou nível</i>        | <i>Comparação pareada</i> | <i>t</i>    | <i>P(perm)</i> | <i>Unique perms</i> | <i>P(MC)</i> |
|------------------------------|---------------------------|-------------|----------------|---------------------|--------------|
| <b>Tempo</b>                 | <b>7, 14</b>              | <b>6,37</b> | <b>0,001</b>   | <b>996</b>          | <b>0,001</b> |
|                              | 7, 21                     | 0,24        | 0,818          | 996                 | 0,835        |
|                              | <b>14, 21</b>             | <b>7,81</b> | <b>0,001</b>   | <b>997</b>          | <b>0,001</b> |
| <b>pH 6.8</b>                | <b>Controle, Baixa</b>    | <b>2,69</b> | <b>0,010</b>   | <b>996</b>          | <b>0,017</b> |
|                              | Controle, Moderada        | 1,64        | 0,124          | 992                 | 0,098        |
|                              | Controle, Alta            | 1,85        | 0,077          | 996                 | 0,083        |
|                              | Baixa, Moderada           | 1,33        | 0,195          | 991                 | 0,21         |
|                              | Baixa, Alta               | 1,39        | 0,168          | 991                 | 0,208        |
|                              | Moderada, Alta            | 0,05        | 0,953          | 994                 | 0,956        |
| <b>pH 7.2</b>                | Controle, Baixa           | 0,84        | 0,423          | 995                 | 0,363        |
|                              | Controle, Moderada        | 1,29        | 0,201          | 991                 | 0,208        |
|                              | <b>Controle, Alta</b>     | <b>2,84</b> | <b>0,010</b>   | <b>995</b>          | <b>0,012</b> |
|                              | Baixa, Moderada           | 0,28        | 0,765          | 983                 | 0,781        |
|                              | Baixa, Alta               | 1,44        | 0,186          | 997                 | 0,196        |
|                              | Moderada, Alta            | 1,44        | 0,163          | 995                 | 0,169        |
| <b>pH 7.6</b>                | Controle, Baixa           | 1,41        | 0,159          | 995                 | 0,195        |
|                              | Controle, Moderada        | 1,28        | 0,203          | 987                 | 0,204        |
|                              | Controle, Alta            | 1,59        | 0,125          | 992                 | 0,135        |
|                              | Baixa, Moderada           | 0,52        | 0,608          | 989                 | 0,599        |
|                              | <b>Baixa, Alta</b>        | <b>2,68</b> | <b>0,015</b>   | <b>995</b>          | <b>0,017</b> |
|                              | <b>Moderada, Alta</b>     | <b>2,84</b> | <b>0,015</b>   | <b>988</b>          | <b>0,017</b> |
| <b>Controle</b>              | 6.8, 7.2                  | 0,04        | 0,963          | 995                 | 0,972        |
|                              | 6.8, 7.6                  | 0,23        | 0,835          | 998                 | 0,818        |
|                              | 7.2, 7.6                  | 0,26        | 0,776          | 989                 | 0,807        |
| <b>Concentração Baixa</b>    | 6.8, 7.2                  | 1,68        | 0,097          | 989                 | 0,119        |
|                              | 6.8, 7.6                  | 1,36        | 0,209          | 998                 | 0,178        |
|                              | 7.2, 7.6                  | 0,48        | 0,619          | 991                 | 0,627        |
| <b>Concentração Moderada</b> | 6.8, 7.2                  | 0,38        | 0,701          | 992                 | 0,715        |
|                              | 6.8, 7.6                  | 0,70        | 0,490          | 996                 | 0,481        |
|                              | 7.2, 7.6                  | 0,24        | 0,810          | 992                 | 0,833        |
| <b>Concentração Alta</b>     | 6.8, 7.2                  | 1,10        | 0,280          | 995                 | 0,267        |
|                              | <b>6.8, 7.6</b>           | <b>3,28</b> | <b>0,007</b>   | <b>997</b>          | <b>0,011</b> |
|                              | <b>7.2, 7.6</b>           | <b>4,48</b> | <b>0,001</b>   | <b>998</b>          | <b>0,001</b> |

No teste pareado do termo interação “Concentração/pH”, identificou-se, no pH 6.8, um aumento significativo da população na concentração Baixa em relação a Controle. Já nos tratamentos de pH 7.2, a população na mais alta concentração de Pb foi significativamente maior do que na Controle.

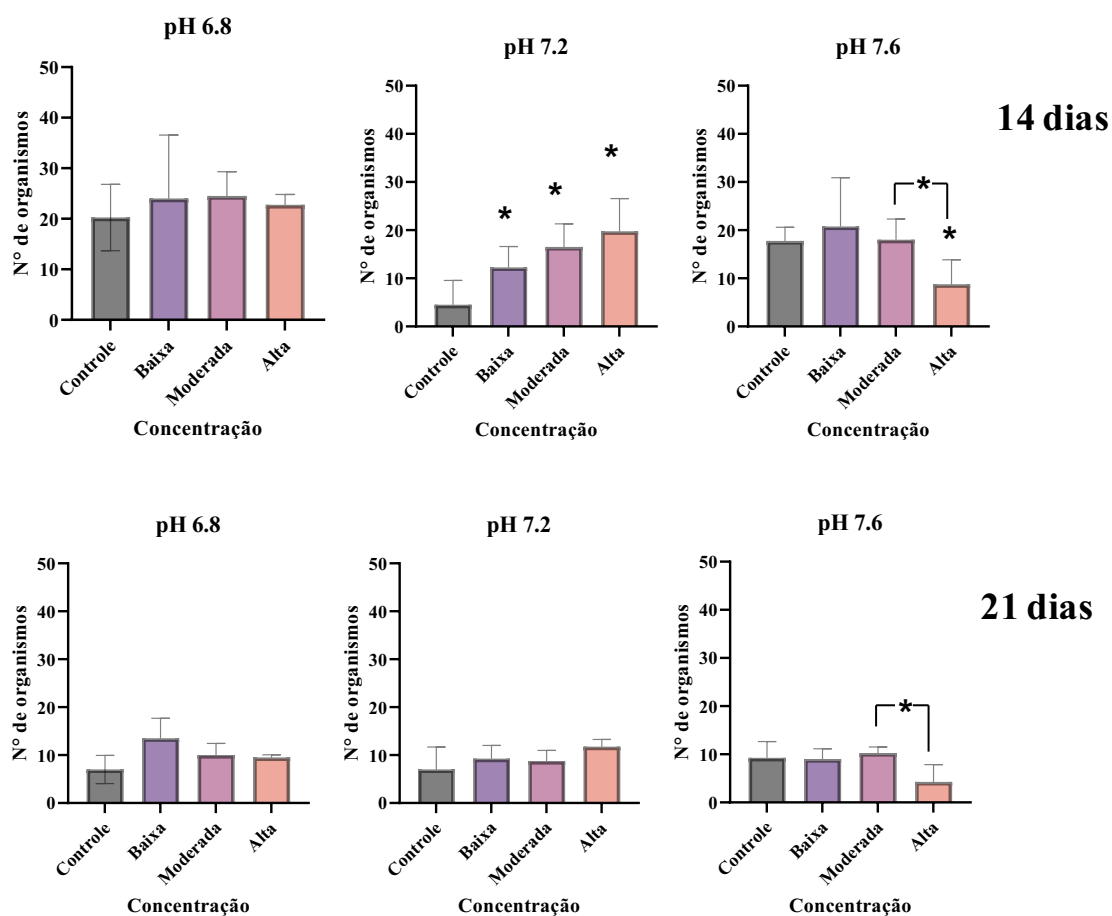
Já os testes pareados de comparação dos níveis de pH dentro de cada nível de contaminação (Tabela 6) mostraram que, apenas na concentração mais alta de Pb, o efeito do pH resultou em uma menor população no pH 7.6, comparado aos níveis de pH mais acidificados (6.8 e 7.2).

### 3.3 Efeito do Pb, pH e tempo de exposição sobre os diferentes estágios de vida de *Nitokra* sp.

A figura 3 apresenta os resultados de número de náuplios de *Nitokra* sp. em função da concentração de Pb, pH e tempo de exposição.



**Figura 3.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8. pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida náuplio. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.



**Figura 3.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida náuplio. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.

Através da análise PERMANOVA identificou-se, no teste principal (*main test*), efeito significativo das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH isoladas (Tabela 7) sobre o tamanho populacional dos náuplios de *Nitokra* sp. Já na análise de interação, houve interação entre as variáveis Concentração e pH e as variáveis Tempo, Concentração e pH. Sendo os efeitos de um fator dependente dos outros dois fatores testados, serão apresentados e discutidos apenas os testes pareados da interação trifatorial.

