

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
AMBIENTAL**

Cleiton Vaz

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA TESTE DE  
TOXICIDADE CRÔNICA COM *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979)  
PARA APLICAÇÕES EM ANÁLISES DE AMBIENTES  
MARINHOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Coorientadora: Prof. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Florianópolis (SC)

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vaz, Cleiton

Desenvolvimento de metodologia para teste de toxicidade crônica com *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979) para aplicações em análises de ambientes marinhos [tese] / Cleiton Vaz ; orientador, William Gerson Matias ; co-orientadora, Therezinha Maria Novais de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2012.

226 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Engenharia Ambiental. 3. Toxicologia Ambiental. 4. *Mysidopsis juniae*. 5. Ambientes marinhos. I. Matias, William Gerson. II. Oliveira, Therezinha Maria Novais de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.



## TERMO DE APROVAÇÃO

“Desenvolvimento de metodologia para teste de toxicidade crônica com *Mysidopsis Juniae* (SILVA, 1979) para aplicações em análises de ambientes marinhos”.

Cleiton Vaz

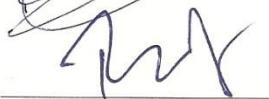
A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

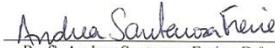
### DOUTOR EM ENGENHARIA AMBIENTAL

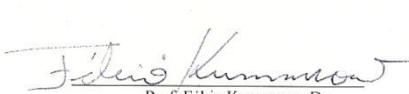
Aprovado por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. William Gerson Mattias, Dr.  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Paulo Belli Filho, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Andrea Santarosa Freire, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Fábio Kummrow, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Charrid Resgalla Junior, Dr.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Flávio Rubens Lapolli  
(Coordenador PPGEA)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL  
NOVEMBRO/2012.



Dedico este trabalho à minha família amada, que sempre esteve disposta a superar comigo todos os desafios que a vida impôs.



## AGRADECIMENTOS

Como não ser injusto nesse pequeno trecho de agradecimentos àqueles que foram importantes nessa jornada ainda é algo que tentarei descobrir, mas mesmo assim, arriscarei lembrar de quem não poupou esforços para me ajudar a ter sucesso.

Primeiramente à minha esposa Rosemeri e aos meus filhos Marina e Victor pela compreensão que tiveram com um marido e pai pouco presente nesses anos de estudos. Seu carinho foi indispensável para vencer todos os obstáculos encontrados.

Aos meus pais Aldemir e Lucila, que realmente são meus heróis, pois sempre me incentivaram a progredir e acreditaram que tudo é possível, mesmo nas maiores dificuldades. Também ao meu irmão Cleomir, que compartilhou muitos desses momentos e empenhou-se para ajudar a superarmos os desafios impostos pela vida.

À Professora Therezinha, uma pessoa que nunca poupou esforços para me ajudar, seja no desenvolvimento da pesquisa, na carreira profissional ou no crescimento pessoal. Primeiro uma professora e orientadora, hoje, uma grande amiga da qual me orgulho em poder confiar incondicionalmente. Sua forma profissional de agir, competência inspiradora e amizade são fontes de energia inesgotável.

Ao Professor William, meu orientador, propulsor de motivação para o desenvolvimento deste trabalho e possuidor de qualidades que vão muito além da sua competência profissional e da sua honestidade. Hoje, acima de tudo um amigo e pessoa na qual posso buscar inspiração para uma carreira de sucesso.

Às pessoas que trabalham ou trabalharam no projeto, Renata, Elaine, Mariele, Tamila, Claudiane, Renata Amanda, Mara, Talini, Virgínia e mais recentemente o Eduardo, sem as quais provavelmente teria encontrado barreiras intransponíveis, mas que com o trabalho em equipe foram superadas. Também agradeço ao Claudio Tadeu, pelo grande apoio dado para a instalação e manutenção do laboratório na Univille em São Francisco do Sul.

À Denise pela sempre disposta ajuda e amizade, até mesmo se encarregando de buscar meus filhos na escola.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental.

Ao Programa de Qualificação Docente da Univille pela ajuda de custo para o Doutorado.

Ao Fundo de Apoio à Pesquisa (FAP) da Univille pelo financiamento de parte do projeto de pesquisa desenvolvido.

Aos laboratórios LABTOX (RJ) e Letox (Univali) pela doação de misidáceos para início do cultivo.

Aos amigos e colegas que a memória não permitiu lembrar.

A todos vocês meu muito obrigado de todo o coração!

Uma longa viagem de mil milhas inicia-se com o  
movimento de um pé.

(Lao-Tsé)



## RESUMO

A poluição nos ambientes marinhos está na maioria dos casos em pequenas concentrações, em função do grande volume de água presente nesses locais, dessa forma, a mensuração dos efeitos sobre a biota nesse tipo de ambiente normalmente não é detectada por meio de ensaios de toxicidade aguda, tendo em vista que as alterações nos organismos ocorrem na maioria dos casos a longo prazo. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para a execução de testes de toxicidade crônica com crustáceo marinho *Mysidopsis juniae*, para identificar efeitos decorrentes da exposição prolongada a toxicantes. Para cultivar os organismos, identificar as variáveis mais significativas para a detecção da toxicidade crônica, prever e prevenir falhas no modelo, analisar o sistema de medição e desenvolver um software para o gerenciamento e tabulação de dados, foram utilizadas as metodologias ABNT NBR 15308, o Desdobramento da Função Qualidade, Análise dos Modos e Efeitos de Falhas, *Six Sigma* e a linguagem de programação *Visual Basic for Applications*. Para a validação do método foram desenvolvidos estudos de caso em condições diferenciadas, com amostras ambientais da baía da Babitonga e com nanopartículas de óxido de cobre. Como resultado, foi concebida uma metodologia que possibilita prever efeitos tóxicos crônicos geracionais e transgeracionais nos organismos teste por meio da medição de variáveis ligadas a natalidade, mortalidade e crescimento dos organismos. Os testes com as amostras do interior da baía apresentaram diferenças significativas entre o controle e a amostra em todos os pontos avaliados, em pelo menos uma das variáveis. O ponto de mar aberto, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle. Para os ensaios com a nanopartícula de óxido de cobre, foi identificado que concentrações acima de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  geram efeitos crônicos aos misidáceos. Os resultados obtidos com a aplicação do método demonstram que o modelo é eficiente e eficaz para detecção de efeitos de longo prazo no organismo teste. Espera-se que com a metodologia, seja possível desenvolver estudos de toxicidade de longo prazo em ambientes sob pressão antropogênica, bem como estudos dos efeitos crônicos de substâncias puras, como contribuição para a definição de diretrizes de monitoramento ambiental, prevenindo riscos toxicológicos futuros.

Palavras-chave: toxicidade crônica, ambientes marinhos, *Mysidopsis juniae*, baía da Babitonga, nanopartículas de óxido de cobre.



## ABSTRACT

The pollution in marine environments in the most of cases is detected in small concentrations, due to the large volume of water present in these locations, however, the measurement of the effects on biota at these environments is not commonly detected through acute toxicity tests, in order that changes in the organisms occur in most of cases in long term. Therefore, this study aimed to develop a methodology for implementation of chronic toxicity tests with marine crustacean *Mysidopsis juniae* to identify effects of prolonged exposure to toxicants. To cultivate organisms, identify the most significant variables for the detection of chronic toxicity, predict and prevent failures in the model, analyze the measurement system and develop a software for managing and entering data, the methodologies ABNT NBR 15308, Quality Function Deployment, Failure Modes and Effects Analysis, Six Sigma and Visual Basic for Applications programming language were used. To validate the method were developed two case studies in different conditions, with environmental samples from Babitonga bay and copper oxide nanoparticles. As a result, was designed a methodology that enables to predict chronic toxic effects in generational and transgenerational context to the test organisms by measuring variables related to birth, mortality and growth. Tests conducted with samples of the Babitonga bay showed significant differences between the control and the samples tested at all points within the bay in almost one measured variable. At the offshore point, the water samples showed no significant differences when compared to the control. For tests performed with copper oxide nanoparticle, the concentrations above 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  induced chronic effects on mysids. The results from the application of this method show that the model is efficient and effective for detecting long-term effects on the organism tested. It is hoped that with the defined methodology, should be possible to develop toxicity studies of environmental samples, as well as studies of the chronic effects of pure substances, as a contribution to the definition of guidelines for environmental monitoring, preventing future toxicological risks.