**Tabela 7.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração de Pb e pH e interações sobre o tamanho populacional de náuplios de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

| <i>Teste</i>                                  | <i>df</i> | <i>SS</i>      | <i>MS</i>     | <i>Pseudo-F</i> | <i>P(perm)</i> |
|---|-----------|----------------|---------------|-----------------|----------------|
| <b><i>Tempo</i></b>                           | <b>2</b>  | <b>1,809E5</b> | <b>90473</b>  | <b>327,71</b>   | <b>0,001</b>   |
| <b><i>Concentração (Co)</i></b>               | <b>3</b>  | <b>2478,6</b>  | <b>826,19</b> | <b>2,9926</b>   | <b>0,031</b>   |
| <b><i>pH</i></b>                              | <b>2</b>  | <b>1658</b>    | <b>829</b>    | <b>3,0028</b>   | <b>0,05</b>    |
| <i>Tempo (interação com Co)</i>               | 6         | 1506,6         | 251,1         | 0,90954         | 0,513          |
| <i>Tempo (interação com pH)</i>               | 4         | 1983,1         | 495,78        | 1,7958          | 0,134          |
| <b><i>Concentração (interação com pH)</i></b> | <b>6</b>  | <b>7466,3</b>  | <b>1244,4</b> | <b>4,5074</b>   | <b>0,001</b>   |
| <b><i>Tempo (interação com Co e pH)</i></b>   | <b>12</b> | <b>8106,6</b>  | <b>675,55</b> | <b>2,447</b>    | <b>0,01</b>    |

Os testes pareados de comparação dos níveis de Concentração dentro de cada nível de Tempo e pH (tabela 8) mostraram que ao sétimo dia apenas no pH 7.2 foram observados aumentos significativos do número de náuplios nas concentrações de Pb Moderada e Alta, em relação ao Controle. No décimo quarto dia, o pH 7.2 demonstrou aumento significativo do número de náuplios nas concentrações de Pb Baixa, Moderada e Alta, em relação ao controle. O pH 7.6 também demonstrou resultados significativos entre as concentrações Controle e Alta e Moderada e Alta. No vigésimo primeiro, dia observou-se diferença significativa entre as concentrações Moderada e Alta tanto no pH 7.6.

**Tabela 8.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração de Pb e pH sobre o tamanho populacional de náuplios de *Nitokra* sp, comparando os níveis do fator “Concentração” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

| <i>Nível tempo</i>    | <i>Nível pH</i>      | <i>Comparação pareada</i> | <i>t</i> | <i>P(perm)</i> | <i>Unique perms</i> | <i>P(MC)</i> |
|-----------------------|----------------------|---------------------------|----------|----------------|---------------------|--------------|
| <b><i>Tempo 7</i></b> | <b><i>pH 6.8</i></b> | <i>Controle, Baixa</i>    | 1,01     | 0,36           | 10                  | 0,361        |
|                       |                      | <i>Controle, Moderada</i> | 1,17     | 0,40           | 07                  | 0,294        |
|                       |                      | <i>Controle, Alta</i>     | 0,16     | 0,93           | 12                  | 0,886        |
|                       |                      | <i>Baixa, Moderada</i>    | 1,63     | 0,16           | 11                  | 0,174        |
|                       |                      | <i>Baixa, Alta</i>        | 0,92     | 0,43           | 17                  | 0,382        |
|                       |                      | <i>Moderada, Alta</i>     | 0,78     | 0,49           | 16                  | 0,474        |

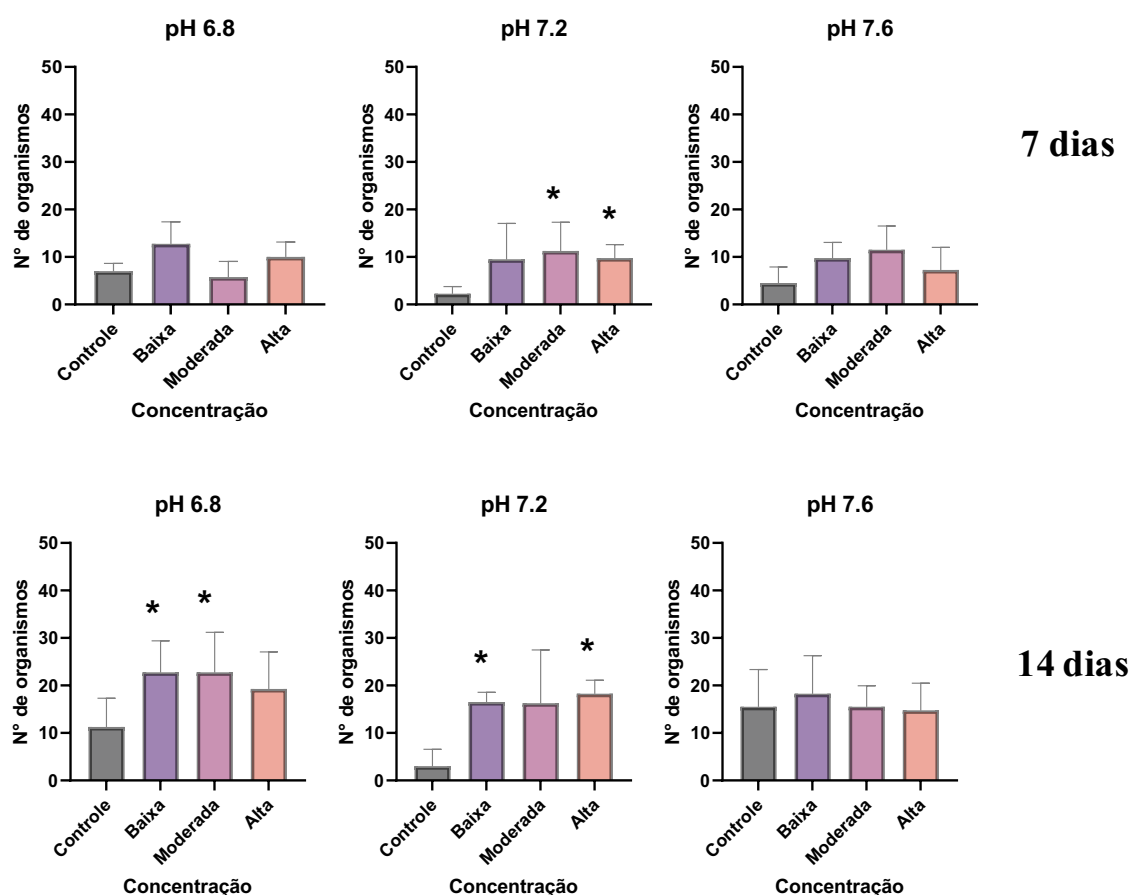
**Tabela 8.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração de Pb e pH sobre o tamanho populacional de náuplios de *Nitokra* sp, comparando os níveis do fator “Concentração” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

|                 |               |                                  |             |             |           |              |
|-----------------|---------------|----------------------------------|-------------|-------------|-----------|--------------|
|                 | <b>pH 7.2</b> | <i>Controle, Baixa</i>           | 1,59        | 0,13        | 23        | 0,154        |
|                 |               | <b><i>Controle, Moderada</i></b> | <b>2,88</b> | <b>0,05</b> | <b>16</b> | <b>0,039</b> |
|                 |               | <b><i>Controle, Alta</i></b>     | <b>4,34</b> | <b>0,03</b> | <b>16</b> | <b>0,004</b> |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,40        | 0,85        | 16        | 0,705        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 0,14        | 0,92        | 24        | 0,882        |
|                 |               | <i>Moderada, Alta</i>            | 1,48        | 0,24        | 13        | 0,182        |
|                 | <b>pH 7.6</b> | <i>Controle, Baixa</i>           | 0,90        | 0,44        | 18        | 0,392        |
|                 |               | <i>Controle, Moderada</i>        | 1,06        | 0,45        | 12        | 0,33         |
|                 |               | <i>Controle, Alta</i>            | 0,35        | 0,74        | 14        | 0,742        |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,05        | 1,00        | 14        | 0,958        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 0,64        | 0,56        | 15        | 0,584        |
|                 |               | <i>Moderada, Alta</i>            | 0,72        | 0,58        | 14        | 0,499        |
| <b>Tempo 14</b> | <b>pH 6.8</b> | <i>Controle, Baixa</i>           | 0,53        | 0,70        | 20        | 0,596        |
|                 |               | <i>Controle, Moderada</i>        | 1,05        | 0,37        | 16        | 0,321        |
|                 |               | <i>Controle, Alta</i>            | 0,73        | 0,54        | 13        | 0,48         |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,07        | 0,95        | 21        | 0,943        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 0,20        | 0,91        | 19        | 0,853        |
|                 |               | <i>Moderada, Alta</i>            | 0,67        | 0,55        | 11        | 0,524        |
|                 | <b>pH 7.2</b> | <b><i>Controle, Baixa</i></b>    | <b>2,32</b> | <b>0,08</b> | <b>17</b> | <b>0,047</b> |
|                 |               | <b><i>Controle, Moderada</i></b> | <b>3,44</b> | <b>0,06</b> | <b>14</b> | <b>0,013</b> |
|                 |               | <b><i>Controle, Alta</i></b>     | <b>3,60</b> | <b>0,03</b> | <b>23</b> | <b>0,011</b> |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 1,31        | 0,27        | 13        | 0,232        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 1,86        | 0,13        | 15        | 0,100        |
|                 |               | <i>Moderada, Alta</i>            | 0,78        | 0,54        | 16        | 0,458        |
|                 | <b>pH 7.6</b> | <i>Controle, Baixa</i>           | 0,57        | 0,77        | 15        | 0,589        |
|                 |               | <i>Controle, Moderada</i>        | 0,10        | 1,00        | 11        | 0,919        |
|                 |               | <b><i>Controle, Alta</i></b>     | <b>3,06</b> | <b>0,05</b> | <b>7</b>  | <b>0,029</b> |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,50        | 0,76        | 18        | 0,651        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 2,11        | 0,09        | 23        | 0,075        |
|                 |               | <b><i>Moderada, Alta</i></b>     | <b>2,76</b> | <b>0,06</b> | <b>18</b> | <b>0,030</b> |
| <b>Tempo 21</b> | <b>pH 6.8</b> | <i>Controle, Baixa</i>           | 2,19        | 0,05        | 35        | 0,078        |
|                 |               | <i>Controle, Moderada</i>        | 1,58        | 0,16        | 32        | 0,173        |
|                 |               | <i>Controle, Alta</i>            | 1,76        | 0,13        | 21        | 0,132        |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 1,13        | 0,34        | 31        | 0,315        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 1,39        | 0,19        | 20        | 0,209        |
|                 |               | <i>Moderada, Alta</i>            | 0,23        | 0,82        | 14        | 0,832        |
|                 | <b>pH 7.2</b> | <i>Controle, Baixa</i>           | 0,61        | 0,63        | 22        | 0,565        |
|                 |               | <i>Controle, Moderada</i>        | 0,54        | 0,58        | 34        | 0,621        |
|                 |               | <i>Controle, Alta</i>            | 1,83        | 0,20        | 31        | 0,106        |
|                 |               | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,16        | 0,91        | 26        | 0,904        |
|                 |               | <i>Baixa, Alta</i>               | 1,61        | 0,27        | 21        | 0,179        |
|                 |               | <i>Moderada, Alta</i>            | 2,26        | 0,03        | 31        | 0,079        |

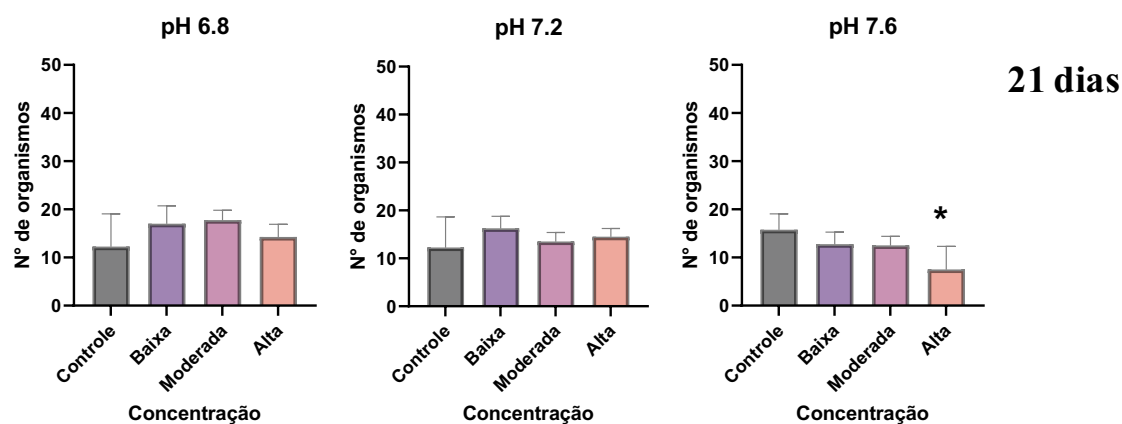
**Tabela 8.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração de Pb e pH sobre o tamanho populacional de náuplios de *Nitokra* sp, comparando os níveis do fator “Concentração” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

|               |                           |             |             |           |              |
|---------------|---------------------------|-------------|-------------|-----------|--------------|
| <b>pH 7.6</b> | <i>Controle, Baixa</i>    | <i>0,35</i> | <i>0,78</i> | 22        | <i>0,733</i> |
|               | <i>Controle, Moderada</i> | <i>0,52</i> | <i>0,71</i> | 23        | <i>0,63</i>  |
|               | <i>Controle, Alta</i>     | <i>2,16</i> | <i>0,10</i> | 32        | <i>0,07</i>  |
|               | <i>Baixa, Moderada</i>    | <i>1,48</i> | <i>0,20</i> | 24        | <i>0,185</i> |
|               | <i>Baixa, Alta</i>        | <i>2,28</i> | <i>0,09</i> | 35        | <i>0,061</i> |
|               | <i>Moderada, Alta</i>     | <b>3,40</b> | <b>0,04</b> | <b>30</b> | <b>0,013</b> |

A figura 4 apresenta os resultados de número de copepoditos de *Nitokra* sp. em função da concentração de Pb, pH e tempo de exposição.



**Figura 4.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida copepodito. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.



**Figura 4.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida copepodito. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.

Através da análise PERMANOVA identificou-se, no teste principal (*main test*), efeito significativo das variáveis independentes Tempo e Concentração isoladas (Tabela 9) sobre o tamanho populacional dos copepoditos de *Nitokra* sp. Já na análise de interação, assim como aconteceu para náuplios, para copepoditos também houve interação entre as variáveis Concentração e pH e as variáveis Tempo, Concentração e pH. Novamente serão apresentados e discutidos apenas os testes pareados da interação trifatorial.

**Tabela 9.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração de Pb e pH e interações sobre o tamanho populacional de copepoditos de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

| Teste                                  | df        | SS             | MS             | Pseudo-F      | P(perm)      |
|--|-----------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| <b>Tempo</b>                           | <b>2</b>  | <b>5,208E5</b> | <b>2,604E5</b> | <b>522,21</b> | <b>0,001</b> |
| <b>Concentração (Co)</b>               | <b>3</b>  | <b>4159,5</b>  | <b>1386,5</b>  | <b>2,7801</b> | <b>0,042</b> |
| pH                                     | 2         | 2950,9         | 1475,4         | 2,9584        | 0,065        |
| Tempo (interação com Co)               | 6         | 4802,6         | 800,44         | 1,605         | 0,151        |
| Tempo (interação com pH)               | 4         | 4349,7         | 1087,4         | 2,1804        | 0,062        |
| <b>Concentração (interação com pH)</b> | <b>6</b>  | <b>7805,8</b>  | <b>1301</b>    | <b>2,6086</b> | <b>0,021</b> |
| <b>Tempo (interação com Co e pH)</b>   | <b>12</b> | <b>11578</b>   | <b>964,84</b>  | <b>1,9346</b> | <b>0,04</b>  |

Nos testes pareados para o estágio de vida Copepodito, observou-se diferenças significativas entre o Controle de Pb as concentrações Moderada ( $p= 0,029$ ) e Alta ( $p= 0,003$ ) no sétimo dia no pH 7.2. Em ambos os tratamentos fortificados com Pb, a população era maior do que no Controle.

No décimo quarto dia observaram-se diferenças entre as concentrações Controle e Baixa ( $p = 0,037$ ) e Controle e Moderada ( $p = 0,05$ ) no pH 6.8, e novamente entre as concentrações Controle e Baixa ( $p = 0,001$ ) e Controle e Alta ( $p = 0,001$ ) no pH 7.2.. Novamente, as subamostragens dos tratamentos fortificados com chumbo continham um número de indivíduos maior do que no Controle. No entanto, no 21º dia, o número de copepoditos na concentração Alta de Pb foi significativamente menor do que no controle, no pH 7.6 ( $p = 0,022$ ).

**Tabela 10.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração e pH sobre o tamanho populacional de copepoditos de *Nitokra* sp, comparando os níveis do fator “Concentração de Pb” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