Keywords: chronic toxicity, marine environment, *Mysidopsis juniae*, Babitonga bay, copper oxide nanoparticles.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dimensões representativas de algumas espécies típicas, em suas várias escalas. ....	37
Figura 2: Exemplos de <i>Mysidopsis juniae</i> . (a) Fêmea com destaque para o marsúpio (b) macho. ....	48
Figura 3: Diagrama esquemático de uma matriz QFD explicitando os campos a serem preenchidos para o processo de análise de características versus métodos. ....	53
Figura 4: Mapa de raciocínio para identificação das condições físicas para o cultivo de <i>Mysidopsis juniae</i> . ....	62
Figura 5: Plano de amostragem para o desenvolvimento da análise do sistema de medição com lupa e escala milimétrica acoplada à lente ocular. ....	68
Figura 6: Locais de amostragem selecionados na foz do Rio Cachoeira (P1), próximo ao Porto de São Francisco do Sul (P2), próximo à Praia do Capri (P3) e próximo ao Arquipélago das Graças (P4). ....	69
Figura 7: Gráfico dos efeitos principais para a variação no parâmetro salinidade em ‰. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra. ....	76
Figura 8: Gráfico das interações para a variação no parâmetro salinidade. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra. ....	77
Figura 9: Gráfico dos efeitos principais no parâmetro de variação no volume da água após uma semana de teste. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra. ....	78

Figura 10: Gráfico das interações no parâmetro de variação no volume da água após uma semana de teste. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra. ....	79
Figura 11: Gráfico dos efeitos principais para identificação da média da mortalidade em diferentes condições de temperatura e salinidade. ....	81
Figura 12: Gráfico de interações entre a temperatura, salinidade e o percentual de sobrevivência nas condições testadas, após 60 dias de teste. ....	82
Figura 13: Carta controle da sensibilidade dos misidáceos cultivados no laboratório. Os dados são dos valores individuais da $CL_{50(96h)}$ . ....	83
Figura 14: Teste de normalidade de Anderson-Darling da $CL_{50(96h)}$ calculada nos testes de sensibilidade com Dodecil Sulfato de Sódio. O valor de $p > 0,05$ representa que não há diferenças significativas nas populações testadas, para um intervalo de confiança de 95%.....	84
Figura 15: Matriz QFD para definição de características chave para o desenvolvimento de método de ensaio de toxicidade crônica com <i>Mysidopsis juniae</i> .....	86
Figura 16: Lupa selecionada para o desenvolvimento do método para avaliação do sistema de medição de misidáceos.....	99
Figura 17: Misidáceo da espécie <i>Mysidopsis juniae</i> , observado na lupa com escala milimétrica de medição. A visualização está com ampliação do tamanho do organismo de 2x (duas vezes). As setas em vermelho indicam os pontos de medição. ....	100
Figura 18: Análise do sistema de medição utilizando a técnica Gage R&R. Neste estudo foram avaliados 20 misidáceos por dois técnicos em uma mesma lupa, com medições realizadas em triplicata.....	101
Figura 19: Diagrama esquemático para a montagem de um teste de toxicidade crônica com <i>M. juniae</i> . ....	102
Figura 20: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com dimensão da nanopartícula de óxido de cobre.....	111
Figura 21: Representação da $CL_{50(96h)}$ utilizando o software Minitab 16. O valor da concentração é expresso pela mediana ( $9,24 \text{ mg.L}^{-1}$ ).....	112
Figura 22: Natalidade dos misidáceos expostos ao controle e à amostra com concentração de $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de nanopartículas de óxido de cobre. ....	113
Figura 23: Mortalidade de misidáceos por sexo no controle e na amostra, durante os 31 dias de duração do teste de toxicidade crônica. A	

amostra contém 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de concentração de NPCuO em água reconstituída. ....	114
Figura 24: Tela de opções do MASCoTE para interface com o usuário. ....	117
Figura 25: Tela para configuração do início do teste e apresentação do resumo do teste de toxicidade crônica.....	117
Figura 26: Tela para lançamento de dados do teste de toxicidade crônica. Os campos em azul representam informações já preenchidas. A linha com destaque em amarelo representa o dia que está em avaliação, indicando assim a linha que deve ser preenchida na tabela de dados..	119
Figura 27: Tela de análise dos resultados em um exemplo. Os dados são tabulados após o usuário acionar o botão “Calcular” no canto direito superior da tela. ....	120
Figura 28: Tabulação gráfica dos parâmetros abióticos acompanhados ao longo do teste de toxicidade crônica, realizada pelo software MASCoTE.....	121
Figura 29: Tabulação gráfica dos dados relativos ao tempo para primeira prole, mortalidade na primeira e segunda geração, com distinção entre machos e fêmeas. Os gráficos são elaborados automaticamente pelo software MASCoTE.....	122
Figura 30: Tabulação dos dados relativos ao teste de toxicidade crônica, utilizando média, desvio-padrão e análise inferencial ANOVA e Qui-Quadrado para interpretação dos resultados do ensaio. Essa tabulação é realizada automaticamente pelo software MASCoTE. ....	123



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características físicas, fisiológicas, histológicas e bioquímicas citadas por autores para identificação de efeitos crônicos em testes de toxicidade para organismos aquáticos e terrestres. ....	43
Quadro 2: Resumo das condições de cultivo e manutenção de <i>Mysidopsis juniae</i> em laboratório.....	49
Quadro 3: Simbologia a ser utilizada para a avaliação das relações "quês x comos" na matriz QFD.....	54
Quadro 4: Simbologia para relacionamento de "comos x comos" na matriz QFD.....	54
Quadro 5: Escala da pontuação para classificação da severidade .....	57
Quadro 6: Escala de pontuação para a classificação da ocorrência.....	57
Quadro 7: escala de pontuação para a classificação da detecção .....	57
Quadro 8: Parâmetros a avaliar conforme indicações do mapa de raciocínio, bem como os níveis de variação considerados para cada um dos fatores, visando a execução do planejamento fatorial.....	63
Quadro 9: Fatores e níveis avaliados no DOE para descoberta das condições ideais de salinidade e temperatura para o cultivo de <i>Mysidopsis juniae</i> .....	64
Quadro 10: Características chave classificadas com as maiores pontuações.....	87
Quadro 11: Variáveis selecionados com o tipo de efeito avaliado e o tempo de resposta para mensuração do efeito. ....	88
Quadro 12: Frequência e metodologia de quantificação das variáveis definidas para o teste de toxicidade crônica com <i>Mysidopsis juniae</i> . ...	89
Quadro 13: FMEA do controle do ambiente do laboratório para realização dos testes de toxicidade crônica. ....	91
Quadro 14: FMEA do processo de identificação da primeira prole na primeira e segunda geração do teste de toxicidade crônica.....	93
Quadro 15: FMEA do processo de quantificação da mortalidade dos misidáceos durante o teste de toxicidade crônica.....	94
Quadro 16: FMEA do processo de quantificação de neonatos durante o teste de toxicidade crônica. ....	96
Quadro 17: FMEA do processo de medição dos misidáceos durante o teste de toxicidade crônica. ....	97

Quadro 18: Condições definidas para o teste de toxicidade crônica...	103
Quadro 19: Comparação entre as amostras e os controles considerando as variáveis estudadas nos ensaios de toxicidade crônica, reprodução, tamanho e mortalidade.....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB – Baía da Babitonga

CENO – Concentração de efeito não observado

CL<sub>50</sub> – Concentração que causa letalidade a 50% da população testada em ensaio de toxicidade aguda (Concentração letal mediana)

DOE – *Design of experiments* (planejamento de experimentos)

FMEA – *Failure modes and effect analysis* (Análise dos modos e efeitos de falhas)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NPR – Número de priorização de risco

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento)

PNGC – Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro

QFD – *Quality function deployment* (Desdobramento da função qualidade)

USEPA – *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1 HIPÓTESE DA PESQUISA .....	29
1.2 JUSTIFICATIVA .....	29
1.3 OBJETIVOS .....	30
<b>1.3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>30</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
2.1 A PROBLEMÁTICA DA POLUIÇÃO MARINHA .....	31
<b>2.1.1 A Baía da Babitonga</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1.2 Nanopartículas de Óxido de Cobre</b> .....	<b>37</b>
2.2 TOXICOLOGIA AMBIENTAL E ECOTOXICOLOGIA .....	39
<b>2.2.1 Estudos de Toxicidade Crônica</b> .....	<b>42</b>
2.3 O ORGANISMO MARINHO <i>Mysidopsis juniae</i> .....	47
2.4 FERRAMENTAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS E PROCESSOS .....	51
<b>2.4.1 Desdobramento da Função Qualidade</b> .....	<b>52</b>
<b>2.4.2 Análise dos modos e efeitos de falhas</b> .....	<b>55</b>
<b>2.4.3 Ferramentas da Metodologia Six Sigma</b> .....	<b>58</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>61</b>
3.1 CULTIVO DE <i>Mysidopsis juniae</i> .....	61
3.2 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS CULTIVADOS .....	65
3.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS PARA A DEFINIÇÃO DO MÉTODO PARA O TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA.....	65
<b>3.3.1 Previsão de falhas na aplicação da metodologia e medidas de prevenção</b> .....	<b>66</b>
<b>3.3.2 Análise do sistema de medição</b> .....	<b>67</b>
3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM ESTUDOS DE CASO.....	68
<b>3.4.1 Estudo de caso da Baía da Babitonga</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4.2 Teste de toxicidade crônica com nanopartículas de óxido de cobre</b> .....	<b>72</b>
3.5 DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMA DE COMPUTADOR PARA GESTÃO E TABULAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA.....	74
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
4.1 CULTIVO DE <i>Mysidopsis juniae</i> .....	75
4.2 SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS CULTIVADOS .....	82

4.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS PARA DEFINIÇÃO DO MÉTODO PARA O TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA .....	84
4.3.1 Frequência e metodologia de quantificação.....	88
4.3.2 Estudo das potenciais falhas no processo do teste de toxicidade crônica .....	90
4.3.3 Análise do sistema de medição de misidáceos.....	99
4.3.4 Montagem do teste .....	101
4.3.5 Condições abióticas para o teste .....	103
4.4 ESTUDO DE CASO UTILIZANDO O MÉTODO DESENVOLVIDO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA BAI DA BABITONGA .....	104
4.4.1 Tempo para a primeira prole.....	107
4.4.2 Comprimento total dos organismos.....	107
4.4.3 Natalidade .....	107
4.4.4 Mortalidade .....	108
4.4.5 Discussão.....	108
4.5 ESTUDO DE CASO PARA IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE.....	111
4.5.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de cobre por microscopia eletrônica de transmissão.....	111
4.5.2 Toxicidade aguda .....	112
4.5.3 Teste de toxicidade crônica .....	112
4.5.4 Discussão.....	114
4.6 SOFTWARE PARA ACOMPANHAMENTO E TABULAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE.....	116
<b>5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>125</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>129</b>
<b>7 APÊNDICES .....</b>	<b>149</b>
A1 MATRIZ QFD .....	149
A2 PLANILHA PARA FMEA.....	150
A3 ETIQUETA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AQUÁRIOS.....	151
A4 PLANILHA PARA ACOMPANHAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTE E DA ÁGUA.....	152
A5 TERMÔMETRO DIGITAL UTILIZADO PARA O MONITORAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTE E DA ÁGUA DO CULTIVO E TESTES .....	153
A6 DADOS OBTIDOS NO TESTE PARA AVALIAR VARIAÇÕES NA SALINIDADE E VOLUME DE ÁGUA .....	154