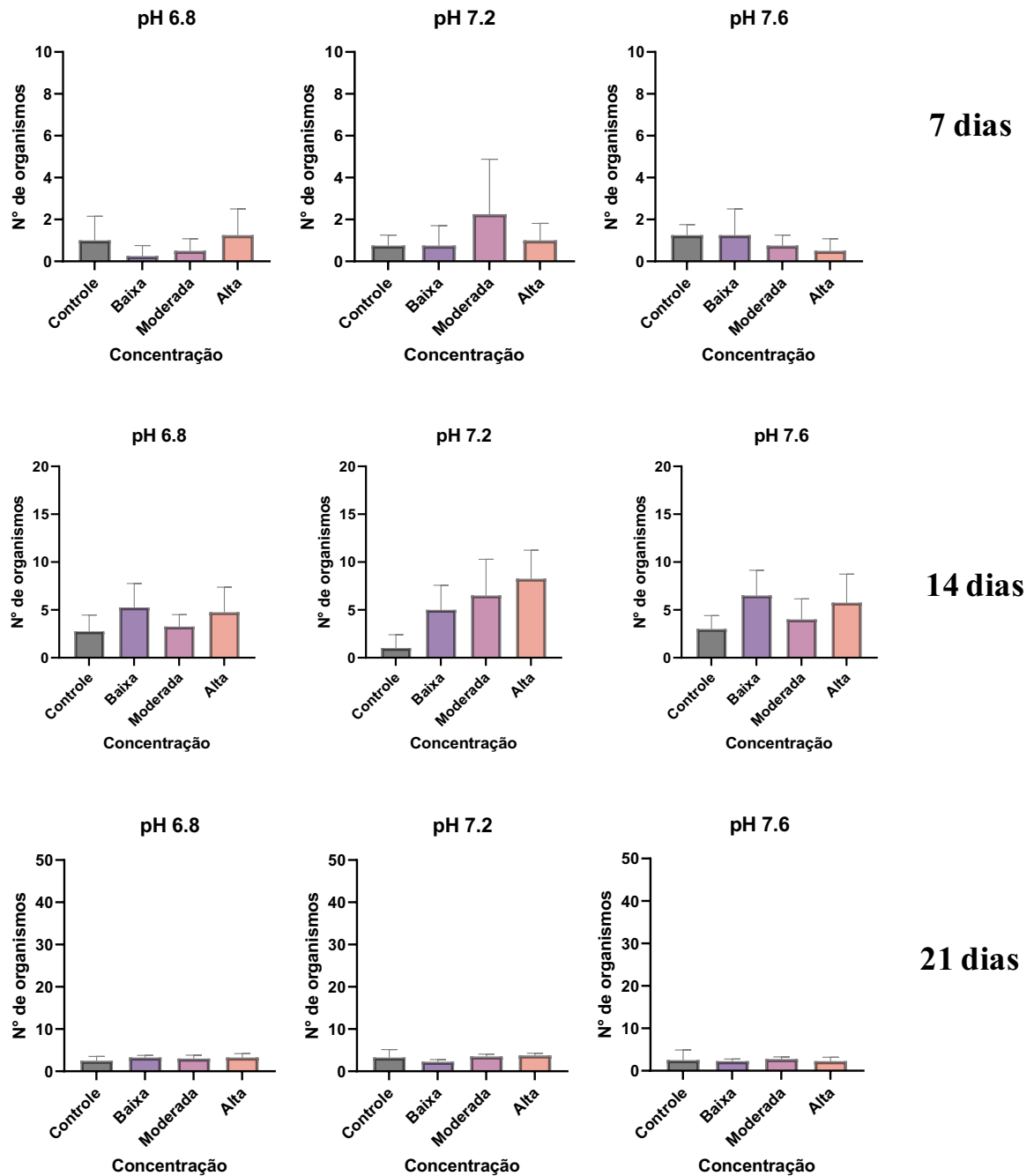
| <i>Nível tempo</i> | <i>Nível pH</i> | <i>Comparação pareada</i>        | <i>t</i>    | <i>P(perm)</i> | <i>Unique perms</i> | <i>P(MC)</i> |
|--------------------|-----------------|----------------------------------|-------------|----------------|---------------------|--------------|
| <b>Tempo 7</b>     | <b>pH 6.8</b>   | <i>Controle, Baixa</i>           | 2,34        | 0,06           | 13                  | 0,058        |
|                    |                 | <i>Controle, Moderada</i>        | 0,68        | 0,59           | 8                   | 0,509        |
|                    |                 | <i>Controle, Alta</i>            | 1,69        | 0,19           | 9                   | 0,151        |
|                    |                 | <b><i>Baixa, Moderada</i></b>    | <b>2,46</b> | <b>0,09</b>    | <b>15</b>           | <b>0,042</b> |
|                    |                 | <i>Baixa, Alta</i>               | 0,98        | 0,46           | 11                  | 0,375        |
|                    |                 | <i>Moderada, Alta</i>            | 1,86        | 0,18           | 11                  | 0,122        |
|                    | <b>pH 7.2</b>   | <i>Controle, Baixa</i>           | 1,88        | 0,16           | 10                  | 0,120        |
|                    |                 | <b><i>Controle, Moderada</i></b> | <b>2,88</b> | <b>0,03</b>    | <b>10</b>           | <b>0,029</b> |
|                    |                 | <b><i>Controle, Alta</i></b>     | <b>4,63</b> | <b>0,04</b>    | <b>6</b>            | <b>0,003</b> |
|                    |                 | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,36        | 0,78           | 19                  | 0,745        |
|                    |                 | <i>Baixa, Alta</i>               | 618,98      | 1,00           | 10                  | 0,963        |
|                    |                 | <i>Moderada, Alta</i>            | 0,45        | 0,80           | 10                  | 0,674        |
|                    | <b>pH 7.6</b>   | <i>Controle, Baixa</i>           | 2,21        | 0,08           | 12                  | 0,077        |
|                    |                 | <i>Controle, Moderada</i>        | 2,31        | 0,08           | 9                   | 0,052        |
|                    |                 | <i>Controle, Alta</i>            | 0,94        | 0,45           | 11                  | 0,402        |
|                    |                 | <i>Baixa, Moderada</i>           | 0,58        | 0,65           | 13                  | 0,581        |
|                    |                 | <i>Baixa, Alta</i>               | 0,86        | 0,38           | 11                  | 0,421        |
|                    |                 | <i>Moderada, Alta</i>            | 1,23        | 0,31           | 13                  | 0,259        |



|                 |               |                           |             |             |           |              |
|-----------------|---------------|---------------------------|-------------|-------------|-----------|--------------|
| <b>Tempo 14</b> | <b>pH 6.8</b> | <b>Controle, Baixa</b>    | <b>2,55</b> | <b>0,05</b> | <b>18</b> | <b>0,037</b> |
|                 |               | <b>Controle, Moderada</b> | <b>2,21</b> | <b>0,09</b> | <b>22</b> | <b>0,056</b> |
|                 |               | Controle, Alta            | 1,62        | 0,17        | 20        | 0,146        |
|                 |               | Baixa, Moderada           | 0,00        | 1,00        | 17        | 1,000        |
|                 |               | Baixa, Alta               | 0,68        | 0,54        | 17        | 0,526        |
|                 |               | Moderada, Alta            | 0,61        | 0,54        | 19        | 0,542        |
|                 | <b>pH 7.2</b> | <b>Controle, Baixa</b>    | <b>6,55</b> | <b>0,03</b> | <b>20</b> | <b>0,001</b> |
|                 |               | Controle, Moderada        | 2,25        | 0,03        | 22        | 0,076        |
|                 |               | <b>Controle, Alta</b>     | <b>6,67</b> | <b>0,02</b> | <b>18</b> | <b>0,001</b> |
|                 |               | Baixa, Moderada           | 0,04        | 1,00        | 19        | 0,970        |
|                 |               | Baixa, Alta               | 0,99        | 0,46        | 7         | 0,339        |
|                 |               | Moderada, Alta            | 0,34        | 0,80        | 18        | 0,731        |
|                 | <b>pH 7.6</b> | Controle, Baixa           | 0,49        | 0,49        | 18        | 0,630        |
|                 |               | Controle, Moderada        | -           | -           | -         | -            |
|                 |               | Controle, Alta            | 0,15        | 0,91        | 18        | 0,878        |
|                 |               | Baixa, Moderada           | 0,60        | 0,68        | 17        | 0,553        |
|                 |               | Baixa, Alta               | 0,71        | 0,63        | 14        | 0,503        |
|                 |               | Moderada, Alta            | 0,21        | 0,88        | 14        | 0,840        |
| <b>Tempo 21</b> | <b>pH 6.8</b> | Controle, Baixa           | 1,15        | 0,31        | 34        | 0,291        |
|                 |               | Controle, Moderada        | 1,54        | 0,17        | 31        | 0,173        |
|                 |               | Controle, Alta            | 0,47        | 0,74        | 35        | 0,648        |
|                 |               | Baixa, Moderada           | 0,43        | 0,65        | 32        | 0,703        |
|                 |               | Baixa, Alta               | 1,18        | 0,31        | 35        | 0,278        |
|                 |               | Moderada, Alta            | 2,20        | 0,06        | 26        | 0,070        |
|                 | <b>pH 7.2</b> | Controle, Baixa           | 1,27        | 0,22        | 31        | 0,264        |
|                 |               | Controle, Moderada        | 0,54        | 0,83        | 27        | 0,594        |
|                 |               | Controle, Alta            | 0,79        | 0,66        | 32        | 0,450        |
|                 |               | Baixa, Moderada           | 1,54        | 0,16        | 25        | 0,183        |
|                 |               | Baixa, Alta               | 1,16        | 0,38        | 23        | 0,304        |
|                 |               | Moderada, Alta            | 0,60        | 0,58        | 29        | 0,538        |
|                 | <b>pH 7.6</b> | Controle, Baixa           | 1,49        | 0,22        | 22        | 0,180        |
|                 |               | Controle, Moderada        | 1,72        | 0,14        | 30        | 0,126        |
|                 |               | <b>Controle, Alta</b>     | <b>2,86</b> | <b>0,06</b> | <b>32</b> | <b>0,022</b> |
|                 |               | Baixa, Moderada           | 0,08        | 0,91        | 29        | 0,936        |
|                 |               | Baixa, Alta               | 1,95        | 0,15        | 33        | 0,102        |
|                 |               | Moderada, Alta            | 2,01        | 0,12        | 32        | 0,077        |

**Tabela 10.** Resultados do teste pareado de PERMANOVA da interação entre Tempo, Concentração e pH sobre o tamanho populacional de copepoditos de *Nitokra* sp, comparando os níveis do fator “Concentração de Pb” nos níveis de Tempo 7, 14 e 21 dias. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

A figura 5 apresenta os resultados de número de adultos de *Nitokra* sp. em função da concentração de Pb, pH e tempo de exposição.



**Figura 5.** Médias e desvio padrão das sub amostragens de 10 mL do volume total do meio experimental realizadas em sete, quatorze e vinte e um dias a partir do início do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente para o estágio de vida adulto. Os asteriscos representam diferenças dos tratamentos fortificados com Pb em relação ao controle de contaminação, ou entre níveis de Pb, quando indicado na figura.

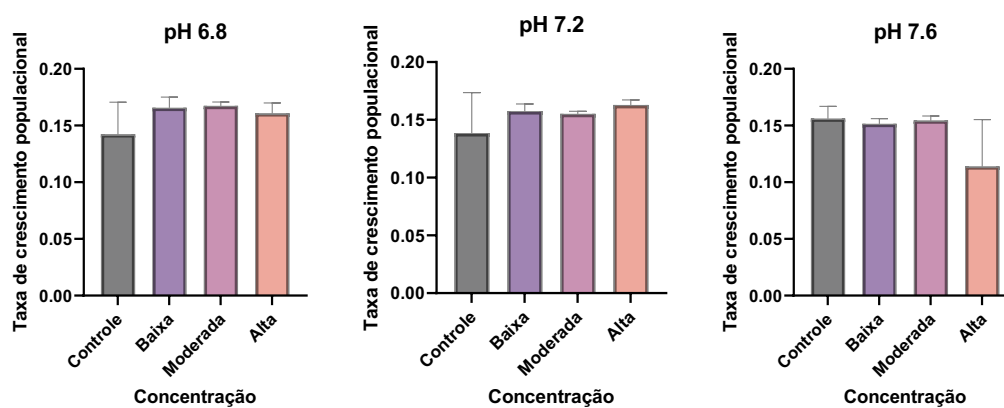
Através da análise PERMANOVA identificou-se, no teste principal (*main test*), efeito significativo das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH isoladas (Tabela 11) sobre o tamanho populacional dos adultos de *Nitokra* sp. Já na análise de interação, houve interação entre as variáveis Tempo e Concentração, Tempo e pH e Concentração e pH.

**Tabela 11.** Resultados do *Main-test* de PERMANOVA para avaliação do efeito das variáveis independentes Tempo, Concentração e pH e interações sobre o tamanho populacional de adultos de *Nitokra* sp. Os valores em negrito indicam  $p < 0,05$ .

| Teste                                  | df | SS     | MS     | Pseudo-F | P(perm)      |
|--|----|--------|--------|----------|--------------|
| <i>Tempo</i>                           | 2  | 17752  | 8876,1 | 438,38   | <b>0,001</b> |
| <i>Concentração</i>                    | 3  | 545,58 | 181,86 | 8,9817   | <b>0,001</b> |
| <i>pH</i>                              | 2  | 214,18 | 107,09 | 5,289    | <b>0,003</b> |
| <i>Tempo (interação com Co)</i>        | 6  | 543,74 | 90,623 | 4,4757   | <b>0,001</b> |
| <i>Tempo (interação com pH)</i>        | 4  | 518,44 | 129,61 | 6,4013   | <b>0,001</b> |
| <i>Concentração (interação com pH)</i> | 6  | 302,82 | 50,47  | 2,4926   | <b>0,027</b> |
| <i>Tempo (interação com Co e pH)</i>   | 12 | 271,06 | 22,588 | 1,1156   | 0,372        |

### 3.4 Efeito do pH e concentração de Pb sobre a taxa de crescimento populacional de *Nitokra* sp.

A partir do tamanho populacional inicial e final, foi calculada a taxa de crescimento populacional ( $r$ ) para o tempo de exposição (21 dias).



**Figura 6.** Médias e desvio padrão das taxas de crescimento populacional do ensaio nos tratamentos Controle, Concentração de Chumbo Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L) no pH 6.8, pH 7.2 e pH 7.6 respectivamente.

### 3.5 Sistema carbonato

Os valores para a especiação do sistema carbonato estão representados na Tabela 12. A Alcalinidade Total dos sistemas teste aumentou conforme a concentração aumentava nos primeiros sete dias em todos os níveis de pH testados. Nos demais dias de subamostragem, a Alcalinidade Total seguiu o mesmo padrão independente da faixa de pH e Pb testados. Das espécies do sistema carbonato que compreendem o CIT, foi observado o mesmo padrão na análise do bicarbonato ( $\text{CO}_3^{2+}$ ).

| <b>Organismo teste: Nitokra sp.</b> | <b>Matrix</b> | <b>pH (tratamento)</b> | <b>Nível de Pb (mg/L)</b> | <b>TA (μmol/kg)</b> | <b>TIC (μmol/L)</b> | <b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (μmol/kg)</b> | <b>CO<sub>3</sub><sup>2+</sup> (μmol/kg)</b> | <b>CO<sub>2</sub> (μmol/kg)</b> | <b>Ω Ca</b> | <b>Ω Ar</b> | <b>pH</b> |
|-------------------------------------|---------------|------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|--|--|---------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| 7 dias                              | Água          | 6.8                    | Controle                  | 450,0               | 4161,0              | 458,9  | 0,0320                                       | 3702,079                        | 0,00        | 0,00        | 4.161     |
|                                     |               |                        | Baixa                     | 449,0               | 4065,0              | 457,7  | 0,0326                                       | 3607,304                        | 0,00        | 0,00        | 4.065     |
|                                     |               |                        | Moderada                  | 1310,0              | 375,0               | 45,9   | 329,08                                       | 0,004                           | 0,01        | 0,01        | 3.75      |
|                                     |               |                        | Alta                      | 1290,0              | 3755,0              | 1291,2                                       | 0,3809                                       | 2463,412                        | 0,01        | 0,01        | 3.755     |
|                                     |               | 7.2                    | Controle                  | 466,0               | 4001,0              | 474,2  | 0,0359                                       | 3526,772                        | 0,00        | 0,00        | 4.001     |
|                                     |               |                        | Baixa                     | 450,0               | 4092,0              | 458,8  | 0,0327                                       | 3633,211                        | 0,00        | 0,00        | 4.092     |
|                                     |               |                        | Moderada                  | 1310,0              | 4050,0              | 1311,5                                       | 0,3595                                       | 2738,136                        | 0,01        | 0,01        | 4.050     |
|                                     |               |                        | Alta                      | 1320,0              | 3733,0              | 1034,1                                       | 46,163                                       | 2652,756                        | 0,00        | 0,00        | 3.733     |
|                                     |               | 7.6                    | Controle                  | 436,0               | 4125,0              | 445,3  | 0,0308                                       | 3679,658                        | 0,00        | 0,00        | 4.125     |
|                                     |               |                        | Baixa                     | 458,0               | 3959,0              | 466,3  | 0,0351                                       | 3492,712                        | 0,00        | 0,00        | 3.959     |
|                                     |               |                        | Moderada                  | 1460,0              | 3480,0              | 1460,1                                       | 0,5933                                       | 2019,272                        | 0,02        | 0,01        | 3.480     |
|                                     |               |                        | Alta                      | 1370,0              | 3880,0              | 1371,0                                       | 0,4210                                       | 2508,550                        | 0,01        | 0,01        | 3.880     |
| 14 dias                             | Água          | 6.8                    | Controle                  | 1370,0              | 4125,0              | 1371,3                                       | 0,3883                                       | 2753,279                        | 0,01        | 0,01        | 4.125     |
|                                     |               |                        | Baixa                     | 1130,0              | 4140,0              | 1132,4                                       | 0,2441                                       | 3007,340                        | 0,01        | 0,00        | 4.140     |
|                                     |               |                        | Moderada                  | 1320,0              | 3605,0              | 1320,9                                       | 0,4322                                       | 2283,668                        | 0,01        | 0,01        | 3.605     |
|                                     |               |                        | Alta                      | 1250,0              | 3777,0              | 1251,4                                       | 0,3502                                       | 2525,242                        | 0,01        | 0,01        | 3.777     |
|                                     |               | 7.2                    | Controle                  | 1110,0              | 4106,0              | 1112,5                                       | 0,2358                                       | 2993,302                        | 0,01        | 0,00        | 4.106     |
|                                     |               |                        | Baixa                     | 1760,0              | 3399,0              | 1758,6                                       | 1,0779                                       | 1639,363                        | 0,03        | 0,02        | 3.399     |
|                                     |               |                        | Moderada                  | 1160,0              | 4118,0              | 1162,2                                       | 0,2603                                       | 2955,507                        | 0,01        | 0,00        | 4.118     |
|                                     |               |                        | Alta                      | 1360,0              | 3849,0              | 1361,0                                       | 0,4191                                       | 2487,547                        | 0,01        | 0,01        | 3.849     |
|                                     |               | 7.6                    | Controle                  | 1370,0              | 3500,0              | 1370,6                                       | 0,5050                                       | 2128,943                        | 0,01        | 0,01        | 3.500     |
|                                     |               |                        | Baixa                     | 1230,0              | 3930,0              | 1231,7                                       | 0,3213                                       | 2697,978                        | 0,01        | 0,01        | 3.930     |
|                                     |               |                        | Moderada                  | 1170,0              | 3956,0              | 1172,0                                       | 0,2824                                       | 2783,713                        | 0,01        | 0,00        | 3.956     |
|                                     |               |                        | Alta                      | 1330,0              | 4001,0              | 1331,4                                       | 0,3801                                       | 2669,257                        | 0,01        | 0,01        | 4.001     |