A7 DADOS OBTIDOS NO TESTE PARA AVALIAR AS CONDIÇÕES DE SALINIDADE E TEMPERATURA PARA CULTIVO E ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA .....	155
A8 REFRAÔMETRO PARA O ACOMPANHAMENTO DA SALINIDADE DO CULTIVO E DOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA.....	156
A9 DADOS PARA A ELABORAÇÃO DA CARTA-CONTROLE DA SENSIBILIDADE DOS MISIDÁCEOS .....	157
A10 CONDICIONADORES DE AR INSTALADOS NO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DA UNIVILLE – PRINCIPAL E RESERVA .....	158
A11 SISTEMA DE AERAÇÃO SECUNDÁRIO, COM COMPRESSORES DE DIAFRAGMA .....	159
A12 SISTEMA DE AERAÇÃO E ILUMINAÇÃO DOS AQUÁRIOS INSTALADO NAS ESTANTES DO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DA UNIVILLE.....	160
A13 DADOS OBTIDOS DURANTE A ANÁLISE DO SISTEMA DE MEDIÇÃO .....	161
A14 TAMANHO DOS ORGANISMOS MEDIDOS* .....	162
A15 NATALIDADE DOS ORGANISMOS NA PRIMEIRA GERAÇÃO .....	163
A16 NATALIDADE NA SEGUNDA GERAÇÃO .....	164
A17 SOBREVIVÊNCIA DOS ORGANISMOS.....	165
A18 DADOS DE MORTALIDADE NO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA .....	166
A19 NATALIDADE DOS ORGANISMOS EXPOSTOS AO CONTROLE E À AMOSTRA COM 100 µg.L <sup>-1</sup> de NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE .....	167
A20 MORTALIDADE DOS ORGANISMOS DURANTE O TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE .....	168
A21 TAMANHO DOS MISIDÁCEOS MEDIDOS NO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE.....	169
A22 CÓDIGO FONTE DO SOFTWARE MASCoTE .....	170
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>189</b>
A1 ACEITE DE ARTIGO PELA REVISTA FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN.....	189
A2 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN.....	190



# 1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos utilizam os oceanos para a produção de uma grande variedade de bens e serviços, todavia, esse uso tem alterado as características desse recurso natural. A preferência dos homens habitarem áreas costeiras tem criado várias pressões prejudiciais aos recursos que atraem as pessoas a esses locais. Essas pressões incluem o uso dos oceanos para extração e produção de bens, acréscimo da descarga de nutrientes, despejos industriais e o aporte de agroquímicos e fertilizantes provenientes da agricultura. No Brasil, a maioria das regiões metropolitanas estão localizadas em áreas costeiras (SOUZA *et al.*, 2007), onde estão instalados grandes pólos industriais e sistemas portuários.

Não apenas as atividades desenvolvidas no interior dos oceanos causam alterações indesejadas, mas também aquelas relacionadas à produção no continente, pois estas são responsáveis pelo carreamento de uma ampla variedade de poluentes e nutrientes, principalmente para a costa, o que acaba alterando ou destruindo os habitats naturais. As atividades baseadas na exploração dos oceanos extraem recursos, adicionam poluição e mudam a composição das espécies. Essas atividades humanas variam em intensidade de impacto na condição ecológica das comunidades e sua distribuição espacial (HALPERN *et al.*, 2008).

Dessa maneira, pode-se afirmar que os oceanos são os receptores finais da maioria das formas de poluição causadas pelos seres humanos, porém, como essa poluição ocorre de forma difusa, os efeitos decorrentes são observados somente a longo prazo, o que torna dificultosa a tomada de decisão para o desenvolvimento de ações de gerenciamento e conservação.

As avaliações toxicológicas ambientais são formas eficazes de evidenciar os efeitos das combinações dos diversos fatores presentes no ecossistema, maximizando assim o conhecimento obtido através de estudos reducionistas (análises físico-químicas, por exemplo), pouco úteis para a tomada de ações. Os efeitos agudos demonstram o quanto um determinado composto pode gerar letalidade a uma determinada espécie, enquanto os efeitos crônicos demonstram como os compostos podem gerar efeitos subletais nos organismos e que poderiam desencadear desequilíbrio na cadeia trófica em espaços de tempo prolongados.

Testes para avaliar a toxicidade aguda e crônica em espécies de água doce são consolidados e normatizados no Brasil, como exemplo testes de toxicidade agudos com *Daphnia magna* e crônicos com *Ceriodaphnia dubia* (COSTA *et al.*, 2008). Quanto a testes de toxicidade crônica para ambientes marinhos, a ABNT padronizou o método de ensaio crônico de curta duração sobre o desenvolvimento embrionário de *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* por meio da NBR 15350 (ABNT, 2012).

Porém, no Brasil, até o momento inexistente uma normativa da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) ou de outro órgão regulamentador, que defina de forma padronizada a execução de ensaios de toxicidade crônica utilizando misidáceos.

Os misidáceos são microcrustáceos marinhos utilizados em diversos lugares do mundo como bioindicadores de toxicidade, sendo que os organismos *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* são padronizado para ensaios de toxicidade aguda pela norma NBR 15308 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011).

Este contexto motivou o Laboratório de Toxicologia Ambiental - LABTOX/ENS/UFSC e o Laboratório de Toxicologia Ambiental da UNIVILLE a desenvolverem em conjunto uma metodologia capaz de evidenciar efeitos crônicos, utilizando o organismo *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979). A presente tese se enquadra na linha de pesquisa “Toxicologia Ambiental” do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PPGA e apresenta como resultado um novo teste toxicológico, capaz de identificar efeitos tóxicos crônicos aplicados para ambientes marinhos.

A tese está disposta em nove capítulos distintos, sendo no Capítulo I apresentada a introdução, hipótese e justificativa da pesquisa. No Capítulo II, com o intuito de avaliar a hipótese apresentada são definidos os objetivos do trabalho.

No Capítulo III é feita uma revisão da literatura abordando a problemática da poluição marinha, a baía da Babitonga, conceitos sobre toxicologia ambiental e ecotoxicologia englobando os estudos de toxicidade crônica, uma caracterização do organismo marinho *Mysidopsis juniae*, algumas ferramentas para o desenvolvimento de produtos e processos como a matriz QFD (*Quality Function Deployment*), FMEA (*Failure Modes and Effect Analysis*) e algumas das ferramentas empregadas na metodologia Six Sigma, como os mapas de raciocínio, DOE (*Design of Experiments*) e análise de sistemas de medição (ASM), além de uma breve revisão sobre nanopartículas de óxido de cobre.

No Capítulo IV é apresentada a metodologia para cada um dos objetivos específicos listados no Capítulo II, enquanto que no Capítulo V são relatados e discutidos os resultados obtidos com a pesquisa, primeiramente para o desenvolvimento do método e posteriormente para os dois estudos de caso desenvolvidos. No Capítulo VI são feitas as considerações finais e nos capítulos VII, VIII e IX são apresentadas as referências da literatura utilizadas para o trabalho, os apêndices e anexos, respectivamente.

## 1.1 HIPÓTESE DA PESQUISA

O organismo marinho *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA: MYSIDAE) é uma espécie adequada para avaliação da toxicidade crônica, baseado em características populacionais, de reprodução e crescimento.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O aumento das atividades antropogênicas tem ocasionado um significativo aporte de poluentes nos ambientes marinhos e costeiros, porém como o volume de água onde os despejos ocorrem proporciona a diluição a concentrações muito baixas, os ensaios de toxicidade aguda não apresentam sensibilidade suficiente para a detecção dos efeitos aditivos e sinérgicos de longo prazo, que podem causar desequilíbrio aos ecossistemas.

Exemplos desses poluentes são os derramamentos de petróleo e combustíveis, estrógenos, agroquímicos, esgoto doméstico, efluentes industriais e mais recentemente os produtos e subprodutos da nanotecnologia. Essa poluição pode ocasionar impactos relevantes aos ecossistemas aquáticos, principalmente das regiões costeiras, diminuindo a produtividade aquícola, desequilibrando os ecossistemas e afetando a qualidade de vida das populações que dele dependem.

A ausência de padrões para a realização de testes que avaliem com precisão a toxicidade crônica nas condições específicas do clima brasileiro, considerando ambientes marinhos, torna necessária a proposição de uma metodologia que seja adequada para a identificação dos efeitos dessa poluição.

Nesse contexto, no ano de 1996 o Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC iniciou o desenvolvimento de pesquisas na área de toxicologia ambiental, primeiramente com a criação da disciplina de Toxicologia Ambiental e a partir desse mesmo ano a

criação do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX, sendo que as atividades do laboratório foram iniciadas no ano de 1997 com objetivo de atender às demandas de ensino, pesquisa e extensão.

Apesar de possuir metodologias desenvolvidas para as avaliações de toxicidade, como testes de toxicidade aguda e crônica com *Daphnia magna*, teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*, testes de genotoxicidade a partir da avaliação de micronúcleos, teste do cometa e fragmentação do DNA, bem como teste citotóxico MTT e lipoperoxidação, além de avaliar efeitos epigenéticos por meio de ensaios de metilação biológica, uma metodologia que pudesse prever efeitos crônicos para um organismo marinho ainda não havia sido estabelecida.