|         |      |          |          |        |        |        |          |          |      |       |       |
|---------|------|----------|----------|--------|--------|--------|----------|----------|------|-------|-------|
| 21 dias | Água | 6.8      | Controle | 1280,0 | 4080,0 | 1281,6 | 0,3207   | 2798,111 | 0,01 | 0,01  | 4.080 |
|         |      |          | Baixa    | 1220,0 | 4100,0 | 1221,8 | 0,2834   | 2877,878 | 0,01 | 0,00  | 4.100 |
|         |      |          | Moderada | 1310,0 | 3911,0 | 1311,3 | 0,3632   | 2599,373 | 0,01 | 0,01  | 3.911 |
|         |      |          | Alta     | 1210,0 | 4000,0 | 1211,8 | 0,2882   | 2787,940 | 0,01 | 0,00  | 4.000 |
|         | 7.2  | Controle | 1290,0   | 4050,0 | 1291,5 | 0,3320 | 2758,164 | 0,01     | 0,01 | 4.050 |       |
|         |      | Baixa    | 1380,0   | 4110,0 | 1381,2 | 0,3820 | 2728,412 | 0,01     | 0,01 | 4.110 |       |
|         |      | Moderada | 1290,0   | 4029,0 | 1291,5 | 0,3357 | 2737,177 | 0,01     | 0,01 | 4.029 |       |
|         |      | Alta     | 1260,0   | 3759,0 | 1261,3 | 0,3480 | 2497,372 | 0,01     | 0,01 | 3.759 |       |
|         | 7.6  | Controle | 1750,0   | 4017,0 | 1749,7 | 0,7442 | 2266,589 | 0,02     | 0,01 | 4.017 |       |
|         |      | Baixa    | 1270,0   | 3885,0 | 1271,4 | 0,3379 | 2613,275 | 0,01     | 0,01 | 3.885 |       |
|         |      | Moderada | 2410,0   | 4571,0 | 2407,6 | 1,4871 | 2161,873 | 0,04     | 0,02 | 4.571 |       |
|         |      | Alta     | 1780,0   | 3705,0 | 1779,1 | 0,9134 | 1925,031 | 0,03     | 0,02 | 3.705 |       |

**Tabela 12.** Especificação do sistema carbonato em cenário de acidificação e contaminação por Pb. Alcalinidade total (AT), Carbono inorgânico total (TIC), bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonato ( $\text{CO}_3^{2+}$ ), estado de saturação de calcita ( $\Omega$  Ca), estado de saturação para aragonita ( $\Omega$  Ar). Controle (0,0 mg/L), Baixa (0,001 mg/L), Moderada (0,01 mg/L) e Alta (0,1 mg/L).

#### 4. DISCUSSÃO

De forma geral, observa-se no presente estudo um efeito do tempo sobre o tamanho populacional de *Nitokra* sp., sem interação com concentração de Pb ou pH, sendo que há crescimento populacional entre os dias 7 e 14, seguido de uma queda entre os dias 14 e 21. Pode-se ainda observar em nosso estudo um efeito interativo entre concentração de Pb e pH, sendo que em concentrações mais altas de Pb o tamanho populacional de *Nitokra* sp. foi menor, mas apenas em pHs mais altos. Em tratamentos acidificados o efeito do metal foi incrementador, independente do estágio de vida, podendo diferentes mecanismos explicar este padrão.

Sobre a variação do tamanho populacional em função do tempo, os resultados do presente estudo estão em acordo com o clássico modelo de crescimento populacional de Verhulst (1838), que descreve que o crescimento populacional inicial não se mantém indefinidamente, dado que em determinado momento a população atingiria um nível de saturação e oscilaria em torno de um limite numérico no tamanho populacional. Uma oscilação natural semelhante do ciclo da população nos sistemas experimentais já foi observada em estudos anteriores do grupo (Ferrari, 2018).

Dentro dos limites deste crescimento, a densidade populacional variou entre os tratamentos de tal forma que foi possível detectar estatisticamente um efeito do pH sobre a toxicidade do metal. Em todos os níveis de pH acidificados testados observou-se um aumento significativo da densidade populacional em boa parte dos tratamentos enriquecidos com chumbo. Em estudos anteriores com metais, inseticidas e radiação, foi observada uma resposta incrementadora na prole e na produção de ovos de microartrópodes a partir da exposição às substâncias tóxicas, conhecida como efeito de

hormese (Calabrese e Baldwin, 1999). Esse efeito, que foi amplamente documentado em estudos toxicológicos, corresponde a um conjunto de respostas adaptativas dos sistemas biológicos a desafios ambientais ou internos de pequena e moderada dimensão (Jones et al., 2013). Esse conjunto de respostas fisiológicas a uma demanda estressora pode fazer com que o organismo retorne ou não a homeostase. A hormese difere dependendo do nível de estresse, por exemplo: no caso de aumento da produção de náuplios entre pH 7.6 e pH 7.8, uma resposta de dose bifásica adaptativa em que o comportamento fisiológico compensatório segue uma ruptura inicial da homeostase (Calabrese, 2008; Lefcort et al., 2008).

O termo hormesis acabou caindo em desuso por conta de uma falta de acordo sobre sua definição, sendo encontrado em diversos artigos como “respostas em forma de U” - crescimento acentuado inicial, seguido por queda da população e em seguida outra faixa de crescimento expressivo -, “bifásicas” e/ou “estimulatórias”. No entanto, respostas estimulatórias em exposições a baixas concentrações são conhecidas por sua ocorrência em diversos modelos biológicos e com diversos agentes químicos, fornecendo evidências substanciais de que o fenômeno é real, reproduzível e, em estudos delineados corretamente, mais comum do que outros modelos tradicionais de dose-resposta (p.ex.: curva sigmoide) (Calabrese, 2005).

Uma resposta estimulatória já observada por Matouke & Mustapha (2018) foi a indução do aumento de carboidratos, lipídios, GPx e CAT devido ao estresse gerado em copépodes *Eucyclop* sp. pela co-exposição a NPs de TiO<sub>2</sub> e Pb, que inibiam a ingestão e filtração de microalgas pelos organismos, conseqüentemente causando um efeito estimulatório em nível populacional.

Também a acidificação pode provocar resposta semelhante ao efeito de hormese, como observado por Fitzer et al. (2012), em cujo estudo houve um padrão de aumento da



produção naupliar de *T. battagliai* em condições de pH mais ácido. Trazendo para o cenário dos testes realizados, a população de *Nitokra* sp. pode ter apresentado comportamento fisiológico compensatório e/ou tolerância a condições mais severas, como o pH mais ácido, já que, em um mesmo nível de exposição ao Pb (“alta”, 0.1mg/L), a população no pH 6.8 foi maior em comparação aos tratamentos de pH 7.6, onde observou-se um padrão monotônico de aumento da população total a medida que a concentração de chumbo aumenta. A população no pH 6.8 também foi maior em comparação ao pH 7.2, embora não estatisticamente significativo. No pH 7.6, ainda que sem significância estatística ( $p = 0,051$ ) por uma diferença mínima, observou-se que, o número de náuplios diminui na maior concentração.

Observar o crescimento da população ao longo do tempo pode ser útil para interpretar como um contaminante está agindo no desenvolvimento dos diferentes estágios de vida. Em estudo com o copépode harpacticoide *B. zschokkei*, Brown et al. (2003) observaram que a população era sensível ao contaminante (lindano) em um teste de ciclo de vida, no qual também foi possível destacar uma resposta sutil de hormese na produção de descendentes através da curva de dose-resposta.

Além de a acidificação induzida por CO<sub>2</sub> e a exposição ao Pb poderem ter provocado uma resposta de hormese em *Nitokra* sp., o que resultaria no aumento populacional observado nas exposições ao Pb em pHs mais ácidos, estudos pretéritos com biofilme sugerem que em pHs mais ácidos ocorre menor internalização de metais por uma ação protetiva de prótons. A partição de metais entre sedimento e água é influenciada pelo pH (Riba et al., 2004), conseqüentemente influenciando na composição dos íons metálicos nas partículas através da alteração das características de adsorção das partículas do sedimento (Turner & Rawling, 2001). Portanto, concentração, reatividade química e padrões de distribuição de contaminantes traços ligados a sedimentos aquáticos,

especialmente em estuários, são afetados por essa interação complexa de fatores (Riba et al., 2016). Apesar do teste ter sido realizado apenas em solução aquosa, sem a presença do sedimento, tais resultados indicam implicações na contaminação dos organismos.

Laderriere et al. (2021) observaram que o biofilme acumulou menos metais em pH próximo a 6.0 do que em pH mais alto. Similarmente, De Schamphelaere (2014) observou que um pH mais baixo serviu como proteção contra a toxicidade do chumbo para a microalga *P. subcapitata*. Em outro estudo, houve redução do acúmulo de Pb em larvas de *zebrafish* conforme cresciam as concentrações de  $H^+$  no meio experimental (Gao et al., 2015). Com moluscos foi observado que a acidificação aumenta a concentração de diversos metais no sedimento estuarino, entre eles o chumbo, mas reduz sua disponibilidade aos organismos, possivelmente pela competição dos metais com outros constituintes da água (Riba et al., 2004).