Considerando essa necessidade, foi estabelecida uma cooperação entre o LABTOX da UFSC e o Laboratório de Toxicologia Ambiental da Univille com a finalidade de desenvolver um teste de toxicidade crônica para ambientes marinhos com um organismo nativo do Brasil, objetivando preencher a lacuna existente para esse tipo de avaliação no país.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de análise da toxicidade crônica para ambientes marinhos, utilizando *Mysidopsis juniae*.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições de cultivo, faixa de sensibilidade e as variáveis para a definição do método para o teste de toxicidade crônica com *M. juniae*.
- Realizar estudo de caso com amostras de água da Baía da Babitonga e com nanopartículas de Óxido de Cobre.
- Desenvolver *software* para gerenciamento e tabulação dos dados do teste de toxicidade crônica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo é feita uma breve revisão da literatura enfocando os processos de poluição das regiões costeiras e de estuários, bem como a sua problemática na Baía da Babitonga, a última grande formação de manguezal do hemisfério sul do planeta, e o mais importante estuário do estado (CREMER *et al.*, 2006). Também são abordados temas relacionados a toxicologia ambiental e ecotoxicologia, ao organismo teste *Mysidopsis juniae*, ferramentas de engenharia para o desenvolvimento de produtos e processos. Pela importância do tema para a ciência e as implicações ambientais, também é apresentado neste capítulo a problemática das nanotecnologias e uma sucinta revisão sobre nanopartículas de óxido de cobre.

### 2.1 A PROBLEMÁTICA DA POLUIÇÃO MARINHA

O *boom* industrial do século XX trouxe contribuições de grande monta para a sociedade, porém em muitos casos, proporcionou o aumento acelerado da poluição em nível local, regional e global, sendo que a maior parte das substâncias químicas alcança direta ou indiretamente os oceanos, responsáveis por cobrir mais de 70% do globo terrestre (SOUSA, 2002).

Dessa forma, as atividades humanas têm causado nas últimas décadas impactos significativos ao ambiente marinho, provocando alterações nos ecossistemas e na saúde dos oceanos (MOURA *et al.*, 2011; SOUSA, 2002). As regiões costeiras são impactadas mais intensamente pelas atividades antropogênicas do continente que as áreas de mar aberto, já que os maiores centros urbanos do planeta estão situados no litoral (SOUSA, 2002). Esse impacto tem relação com o aporte de fontes difusas de compostos orgânicos, inorgânicos e nutrientes, bem como mudanças no habitat, acidificação, aumento da temperatura do oceano e outras fontes, causados pela atividade humana e pelas mudanças climáticas globais (HALPERN *et al.*, 2008).

Pode-se dizer que a saúde, o bem-estar e, em alguns casos, a própria sobrevivência das pessoas depende das condições dos sistemas marinhos, incluindo também as áreas úmidas e regiões estuarinas, bem como as bacias de recepção e drenagem e as águas interiores próximas à costa. Essas condições incluem as alterações causadas pelas mudanças climáticas, florações de algas tóxicas, poluição química e microbiana (MOURA *et al.*, 2011).

Essa afirmação reforça a necessidade da manutenção de ambientes saudáveis nas zonas costeiras, mas a realidade até o momento difere desse desejo. Exemplos das pressões antrópicas nas áreas costeiras são relatados por diversos autores.

Pode-se descrever como exemplo, a contaminação por compostos orgânicos e metais em estuários na Ucrânia onde foram encontradas elevadas quantidades de mercúrio em sedimentos (0,13 a 5,4 ppm) que seriam suficientes para causar efeitos toxicológicos adversos a organismos bentônicos (BURGESS *et al.*, 2009). Em amostras de sedimento da baía da Babitonga também foram encontradas quantidades de mercúrio de 0,28 ppm próximo ao porto de São Francisco do Sul e 0,21 ppm na lagoa do Saguacú, próximo à região industrial em Joinville (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No Canal de São Sebastião, em São Paulo, no início da década de 90 foram realizados ensaios de toxicidade crônica de curta duração com *M. juniae*, nos quais, as amostras ambientais apresentaram pouco efeito tóxico, sendo que quando estes ocorreram, foram mais frequentes sobre o crescimento do que para a sobrevivência (BADARÓ-PEDROSO, 1993).

Em pesquisas desenvolvidas para avaliar a qualidade dos sedimentos no estuário de Santos e de São Vicente usando teste de toxicidade com *Tiburonella viscana*, foram observadas contaminações mais elevadas na porção interna do estuário onde estão localizados o Porto e a Zona Industrial de Santos e uma forte relação entre os efeitos tóxicos observados e os níveis de contaminação de cobre, zinco, chumbo, PHA e PCB (CESAR *et al.*, 2006), sendo que estudos anteriores já havia demonstrado que essa região oferece efeitos tóxicos a esse organismo teste (ABESSA *et al.*, 1998). Relatos de contaminações em áreas costeiras estão amplamente divulgados em trabalhos científicos em todo o globo terrestre.

O estuário de Sagua em Cuba é outro exemplo de ambiente impactado pela atividade industrial, pois foi evidenciado o acúmulo crescente de mercúrio nas últimas décadas por meio de análises isotópicas, decorrente de resíduos industriais tratados parcialmente, além do acúmulo de chumbo também crescente nos últimos 25 anos (DÍAZ-ASENCIO *et al.*, 2009). Em um estudo na baía de Liaodong na China foram encontradas concentrações relativamente moderadas de HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) na água e sedimentos quando comparado com outros ambientes estuarinos ao redor do mundo (MEN *et al.*, 2009). A drenagem de minas também é relatada como uma fonte de poluição agressiva a esse tipo de ecossistema, como é citado

por (NIETO *et al.*, 2007) que identificaram severas contaminações de metais e metalóides no estuário de Huelva, na Espanha.

Do mesmo modo, a presença dos metais Zn, Cu, Ni, Pb, Cr e V tem causado riscos ecotoxicológicos aos organismos que habitam o estuário de Qua Iboe na Nigéria, já que as concentrações desses metais encontradas nos sedimentos do mangue excedem a concentração de efeito não observável (ESSIEN *et al.*, 2009). A segurança dos corpos hídricos usados para atividades de recreação normalmente são monitorados apenas pela análise microbiológica da água, utilizando como premissa a grande quantidade de esgotos sanitários despejados, o que é insuficiente para detectar a sanidade desses ambientes (ORTEGA *et al.*, 2009).

Estas observações apresentam algumas das fontes de contaminação dos estuários, como a descarga de esgoto sanitário, atividade industrial e mineração. Em um estudo para identificar a variação na comunidade bentônica antes, durante e após a construção do porto 2000, uma extensão do porto de Le Havre na França, foi demonstrado que ocorreram mudanças moderadas nas populações de misidáceos, evidenciando um acréscimo de espécies na parte norte superior do canal, mas um decréscimo na densidade da espécie dominante através do tempo, porém não sendo conclusivo se a construção do porto foi a única causa das mudanças observadas (DAUVIN *et al.*, 2010).

Os impactos causados pelas atividades humanas têm originado o desenvolvimento de doenças em organismos marinhos, como por exemplo a lobomicose ou lacaziose e também distúrbio nodular de pele em golfinhos que vivem no estuário de Paranaguá, no Brasil. Foi detectado que esses mamíferos que vivem no porto de Paranaguá, estão expostos a baixas concentrações de organoclorados (VAN BRESSEM *et al.*, 2009).

Todavia, são encontrados exemplos da busca pelo desenvolvimento sustentável que demonstram que é possível responder com melhorias significativas na qualidade ambiental dos ecossistemas marinhos.

O estuário de Bilbao, no norte da Espanha, teve nos últimos 20 anos um abatimento na descarga de esgoto bruto com a implantação de sistemas de coleta e tratamento, resultando numa minimização significativa da carga poluidora no estuário, com redução de 51,8% na DBO, 70,9% do nitrogênio amoniacal e 81,9% de coliformes fecais entre os anos de 1993 e 2003. São atribuídas as melhorias diretamente às medidas de controle e acompanhamento da redução da poluição

executadas pelas autoridades locais (GARCÍA-BARCINA *et al.*, 2006), demonstrando assim que ações envolvendo políticas públicas de prevenção da poluição são eficazes quando efetivamente executadas. Essas condições observadas demonstram a necessidade do correto gerenciamento das atividades antropogênicas relacionadas aos ambientes costeiros.

No Brasil, o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC) foi instituído pela primeira vez pela lei 7.661 de 16/05/88, cujos detalhamentos e operacionalização foram objeto da Resolução no 01/90 da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM), de 21/11/90.

O PNGC (BRASIL, 1997), uma iniciativa do governo Brasileiro para uso parcimonioso desse ambiente, afirma que o atendimento às novas demandas requer um redirecionamento de atividades, visto que a Zona Costeira nacional abriga uma variedade de ecossistemas com grande relevância ambiental, na qual a diversidade ocorre pela transição de ambientes terrestres e marinhos, com interações que atribuem um caráter de fragilidade e que necessitam, por isso, de redobrada atenção do poder público, conforme demonstra sua existência na Constituição brasileira como área incluída no patrimônio nacional. Sabe-se também que a maior parte da população mundial vive em Zonas Costeiras, e que há uma tendência natural e permanente ao aumento da concentração demográfica nessas regiões (BRASIL, 1998), sendo a baía da Babitonga um exemplar dessa situação.

### **2.1.1 A Baía da Babitonga**

Um estuário é uma região de massa de água costeira semifechada com uma ligação livre ao mar e que é influenciada diretamente pela ação das marés, sendo que as águas doces provenientes de rios, drenagens terrestres e surgentes submersas são misturadas com a água salgada advinda dos oceanos (ODUM, 2001; TOWNSEND *et al.*, 2006). Esse fato faz com que a água dos estuários tenha características fundamentalmente variáveis durante o dia, mês e ano, principalmente no gradiente de salinidade (a principal característica de um estuário), fazendo com que os organismos que o utilizam como habitat tenham que suportar essas variações. Apesar de possuir características físicas extremas as condições alimentares são favoráveis, tornando esse um local repleto de seres vivos. As comunidades desses ambientes são normalmente compostas por espécies endêmicas, espécies vindas do mar e outras com capacidade osmorreguladora que permite que entrem e

saiam do meio de água doce (ODUM, 2001). Esses ambientes são depositários de quantidades elevadas de poluentes em todo o mundo, sendo que planos de gerenciamento foram desenvolvidos para tentar minimizar os impactos causados a esses locais de relevante importância às atividades humanas e também considerados berçários de várias espécies animais.

A baía da Babitonga está situada no litoral norte de Santa Catarina e é uma das principais formações estuarinas do sul do Brasil, com uma lâmina d'água com extensão de 154 km<sup>2</sup>. Já o complexo hídrico da baía da Babitonga que possui 1400 km<sup>2</sup> é composto por parte dos municípios de Joinville, São Francisco do Sul, Garuva, Araquari, Itapoá e Barra do Sul. A maior cidade de seu entorno é Joinville, com mais de meio milhão de habitantes (IBGE, 2010). A baía também está situada próximo à Serra do Mar, recebendo contribuições de diversos rios como o Cubatão, Palmital, Parati e Cachoeira, este último que drena grande parcela da cidade de Joinville e apresenta graves problemas de poluição (KNIE, 2002), principalmente relacionados aos despejos de esgoto doméstico não tratado e de efluentes de indústrias do ramo metalomecânico.

Pode-se afirmar que esse complexo estuarino vem sofrendo pressões desde a década de 30, conforme citado por (STIMAMIGLIO, 2002) p. 19:

A baía da Babitonga liga-se ao Oceano Atlântico através de uma barra principal ao norte, com abertura de 1850 metros, entre a praia da Figueira do Pontal (Itapoá) e a praia de Capri (São Francisco do Sul). A baía possuía uma segunda ligação com o oceano, através do Canal do Linguado e da Barra do Sul, ligação esta que foi interrompida com o aterro do canal, em 1935, para facilitar a ligação viária entre a Ilha de São Francisco e o continente.

Esse fechamento transformou a Ilha de São Francisco numa península, interrompendo de forma permanente a circulação de água nessa área, o que desencadeou profundas alterações ambientais ao complexo hídrico, influenciando diretamente a sua biota (CREMER *et al.*, 2006). Outras pressões impostas ao local são causadoras de diversas formas de poluição e conseqüentes impactos os organismos que dependem desse ambiente para a subsistência, como é o caso dos

despejos de indústrias, esgoto doméstico não tratado, atividade agrícola, portuária entre outras.

Comprovações dessa poluição são demonstradas por (OLIVEIRA *et al.*, 2006) que apresentam um estudo de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de ecotoxicidade que evidencia a presença de vários compostos tóxicos em amostras de água e sedimentos, tais como Arsênio (até 10,69 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento), Chumbo (até 13,62 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento e variação de 0,001 a 0,120 mg.L<sup>-1</sup> em água), Cádmio (até 5,02 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento e variação de 0,000 a 0,062 mg.L<sup>-1</sup> em água), Cromo (até 27,53 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento e variação de 0,00 a 0,22 mg.L<sup>-1</sup> em água), Cobre (até 16,48 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento e variando de 0,00 a 0,87 mg.L<sup>-1</sup> em água), Mercúrio (até 0,28 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento), Níquel (até 10,43 mg.kg<sup>-1</sup> em sedimento e variação de 0,00 a 0,27 mg.L<sup>-1</sup> em água) e Zinco (até 233,00 mg.kg<sup>-1</sup> e variação de 0,00 a 0,07 mg.L<sup>-1</sup> em água).

Também análises de amostras de organismos marinhos apresentaram concentrações desses compostos com Arsênio (até 2,21 mg.kg<sup>-1</sup> em fígado de Tainhota), Chumbo (até 7,17 mg.kg<sup>-1</sup> em rins de Golfinho), Cádmio (até 0,72 mg.kg<sup>-1</sup> em músculo e vísceras de gastrópode), Cobre (até 241,71 mg.kg<sup>-1</sup> em fígado de Parati-grosso), Mercúrio (até 0,59 mg.kg<sup>-1</sup> em fígado de Golfinho), Zinco (até 1008 mg.kg<sup>-1</sup> em músculo e vísceras de Ostra) (OLIVEIRA *et al.*, 2006), demonstrando que esses compostos vem se biomagnificando na cadeia trófica, podendo gerar efeitos tóxicos crônicos, causando desequilíbrio no ecossistema em função da diminuição das espécies e até mesmo serem causadores de doenças em seres humanos pelo consumo desses organismos. Testes realizados com o organismo *Mysidopsis juniae* não apresentaram toxicidade aguda para o elutriado de sedimentos da baía da Babitonga (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Apesar da existência desses compostos na água, sedimento e organismos, os testes de toxicidade aguda não apresentaram sensibilidade suficiente para identificar efeitos adversos aos organismos vivos e conseqüentemente ao ecossistema estudado. A partir da análise dessa situação é possível afirmar que, como esse é um ecossistema sobre pressão antrópica, necessita de monitoramento constante dos poluentes e da toxicidade, para possibilitar ações que visem a minimização dos impactos causados de forma a contribuir para o desenvolvimento sustentável da região.

Além dos poluentes já mencionados, um novo risco de contaminação surgiu na última década: os produtos e subprodutos da nanotecnologia. Estes são de particular relevância para os ecossistemas

marinhos, visto que são utilizados com biocidas em tintas anti-incrustantes, como é o caso das nanopartículas de óxido de cobre (NPCuO).

### 2.1.2 Nanopartículas de Óxido de Cobre

Pode-se dizer que a nanociência é uma das áreas emergentes da ciência, que visa estudar materiais que estão em escala manométrica, ou seja, um bilionésimo de metro. Dessa forma, a nanotecnologia, é área tecnológica que se preocupa com os processos de preparo e uso desses nanomateriais. A dimensão é expressa pelo prefixo nano, oriundo do grego "anão", com abreviação "nm". Para se ter uma noção dessa escala, 1 nm equivale ao comprimento de dez átomos enfileirados, aproximadamente. Os nanotubos de carbono tem diâmetro na faixa de 10 nm e a molécula de DNA em torno de 100 nm, pouco menor que um vírus. No sangue, um de seus componentes, as hemácias, tem dimensões da ordem de 10 microns ou 10.000 nm (TOMA, 2004). De forma ilustrativa, a Figura 1 representa alguns exemplos dessas escalas.

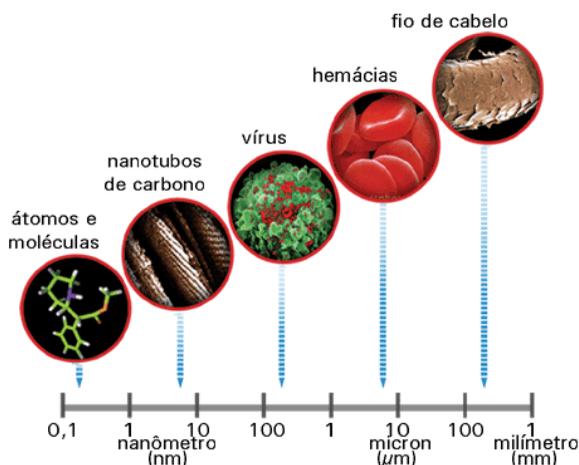


Figura 1: Dimensões representativas de algumas espécies típicas, em suas várias escalas.

Fonte: TOMA (2004)

A nanotecnologia, essa forma de manipulação de materiais em escala atômica tem potencial para trazer grandes benefícios para a sociedade contemporânea. Todavia, as propriedades que possibilitam a

criação de novos materiais, inovações em energia, manufatura e tratamentos médicos, também podem colocar em risco trabalhadores, consumidores, a população em geral e o meio ambiente (WALSH *et al.*, 2008). Os avanços na nanociência e na nanotecnologia, além de trazerem consigo benefícios para uma ampla gama de indústrias, estão atraindo rapidamente investimentos dos governos e de empresas multinacionais (SAYES *et al.*, 2004).

Contudo, esses avanços também provêm uma nova classe de contaminantes não biodegradáveis. O risco ambiental das nanopartículas, quando presentes no meio aquático, é originado principalmente pelo seu diminuto tamanho, que facilita a entrada desse poluente na cadeia trófica, inicialmente propiciando danos aos produtores e consumidores primários e em última instância, causando riscos aos seres humanos (ZARBIN, 2007). Dessa forma, a avaliação dos riscos associados às nanopartículas são de grande importância, visando elucidar as incertezas dos possíveis impactos causados por esses novos poluentes na saúde humana e no meio ambiente (SAYES *et al.*, 2004).