Por possuírem mobilidade limitada, as espécies bentônicas podem estar mais expostas e vulneráveis em ecossistemas costeiros (Riba et al., 2016), mas podem resistir a fatores como a acidificação no seu estágio adulto aumentando a taxa de calcificação (Wood et al, 2008), por exemplo. No presente estudo, os tratamentos fortificados com chumbo continham um número de indivíduos, em diferentes estágios de vida, maior do que no Controle de Pb, nos níveis de pH 6.8 e 7.2.

No entanto, no pH mais alto (7.6), o número de náuplios, copepoditos e o tamanho populacional total na concentração Alta de Pb foi significativamente menor do que no Controle (ou na concentração Baixa de Pb), sugerindo que o Pb, na concentração mais alta testada, tenha sido tóxico para *Nitokra* sp. em nível populacional. Isso pode ter ocorrido em consequência de uma menor competição de cátions, que desempenha um papel importante na acumulação de metais (Campbell, 1995) podendo ter como resposta um acúmulo do metal nos organismos (Feng, 2018) e consequente redução na taxa de

crescimento populacional. Dupont et al. (2010) e Halsband e Kurihara (2013) demonstraram que moluscos em seus estágios mais iniciais, como gametas, embriões e estágios larvais, podem tolerar tais situações estressoras com menor intensidade, perturbando a estabilidade da população durante eventos de pH acidificado.

Um aumento da população em consequência da exposição a algum estressor não necessariamente significa um resultado “positivo” em longo prazo. O estresse moderado pode ter estimulado a reprodução dos organismos e não comprometido completamente a fisiologia deles, mas em um estudo com *C. cornuta*, Gusso-Choueri (2012) demonstrou que a exposição ao cobre na dieta resultou em efeitos estimulantes na população. Entretanto, assim como em nosso estudo, não se observou o tamanho e/ou a viabilidade dos organismos recém-nascidos, não podendo ser avaliado o efeito no estado de saúde dos descendentes. Pode-se apenas afirmar que houve a produção de mais descendentes em ambiente estressado.

Provavelmente, as concentrações mais elevadas de chumbo podem ser eficazes na indução de mecanismos de depuração, reduzindo significativamente a concentração do metal livre dentro do organismo. Em crustáceos, onde a carapaça é um local de depósito relevante para o chumbo, a eliminação do metal ocorre junto com a muda (du Preez et al., 1993, Amin et al., 2003).

Os resultados no estágio de vida Adulto corroboram os resultados de náuplios e copepoditos, de que a contaminação pode ter incrementado o crescimento populacional. No momento inicial de estresse, as fêmeas podem ter eclodido seus ovos mais rapidamente, o que tornou possível os náuplios chegarem a fase adulta a tempo da terceira subamostragem. Os náuplios podem ter acumulado o chumbo assim como no estudo com *Artemia salina* (Chen et al., 1987), onde o acúmulo de metais, dentre eles o Pb, aconteceu conforme a concentração aumentou após 48 horas de exposição.

De fato, com clareza estatística, o efeito do chumbo de diminuição da população de *Nitokra* sp. aparece na exposição à mais alta concentração (0.1mg/L) no pH 7.6, em comparação às exposições em pHs mais ácidos (i.e. 6.8 e 7.2).

## 5. CONCLUSÃO

- Houve efeito interativo do pH e do Pb, ou seja, o efeito do Pb foi dependente do pH de exposição, e vice-versa, o efeito do pH foi dependente da concentração de Pb;
- Exposição ao Pb provocou um efeito quase generalizado de aumento da população de *Nitokra* sp. nos pHs mais ácidos (6.8 e 7.2),;
- No pH mais alto (7.6), foi observada menor população de *Nitokra* sp. na mais alta concentração de Pb (0.1mg/L), seja em comparação ao controle (no mesmo pH), seja em comparação às populações expostas aos pHs mais baixos, possivelmente porque em pHs mais ácidos os íons H<sup>+</sup> apresentaram um efeito protetivo em relação ao Pb.

## BIBLIOGRAFIA

American Cancer Society. Known and probable human carcinogens. The American Cancer Society, Atlanta, 08 de julho de 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/healthy/cancer-causes/general-info/known-and-probable-human-carcinogens.html>. Acesso em 07 de dezembro de 2022.

ABNT NBR 16723 - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2020) Ecotoxicologia aquática - Método de ensaio com copépodos marinhos (Copepoda, Crustacea). Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro.

Act, Canadian Environmental Protection, and C. A. S. Pentafluoroethane. "Canadian Environmental Protection Act." (1999).

Alheit J, Bakun A (2010) Population synchronies within and between ocean basins: apparent teleconnections and implications as to physical-biological linkage mechanisms. *Journal of Marine Systems*, 79, 267–285.

Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 32e46.

Anderson M.J., Gorley R.N. & Clarke K.R. 2008. PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E: Plymouth, UK.

Barka, S., J-F. Pavillon, and J-C. Amiard. "Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128.4 (2001): 479-493.

Beaugrand G, Edwards M, Brander K, Luczak C, Ibanez F (2008) Causes and projections of abrupt climate-driven ecosystem shifts in the North Atlantic. *Ecology letters*, 11, 1157–1168.

Bergstrom, Ellie. "Efeitos do aumento da temperatura e acidificação oceânica na fisiologia das algas calcárias e gramas marinhas." (2016).

Bielmyer, Gretchen K., Martin Grosell, and Kevin V. Brix. "Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet." *Environmental science & technology* 40.6 (2006): 2063-2068.

Bron, James E., et al. "Observing copepods through a genomic lens." *Frontiers in zoology* 8.1 (2011): 1-15.

Brown, R. J., et al. "A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane." *Aquatic toxicology* 63.1 (2003): 1-11.

Bruland, Kenneth W., John R. Donat, and David A. Hutchins. "Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters." *Limnology and Oceanography* 36.8 (1991): 1555-1577.

Calabrese, Edward J. "Paradigm lost, paradigm found: the re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences." *Environmental pollution* 138.3 (2005): 378-411.

Calabrese, Edward J., Linda A. Baldwin, and Charles D. Holland. "Hormesis: a highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment." *Risk Analysis* 19.2 (1999): 261-281.

Calabrese, E.J., 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1451–1474

Chen, Jiann-Chu, and Ping-Chung Lru. "Accumulation of heavy metals in the nauplii of *Artemia salina*." *Journal of the World Aquaculture Society* 18.2 (1987): 84-93.

Crain, C. M., Kroeker, K. & Halpern, B. S. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315 (2008).

Cripps, G., Lindeque, P., Flynn, K.J., 2014. Have we been underestimating the effects of ocean acidification in zooplankton? *Global Change Biol.* 20, 3377-3385.

Crist, Ray H., et al. "Interactions of metals and protons with algae." *Environmental science & technology* 22.7 (1988): 755-760.

Dickson, A.G. Millero, F.J. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-sea. Res.* 34, 1733-1743.

Dupont S, Olga-Martínez O, Thorndyke M (2010) Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19:449–462

Du Preez, H. H., V. E. Steenkamp, and H. J. Schoonbee. "Bioaccumulation of zinc and lead in selected tissues and organs of the freshwater crab, *Potamonautes warreni*." *Science of the total environment* 134 (1993): 469-478.

Fabry, Victoria J., et al. "Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes." *ICES Journal of Marine Science* 65.3 (2008): 414-432.

Feng, Y. et al. 2009. Effects of increased pCO<sub>2</sub> and temperature on the North Atlantic spring bloom. I. The phytoplankton community and biogeochemical response. – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 388: 13 – 25.

Ferrari, A.B. (2018) Desenvolvimento de ferramenta de biomonitoramento baseada na avaliação de respostas populacionais do copépodo *Nitokra* sp. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Engenharia Ambiental, da Universidade Federal de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental, sob orientação de Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri. Insituto do Mar, Unifesp. 28p.

Fitzer, S.C., Caldwell, G.S., Close, A.J., Clare, A.S., Upstill-Goddard, R.C., Bentley, M.G., 2012. Ocean acidification induces multi-generational decline in copepod naupliar production with possible conflict for reproductive resource allocation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 418-419, 30-36.



Forbes, Valery E., and Peter Calow. "Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 357.1425 (2002): 1299-1306.

Francis RC, Hare SR, Hollowed AB, Wooster WS (1998) Effects of interdecadal climate variability on the oceanic ecosystems of the NE Pacific. *Fisheries Oceanography*, 7, 1–21.

Garzke, J., Hansen, T., Ismar, S.M.H., Sommer, U., 2016. Combined effects of ocean warming and acidification on copepod abundance, body size and fatty acid content. *PLoS One* 11, e0155952.

Gruber, N. Warming up, turning sour, losing breath: ocean biogeochemistry under global change. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 369, 1980–1996 (2011).

Guinotte, John M., and Victoria J. Fabry. "Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1134.1 (2008): 320-342.