O crescente uso de nanomateriais nas mais diversas aplicações como em cerâmicas, catalisadores, filmes, nanoeletrônicos, biotecnologia e tintas anti-incrustantes, tem causado uma disponibilidade ambiental aumentada desses poluentes, intensificando assim os riscos de contaminação provenientes desse tipo de toxicante (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

As nanopartículas de óxido de cobre (NPCuO) são parte da formulação de polímeros e plásticos, bem como bioativos em tintas para impedir crescimento de organismos. Sua ação tem relação direta com a composição química do material superficial, a concentração de cobre dissolvido no corpo dos organismos e a bioatividade da camada nanoestruturada (CIOFFI *et al.*, 2005). Dessa forma, nanopartículas de óxido de cobre são comumente utilizadas para a composição de tintas anti-incrustantes para a pintura de cascos de barcos e navios (PERREAULT *et al.*, 2012), o que auxilia na redução do risco de crescimento e colonização de organismos marinhos nas embarcações, que são responsáveis pelo decréscimo da velocidade de navegação e consequente aumento do consumo de combustível (ALMEIDA *et al.*, 2007). Todavia, as nanopartículas podem ser fontes de contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo desgaste das tintas anti-incrustantes que tem a capacidade de liberar tanto o cobre na sua forma iônica solúvel como na forma de nanopartículas no meio ambiente circunvizinho (PERREAULT *et al.*, 2010).

Como esses contaminantes podem atingir os sistemas marinhos e estuarinos, e como no Brasil a navegação e extração de petróleo está sendo ampliada a cada ano em decorrência do crescimento econômico do país e da descoberta de petróleo na camada do Pré-Sal, é importante avaliar o potencial impacto da presença dessas nanopartículas à biota, mesmo em baixas concentrações, já que na maioria dos casos esses poluentes se encontrarão altamente diluídos e no ambiente aquático. Ainda são relativamente escassos os estudos feitos a respeito dos impactos dessas nanopartículas (KARLSSON *et al.*, 2009), reforçando assim a necessidade de entender o risco associado ao seu uso. Nesse contexto, ensaios de toxicidade crônica são metodologias aplicáveis para a avaliação desse tipo de impacto, considerando períodos de exposição prolongados.

## 2.2 TOXICOLOGIA AMBIENTAL E ECOTOXICOLOGIA

A toxicologia possui uma história paralela à da civilização, pois os seres humanos sempre tiveram conhecimento sobre os efeitos tóxicos causados por venenos de animais e plantas, bem como de alguns minerais. Um dos documentos que comprovam essa afirmação data de 1500 a.C., o Papiro de Ebers, que apresenta uma listagem de 800 ingredientes ativos, dentre os quais o chumbo, cobre, venenos de animais e vegetais tóxicos (OGA, 2003).

De forma literal, o termo toxicologia refere-se ao estudo dos venenos. A palavra tóxico é proveniente da palavra *toxicus* do latim, que significa veneno, derivada da palavra *toxikón* do Grego antigo que se referia a flechas envenenadas que eram utilizadas em combate. A história da toxicologia sempre foi focada no entendimento e usos de diferentes venenos. O senso comum aponta como veneno algo que após a sua ingestão pode causar a morte de um indivíduo instantaneamente, mas a toxicologia vem expandindo sua área de atuação como uma ciência moderna que visa elucidar os efeitos de substâncias na saúde de indivíduos e populações, não necessariamente causando letalidade (JAMES *et al.*, 2000).

Assim sendo, são importantes os conhecimentos de algumas definições básicas sobre os termos tóxico, toxicidade e toxicologia. Um tóxico possui a capacidade de produzir um efeito adverso ou indesejável à saúde, enquanto que a toxicidade é o efeito adverso em si, causado pelo tóxico. Já a toxicologia é a ciência que estuda a toxicidade causada a partir da exposição de organismos vivos, órgãos, culturas celulares e outros a determinados tóxicos, fazendo avaliações qualitativas e

quantitativas para identificação dos riscos associados (JAMES *et al.*, 2000).

Pelas suas características múltiplas, a toxicologia é uma ciência necessariamente construída a partir de outros conhecimentos. Sendo assim, (KLAASSEN e WATKINS, 2001), p. 11, definem a toxicologia como “...o estudo dos efeitos adversos dos químicos nos organismos vivos”, e quando tratam a toxicologia ambiental, assim como (OGA, 2003), afirmam que o objetivo desta última é estudar o impacto de substâncias químicas existentes no meio ambiente sobre os organismos vivos, enquanto que a ecotoxicologia é uma especialidade da toxicologia ambiental que concentra-se no estudo dos impactos de toxicantes na dinâmica de populações integradas em determinado ecossistema, geralmente excluindo os seres humanos (KLAASSEN e WATKINS, 2001).

A primeira definição de ecotoxicologia que foi cunhada por René Truhaut é “*the branch of Toxicology concerned with the study of toxic effects, caused by natural or synthetic pollutants, to the constituents of ecosystems, animal (including human), vegetable and microbial, in an integral context*” (TRUHAUT, 1977) o que é reafirmado por (HOFFMANN *et al.*, 2003) que descrevem a ecotoxicologia como sendo a ciência dos contaminantes presentes na biosfera que afetam todos os seres presentes nela.

Outra definição que confirma as anteriores é que a toxicologia ambiental é aquela que trata dos efeitos dos contaminantes ambientais na saúde e no meio ambiente. Esses contaminantes podem afetar de forma adversa a saúde dos organismos vivos, incluindo humanos, animais e plantas. O estudo da toxicologia ambiental é oportuno por reconhecer que a sobrevivência da espécie humana depende da qualidade e disponibilidade de ar e água limpos bem como de alimentos. Também é importante ressaltar que os compostos químicos de origem natural e antropogênica, causam deterioração dos ecossistemas e dos processos ecológicos, sendo que a toxicologia ambiental deve concentrar esforços no entendimento das interações entre humanos, animais e plantas e a influência na saúde e bem estar desses organismos (YU, 2005).

As pesquisas ecotoxicológicas foram rapidamente desenvolvidas por causa da poluição induzida pelo avanço industrial em todo o mundo, sendo que a velocidade desses estudos aumentou ainda mais quando alguns sérios acidentes industriais ocorreram, como por exemplo Seveso (1976), Minamata (1956) e Exxon Valdez (1989), tendo sido desenvolvidas várias políticas que tornaram a ecotoxicologia importante

parte da avaliação de risco ambiental e ecológico (KAHRU e DUBOURGUIER, 2010).

As atividades humanas ligadas ao comércio, agricultura e indústria afetam o meio ambiente e tornam cada vez mais necessário o entendimento, prevenção e combate aos efeitos causados pelas mudanças climáticas e compostos químicos aos ecossistemas. A ecotoxicologia tem mantido um esforço crescente para entender não apenas os efeitos de compostos químicos isolados, mas também o resultado das interações de misturas e de outros fatores que co-existem nos ecossistemas e que podem afetar a biodisponibilidade de tóxicos (FILSER, 2008).

A toxicologia ambiental tem como finalidade verificar as condições de risco para propor medidas preventivas, como o monitoramento ambiental e biológico e o controle das fontes emissoras de poluição. Para que isso ocorra é necessário conhecer as fontes de poluição, interações entre os poluentes, os mecanismos naturais de remoção dos mesmos, bem como fatores climatológicos e geográficos que poderiam aumentar ou diminuir os riscos (PASSARELLI, 2003).

Dessa maneira, o estudo de substâncias tóxicas em compartimentos ambientais é um dos principais alvos da toxicologia ambiental para elucidar os efeitos destes sobre os organismos e ao mesmo tempo subsidiar a tomada de decisões quanto às ações a serem desencadeadas nas áreas pesquisadas.

Entre mil e duas mil e duas mil novas substâncias químicas são disponibilizadas ao mercado a cada ano (FREITAS *et al.*, 2002) e a toxicidade destas na maioria dos casos é completamente desconhecida. Muitas vezes esses compostos são testados para o seu uso, mas quando em contato com o meio ambiente são absorvidos pelo solo, matéria orgânica, água e ar e interagem com os organismos vivos e acumulando-se na cadeia trófica. Esses acúmulos de tóxicos podem causar alterações nos seres vivos em todos os níveis da cadeia, resultando em debilidades no metabolismo e conseqüente desencadeamento de doenças, já que essa exposição a múltiplos xenobóticos podem causar efeitos sinérgicos, aditivos ou antagonísticos (VERSLYCKE *et al.*, 2003). Um exemplo de compostos que possuem esse tipo de comportamento são os organoclorados, utilizados como pesticidas e que são substâncias recalcitrantes, ou seja, persistentes no meio ambiente, encontradas comumente em seres humanos pela ingestão de água e alimentos contaminados (LEIDY, 2004). Muitos desses efeitos são detectados apenas após longos períodos de exposição, caracterizando assim os chamados efeitos crônicos.

### 2.2.1 Estudos de Toxicidade Crônica

Os estudos de toxicidade crônica em ambientes aquáticos são uma tendência da ecotoxicologia, já que em muitos casos os contaminantes desse compartimento encontram-se altamente diluídos e não oferecem doses suficientes para o aparecimento de efeitos agudos. Para que esses estudos sejam desenvolvidos, alguns fatores são de fundamental importância, como por exemplo, o tipo de organismo mais adequado (KWOK *et al.*, 2008), o tempo em que o estudo será realizado, as características que serão acompanhadas e os efeitos observados sob essas características. Como os invertebrados representam 95% de todas as espécies animais conhecidas (VERSLYCKE *et al.*, 2007) eles são elementos críticos para a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas. Nesse grupo de animais estão contidos os crustáceos, organismos que tem seus processos fisiológicos como o crescimento e reprodução regulados por hormônios (VERSLYCKE *et al.*, 2007).

Os misidáceos tem sido notoriamente utilizados como organismos teste padronizados para avaliação da toxicidade de ambientes marinhos e estuarinos por causa da sua relevância ecológica, ampla distribuição geográfica, facilidade de transporte, cultura em laboratório e sensibilidade a contaminantes (GHEKIERE *et al.*, 2006a), tornando-os assim adequados para o reconhecimento de condições tóxicas em ambientes aquáticos. Como são encontrados desde 80° N até 80° S e ocorrem na maioria dos ambientes aquáticos, são importantes fontes de alimento em áreas de água doce, estuarinas e marinhas (OECD, 2006), sendo assim importantes membros da cadeia trófica.

A partir do reconhecimento da espécie a ser utilizada, deve-se definir o tempo que o estudo será realizado, sendo que normalmente para a realização de estudos de toxicidade crônica se faz necessária a aplicação dos mesmos em um período que corresponda preferencialmente a todo o ciclo de vida do organismo utilizado. No caso de testes de ecotoxicidade crônica, esse período pode ser correspondente a  $\pm 1/10$  do ciclo de vida do organismo alvo. Esses estudos também são chamados de testes de longa duração e tem como objetivo observar os efeitos subletais e fisiológicos, incluindo as taxas de crescimento e reprodução, visto que a toxicidade crônica é decorrência de dois mecanismos distintos, sendo o primeiro pela acumulação do xenobiótico no organismo e o segundo pela adição dos efeitos causados por repetidas exposições sem a ocorrência de acúmulo (CHASIN e AZEVEDO, 2003).

As características a acompanhar durante e ao final dos testes crônicos estão normalmente ligadas ao comportamento dos organismos ou a determinadas características físicas, fisiológicas, histológicas e bioquímicas, conforme Quadro 1.

Quadro 1: Características físicas, fisiológicas, histológicas e bioquímicas citadas por autores para identificação de efeitos crônicos em testes de toxicidade para organismos aquáticos e terrestres.

Característica	Autores
Mortalidade/ Sobrevivência	(RAUSINA <i>et al.</i> , 2002); (LEDUC <i>et al.</i> , 2008); (BILLOIR <i>et al.</i> , 2007); (LOPES <i>et al.</i> , 2005); (RÖMBKE e MOSER, 2002); (CHÈVRE <i>et al.</i> , 2005); (RÖMBKE e MOSER, 2002); (MCKENNEY JR e CELESTIAL, 1996)
Reprodução	(RAUSINA <i>et al.</i> , 2002); (GHEKIERE <i>et al.</i> , 2004); (CHÈVRE <i>et al.</i> , 2005); (FOCKEHEY <i>et al.</i> , 2005); (LEDUC <i>et al.</i> , 2008); (BILLOIR <i>et al.</i> , 2007); (LOPES <i>et al.</i> , 2005); (THORPE <i>et al.</i> , 2007); (MCKENNEY, 2005); (RÖMBKE e MOSER, 2002); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007); (MCKENNEY JR e CELESTIAL, 1996); (HELLING <i>et al.</i> , 2000)
Comprimento	(RAUSINA <i>et al.</i> , 2002); (LESUTIENÉ <i>et al.</i> , 2008); (LOWE e BUTT, 2007); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2004b); (FOCKEHEY <i>et al.</i> , 2005); (LEDUC <i>et al.</i> , 2008); (BILLOIR <i>et al.</i> , 2007); (LOPES <i>et al.</i> , 2005); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007); (MCKENNEY JR e CELESTIAL, 1996); (GAMA <i>et al.</i> , 2006); (GOROKHOVA, 1998); (HELLING <i>et al.</i> , 2000)
Peso seco	(RAUSINA <i>et al.</i> , 2002); (LESUTIENÉ <i>et al.</i> , 2008); (MCKENNEY JR e CELESTIAL, 1996)

Continuação - Quadro 1: Características físicas, fisiológicas, histológicas e bioquímicas citadas por autores para identificação de efeitos crônicos em testes de toxicidade para organismos aquáticos e terrestres.

Comportamento	(ROAST <i>et al.</i> , 1998); (ROAST <i>et al.</i> , 2000b); (ROAST <i>et al.</i> , 2000a); (ROAST <i>et al.</i> , 2002); (FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005)
Tamanho do Telson	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2006a)
Tamanho do Exópodo	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2006a)
Tamanho do Endópodo	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2006a)
Taxa de mudas	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2006a); (FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005); (NOPPE <i>et al.</i> , 2007); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007); (GOROKHOVA, 2002); (GAMA <i>et al.</i> , 2006)
Abundância populacional	(LESUTIENĚ <i>et al.</i> , 2008); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007)
Metabolismo de energia e esteroides	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2004); (FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005); (SUBRAMONIAM, 2000); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007)
Maturação sexual	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2004); (LOWE e BUTT, 2007); (MCKENNEY JR e CELESTIAL, 1996)
Fecundidade na 1ª geração	(OLIVEIRA-FILHO <i>et al.</i> , 2009); (LOWE e BUTT, 2007); (GHEKIERE <i>et al.</i> , 2005)
Fecundidade na 2ª geração	(OLIVEIRA-FILHO <i>et al.</i> , 2009)
Alocação de Energia celular	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2004a); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2004b); (ERK <i>et al.</i> , 2008)
Reservas energéticas	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2004a)
Consumo de energia	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2004a)
Consumo de oxigênio	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2004b)
Idade para a maturação sexual	(FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005)
Tamanho para a maturação sexual	(FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005)
Tempo para a 1ª reprodução	(FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005); (GHEKIERE <i>et al.</i> , 2005)
Tamanho dos neonatos	(FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005)
Morfologia	(FOCKEDEV <i>et al.</i> , 2005); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007)

Continuação - Quadro 1: Características físicas, fisiológicas, histológicas e bioquímicas citadas por autores para identificação de efeitos crônicos em testes de toxicidade para organismos aquáticos e terrestres.

Número de ovos	(LEDUC <i>et al.</i> , 2008)
Composição bioquímica	(FOCKEY <i>et al.</i> , 2005)
Desenvolvimento marsupial e intramarsupial	(FOCKEY <i>et al.</i> , 2006); (WORTHAM-NEAL e PRICE, 2002); (VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007)
Tempo de desenvolvimento dos ovos	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2005)
Desova	(THORPE <i>et al.</i> , 2007)
Citocromo P450	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007)
Vitelogênese	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007); (GHEKIERE <i>et al.</i> , 2006b)
Histologia	(VERSLYCKE <i>et al.</i> , 2007)
Embriogênese	(GHEKIERE <i>et al.</i> , 2007)
Consumo de Alimento	(GOROKHOVA, 1998)

Como os crustáceos têm seus processos biológicos regulados por um complexo sistema endócrino (VERSLYCKE *et al.*, 2007), as características citadas anteriormente são afetadas por compostos que possam interagir com esse sistema. Os misidáceos em especial, têm sido usados por mais de três décadas em testes de ecotoxicidade, já que estão entre as espécies mais sensíveis da comunidade marinha (OECD, 2006). As espécies citadas pela OECD como utilizadas normalmente para esses tipos de testes são *Americamysis bahia* (MOLENOCK, 1969), *Holmesimysis costata* (HOLMES, 1900), *Mysidopsis intii* (HOLMQUIST, 1957), *Neomysis integer* (LEACH, 1914), *Americamysis almyra* (BOWMAN, 1964), *Americamysis bigelowi* (W. TATTERSALL, 1926), *Neomysis mercedis* (HOLMES, 1897), *Neomysis americana* (S.I. SMITH, 1874), *Praunus flexuosus* (MÜLLER, 1776) e *Tenagomysis novaezealandiae* (THOMSON, 1900).

Nos Estados Unidos, a EPA (*Environmental Protection Agency*), desenvolveu uma metodologia para teste de toxicidade crônica de ciclo de vida, adequado para misidáceos das espécies *Mysidopsis bahia*, *Homelsimysis costata*, *Mysidopsis intii* e *Neomysis integer* (USEPA, 2002a), considerados apropriados para o clima norte

americano. A mesma agência também define um método para testes de toxicidade crônica de curta duração (7 dias), para o misidáceo da espécie *Mysidopsis bahia* (USEPA, 2002b). Já a ASTM (*American Society for Testing and Materials*), sugere o uso das espécies *Mysidopsis bahia* e *Mysidopsis bigelowi* (ASTM, 2008).

A espécie *Mysidopsis juniae* não foi citada em nenhum dos documentos padronizados pela EPA e pela ASTM, demonstrando a necessidade de desenvolvimento de estudos para a verificação da viabilidade de padronização desse organismo para testes de toxicidade crônicos, já que essa é uma das espécies nativas de misidáceos do Brasil, encontrada no canal de São Sebastião em São Paulo (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002) e padronizada para ensaios de toxicidade aguda pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2011).

Vários estudos para verificação da toxicidade aguda já foram realizados no Brasil com esse organismo, como por exemplo, os efeitos do benzeno na capacidade de nado (MARTINEZ *et al.*, 1992), a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas (PRÓSPERI, 1992), a avaliação da toxicidade de tintas anti-incrustantes (CASTRO *et al.*, 2011), o monitoramento do Canal de São Sebastião em São Paulo (LOPES *et al.*, 1997), análise de risco dos resíduos do herbicida quinclorac em áreas de rizicultura irrigada (REGALLA JR. *et al.*, 2007). Em Santa Catarina, um estudo a partir de uma revisão da literatura, demonstrou que os misidáceos estão entre os mais sensíveis organismos para as substâncias de referência Cobre, Cromo, Zinco e Dodecil Sulfato de Sódio (REGALLA JR. e LAITANO, 2002). Esses e outros estudos subsidiam a possibilidade do uso de *M. juniae* como uma espécie adequada para testes de toxicidade crônica.

Na década de 90, um estudo de toxicidade crônica de curta duração foi realizado no canal de São Sebastião em São Paulo com *M. juniae*, porém o estudo que colecionou amostras durante 18 meses não apresentou diferenças significativas nas variáveis relacionadas ao tamanho e à sobrevivência dos organismos. No quesito fecundidade, os valores do controle não se encaixaram dentro do mínimo aceitável e apenas o peso seco apresentou variação em algumas das amostras coletadas. Foram também observadas anormalidades morfológicas no desenvolvimento do urópodo e do télson (BADARÓ-PEDROSO e NIPPER, 1993).