Gusso-Choueri, Paloma Kachel, et al. "Effects of dietary copper on life-history traits of a tropical freshwater cladoceran." *Archives of environmental contamination and toxicology* 62.4 (2012): 589-598.

Gutowska, M. A., Melzner, F., Langerbuch, M., Bock, C., Claireaux, G., Pörtner, H. O. 2010. Acid-base regulatory ability of cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J. Comp. Physiol. B* v. 180, n. 3, p. 323-335.

Hall-Spencer, J. M. et al. 2008. Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. – *Nature* 454: 96 – 99.

Halsband C, Kurihara H (2013) Potential acidification impacts on zooplankton in CCS leakage scenarios. *Mar Pollut Bull* 73:495–503

Henson, S., Beaulieu, C., Ilyina, T. *et al.* Rapid emergence of climate change in environmental drivers of marine ecosystems. *Nat Commun* 8, 14682 (2017).

Hildebrandt, N., Niehoff, B., Sartoris, F.J., 2014. Long-term effects of elevated CO<sub>2</sub> and temperature on the Arctic calanoid copepods *Calanus glacialis* and *C. hyperboreus*. *Mar. Pollut. Bull.* 80, 59-70.

Hiscock, K. et al. 2004. Effect of changing temperature on benthic marine life in Britain and Ireland. – *Aquat. Conserv.* 14: 333 – 362.

International Organization for Standardization. Water Quality: Determination of Acute Lethal Toxicity to Marine Copepods (Copepoda, Crustacea). ISO, 1999.

IPCC, 2007. Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the 22*

Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon, S., D. et al. eds. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

IPCC, 2021: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, A. Pirani, S.L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M.I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T.K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu, and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press. In Press.

Jarup, L., 2003: Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 68: 167-182. [doi.org/10.1093/bmb/idg032](https://doi.org/10.1093/bmb/idg032).

Kirby RR, Beaugrand G, Lindley JA (2009) Synergistic effects of climate and fishing in a marine ecosystem. *Ecosystems*, 12, 548–561.

Kulkarni, D., Gergs, A., Hommen, U., et al., 2013. A plea for the use of copepods in freshwater ecotoxicology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 75–85.

Kwok, K. W. H., Souissi, S., Dur, G., Won, E.-J., & Lee, J.-S. (2015). Copepods as Reference Species in Estuarine and Marine Waters. *Aquatic Ecotoxicology*, 281–308. doi:10.1016/b978-0-12-800949-9.00012-7

Li, Y., Wang, W.-X., Wang, M., 2017. Alleviation of mercury toxicity to a marine copepod under multigenerational exposure by ocean acidification. *Sci. Rep.* 7, 324.

Lee, H., et al. 2016. Massive and prolonged deep carbon emissions associated with continental rifting. *Nat. Geosci.* 9, 145–149.

Lees K, Pitois S, Scott C, Frid C, Mackinson S (2006) Characterizing regime shifts in the marine environment. *Fish and Fisheries*, 7, 104–127.

Lefcort, H., Freedman, Z., House, S., Pendleton, M., 2008. Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: is a little bit of pollution good? *EcoHealth* 5, 10–17

Lotufo, G.R.; Abessa, D.M.S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M.G. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas, 2002. p. 151-162.

Maier-Reimer, E. & Hasselmann, K. (1987) Transport and storage of CO<sub>2</sub> in the ocean - An inorganic ocean-circulation carbon cycle model. *Climate Dynamics* 2: 63-90.

Marques, G.M.; Zaroni, L.P. Avaliação de taxa de fecundidade de *Nitokra sp.* In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 12, 2004, São Paulo-SP. Anais... São Paulo: SIICUSP, 2004. 1 CD-ROM (2004).

Marty et al. 2017. Population-relevant endpoints in the evaluation of endocrine-active substances (EAS) for ecotoxicological hazard and risk assessment. Volume 13, Issue 2, March 2017, p. 317-330.

Matouke, Moise M., and Moshood Mustapha. "Bioaccumulation and physiological effects of copepods sp.(*Eucyclop sp.*) fed *Chlorella ellipsoides* exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles and lead (Pb<sup>2+</sup>)."  
*Aquatic Toxicology* 198 (2018): 30-39.

Mayor, Daniel J., et al. "The metabolic response of marine copepods to environmental warming and ocean acidification in the absence of food." *Scientific Reports* 5.1 (2015): 1-12.

Mehrbach, C., et al. 1973. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.* 18, 897-907.

Millero, F.J., R. Woosley, B. DiTrollo, and J. Waters. 2009. Effect of ocean acidification on the speciation of metals in seawater. *Oceanography* 22(4):72–85, <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.98>)

Millero, Frank J., et al. "Dissociation constants of carbonic acid in seawater as a function of salinity and temperature." *Marine Chemistry* 100. 1-2 (2006): 80-94.

Minetto, D., Libralato, G., Ghirardini, A., 2014: Ecotoxicity of engineered TiO<sub>2</sub>NPs to seawater organisms an overview. – Environ. Int. 66: 18-27.

ONU. Organização das Nações Unidas. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. 2018. Disponível em <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>> Acesso em 07/11/2021.

Orr, J.C., et al. 2013. Temperature and CO<sub>2</sub> additively regulate physiology, morphology and genomic responses of larval sea urchins, *Strongylocentrotus purpuratus*. Proc .Bio. Sci. 280. 1759.

Pascal, P.-Y., Fleeger, J.W., Galvez, F., Carman, K.R., 2010. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meiobenthic copepods. Mar. Pollut. Bull. 60, 2201-2208.

Pennafirme, S., Soares-Gomes, A. O estudo da biologia populacional de *Kalliapseudes schubartii* (tanaidacea, crustacea) como subsídio para testes ecotoxicológicos de sedimentos marinhos. 2005, 3º Congresso Brasileiro de P&D e, Petróleo e Gás.

Pörtner H.O. et al., 2004. 'Biological impact of elevated ocean CO<sub>2</sub> concentrations: lessons from animal physiology and earth history. J. Oceanogr.60, 705–718.

Pörtner, H. O. 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 373, p. 203-217.

Pörtner H. O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–893 (2010).

Riba, Inmaculada, et al. "The influence of pH and salinity on the toxicity of heavy metals in sediment to the estuarine clam *Ruditapes philippinarum*." *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 23.5 (2004): 1100-1107.

Riba, Inmaculada, et al. "The influence of pH and waterborne metals on egg fertilization of the blue mussel (*Mytilus edulis*), the oyster (*Crassostrea gigas*) and the sea urchin (*Paracentrotus lividus*)." *Environmental Science and Pollution Research* 23.14 (2016): 14580-14588.

Ruppert, E.E; Fox, R.S.; Barnes, R.D. *Zoologia dos invertebrados*. 6. Ed. São Paulo: Editora Roca, 1996. 1088p.

Silbergeld, Ellen K., Michael Waalkes, and Jerry M. Rice. "Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action." *American journal of industrial medicine* 38.3 (2000): 316-323.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Suthon, D., 2014: Heavy metals toxicity and the environment. – *Exs 100*: 133-164.

Thor, P., Dupont, S., 2015. Transgenerational effects alleviate severe fecundity loss during ocean acidification in a ubiquitous planktonic copepod. *Global Change Biol.* 21, 2261-2271.

Turley, C.; Blackford, J.; Widdicombe, S.; Lowe, D.; Nightingale, P. D. & Rees, A. P. (2006) Reviewing the impact of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on oceanic pH and the marine ecosystem. *Avoiding dangerous climate change* 8: 65-70.

USEPA 1992. Method 3010A: Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by FLAA or ICP Spectroscopy, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods.

USEPA. 1998. Method 6020A (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry," Rev. 1.

Vehmaa, A., Almén, A.K., Brutemark, A., Paul, A., Riebesell, U., Furuhaugen, S., Engström-Öst, J., 2016. Ocean acidification challenges copepod phenotypic plasticity. *Biogeosciences* 13, 6171-6182.

Vehmaa, A., Brutemark, A., Engström-Öst, J., 2012. Maternal effects may act as an adaptation mechanism for copepods facing pH and temperature changes. *PLoS One* 7, e48538.

Verhulst, Pierre-François. "Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement." *Corresp. Math. Phys.* 10 (1838): 113-126.



Wang, Minghua, et al. "Effects of ocean acidification on copepods." *Aquatic Toxicology* 196 (2018): 17-24.

Wang, Minghua, Jae-Seong Lee, and Yan Li. "Global proteome profiling of a marine copepod and the mitigating effect of ocean acidification on mercury toxicity after multigenerational exposure." *Environmental science & technology* 51.10 (2017): 5820-5831.

Whiteley, N. M. 2011. Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* v. 430, p. 257, 271.

Widdicombe, S. and Spicer, J. I. 2008. Predicting the impact of Ocean acidification on benthic biodiversity: what can physiology tell us? – *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 366: 187 – 197.

Wilde, Karyn L., et al. "The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.)." *Archives of environmental contamination and toxicology* 51.2 (2006): 174-185.

Wood HL, Spicer JI, Widdicombe S (2008) Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proc R Soc B*, [http://dx. doi.org/10.1098/rspb.2008.0343](http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2008.0343)