Já no ano de 2010, uma adaptação do padrão de curta duração sugerido pela EPA, foi utilizada para avaliar a toxicidade de amostras de efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiá/Potengi em Natal no Rio Grande do Norte. Apesar dos efeitos sobre a sobrevivência e a

fecundidade terem se mostrado eficientes para a análise de efluentes, uma amostra onde a concentração de xenobióticos normalmente está mais elevada que em uma amostra ambiental, o estudo concluiu que a mensuração do peso seco, sugerida pela norma é inviável (NICODEMO, 2010).

Estes estudos preliminares feitos com a espécie, utilizando os padrões de curta duração sugeridos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, reforçam a necessidade de definição de um padrão para teste de toxicidade crônica de longa duração, com misidáceos encontrados no Brasil, já que os estudos realizados com o padrão americano apresentaram nos dois casos citados determinada ineficiência, seja pela dificuldade de mensuração de alguma característica, como por exemplo o peso seco (NICODEMO, 2010), como pela não verificação de efeitos adversos na presença de poluentes ou não aceitabilidade dos resultados (BADARÓ-PEDROSO e NIPPER, 1993).

### 2.3 O ORGANISMO MARINHO *Mysidopsis juniae*

Os misidáceos (*Crustacea: Mysidae*) são pequenos crustáceos semelhantes a camarões, e possuem como característica específica a presença de uma pequena bolsa para armazenar e carregar seus filhotes, conhecida como marsúpio (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002; MAUCLINE, 1982).

Os misidáceos pertencem à superordem Pericarida com aproximadamente 1188 espécies (MESS, 2012) já descritas, representando a maior parte da dieta de determinados peixes. A classificação do organismo *Mysidopsis juniae* é a seguinte (MESS, 2012):

Reino: Animalia  
Filo: Arthropoda  
Subfilo: Crustacea  
Classe: Malacostraca  
Subclasse: Eumalacostraca  
Superordem: Pericarida  
Ordem: Mysida  
Família: Mysidae  
Gênero: *Mysidopsis*  
Espécie: *Mysidopsis juniae*

Esses organismos possuem características para o uso em testes de toxicidade pelo seu ciclo de vida curto (aproximadamente 60 dias), sensibilidade a uma ampla variedade tóxicos, facilidade de manuseio e cultivo em laboratório (NIMMO e HAMAKER, 1982; NIPPER *et al.*, 1993).

A Figura 2 apresenta exemplares de *Mysidopsis juniae* (SILVA,1979) (CRUSTACEA: MYSIDACEA), com destaque para o marsúpio da fêmea.



Figura 2: Exemplares de *Mysidopsis juniae*. (a) Fêmea com destaque para o marsúpio (b) macho.

No Brasil, alguns estudos e normas técnicas definem os padrões para o cultivo de *M. juniae* em laboratório. Essas condições gerais de cultivo recomendadas (ABNT, 2011; BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002; CETESB, 1992) são resumidas no Quadro 2.

Os misidáceos são omnívoros (ORTEGA-SALAS *et al.*, 2008) e podem se alimentar de pequenas partículas aderidas à superfície do corpo bem como capturar organismos planctônicos. A distribuição geográfica das espécies de misidáceos não é totalmente conhecida, mas sabe-se que eles são encontrados nos três maiores oceanos e em todas latitudes, cobrindo diferentes condições de temperatura (MAUCLINE, 1982).

A reprodução é sexuada e os estágios reprodutivos compreendem a oviposição e fertilização, seguida pelo desenvolvimento marsupial e pós-marsupial. Nos estágios de oviposição e fertilização os ovos são transportados através do oviduto para o marsúpio, após a fertilização. No desenvolvimento marsupial, os juvenis passam por três estágios principais: embrionário, larval e pós-larval. Após o desenvolvimento marsupial, os organismos chegam ao estágio de juvenis, quando eles são liberados do marsúpio (WITTMANN, 1981).

Quadro 2: Resumo das condições de cultivo e manutenção de *Mysidopsis juniae* em laboratório.

Item	(BADARÓ- PEDROSO <i>et al.</i> , 2002)	(CETESB, 1992)	(ABNT, 2011)
Água de diluição	Água do mar filtrada sequencialmente através de membrana de celulose de 25 e 3 µm e carvão ativado	Água marinha natural (limpa e filtrada), ou reconstituída com pH entre 7,8 e 8,3	Água do mar natural ou reconstituída, pH de 7,8 a 8,3
Volume de água de diluição	50 mL/indivíduo jovem até atingir a maturidade sexual e depois 100 mL/indivíduo adulto	1 misidáceo/ 100 mL para adultos e 1 misidáceo para 50 mL para juvenis	1 adulto reprodutor/ 100 mL ou 50 mL para cada jovem
Troca de água	Duas vezes por semana, sendo a primeira total e a segunda 1/3 do volume	Uma troca total e outra para separação dos filhotes e retirada de sujeira	Renovação total semanal
Recipiente de cultivo	Cubas de polietileno ou de vidro, com capacidade de 10 litros	Material inerte, transparente e com tampa	Recipiente de vidro ou outro material inerte
Número de organismo / recipiente	200 jovens e após a separação de machos e fêmeas, manter 3 fêmeas: 1 macho (em geral 60 fêmeas: 20 machos)	80 a 100 (de acordo com o tamanho do recipiente – 8 ou 10 L)	Depende do volume do recipiente. A proporção é de 1 macho para 4 fêmeas.

Continuação – Quadro 2: Resumo das condições de cultivo e manutenção de *Mysidopsis juniae* em laboratório.

Item	(BADARÓ- PEDROSO <i>et al.</i> , 2002)	(CETESB, 1992)	(ABNT, 2011)
Alimentação	Diariamente são fornecidos náuplios de <i>Artemia sp.</i> enriquecidos com óleo de fígado de bacalhau e óleo de peixe, na proporção de 0,1 mL de cada óleo para 100 mL de água do mar. A Alimentação é diferenciada de acordo com a idade dos organismos	Diária com náuplios de <i>Artemia</i> com 24 horas ou com 72 horas enriquecida com óleo de fígado de bacalhau e óleo de peixe. A quantidade de náuplios fornecida varia de acordo com a idade e número de misidáceos.	Náuplios de <i>Artemia sp.</i> com 72 h de idade, enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau na proporção de 0,1 mL de cada um dos óleos para 100 mL de água de cultivo. A quantidade de náuplios fornecida diariamente por organismo varia conforme a idade.
Salinidade	33,5±1,5‰	32 a 36‰	32 a 36‰
Luz	Usual em laboratório	120 a 300 lux	Luminosidade difusa
Fotoperíodo	16 h luz 8 h escuro	12 a 16 horas de luz	12 a 16 horas de luz
Aeração	Suave	OD acima de 4 mg.L <sup>-1</sup>	Constante e suave
Temperatura	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	23 a 27 °C
Controles diários	Temperatura da água, ambiente (máxima e mínima), aeração e quantidade de alimento	Aeração e temperatura máxima e mínima da cultura	-

Continuação – Quadro 2: Resumo das condições de cultivo e manutenção de *Mysidopsis juniae* em laboratório.

Item	(BADARÓ- PEDROSO <i>et al.</i> , 2002)	(CETESB, 1992)	(ABNT, 2011)
Controle de sensibilidade das culturas	Teste mensal com a substância de referência sulfato de zinco ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	Mensal com sulfato de zinco ou dodecil sulfato de sódio	Mensal. Deve-se manter carta controle montada a partir de testes com substância referência sulfato de zinco ou dodecil sulfato de sódio.
Controles semanais	O número de adultos é registrado a cada troca total de água, níveis de amônia e nitrito, OD, pH e salinidade.	Salinidade, pH, OD, amônia, nitrito.	-

Para o desenvolvimento de uma metodologia utilizando misidáceos como organismo teste, podem ser utilizadas ferramentas de engenharia para auxiliar nas decisões e tomadas de ação, buscando garantir um método adequado para atender às necessidades relacionadas à avaliação toxicológica.

## 2.4 FERRAMENTAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS E PROCESSOS

Para o desenvolvimento de um produto ou processo, algumas ferramentas de engenharia podem auxiliar na concepção inicial, definição de padrões e ações preventivas, visando conceber um produto e processo adequado às necessidades específicas a que se propõe com robustez para garantia dos resultados esperados.

Neste capítulo serão tratadas três ferramentas utilizadas para o desenvolvimento do método de toxicidade crônica, a saber, o Desdobramento da Função Qualidade, a Análise de Modos e Efeitos de Falhas e a metodologia *Six Sigma*.

#### **2.4.1 Desdobramento da Função Qualidade**

O desdobramento da função qualidade tem como finalidade principal assegurar que o projeto final de um produto ou serviço atenda às necessidades para as quais foi proposto (MARTINS e LAUGENI, 2006; SLACK *et al.*, 2009), sendo uma ferramenta auxiliar no projeto e desenvolvimento de produtos e processos (ROZENFELD *et al.*, 2006). Um modelo da matriz é apresentado no Apêndice A1.

Essa ferramenta tenciona identificar as relações entre os objetivos e as características técnicas para esse atendimento, bem como as interações entre esses fatores. O Desdobramento da Função Qualidade - QFD (*Quality Function Deployment*), conhecida também como casa da qualidade, é uma ferramenta que foi desenvolvida no Japão no final da década de 70 no estaleiro da Mitsubishi (SLACK *et al.*, 2009), que teve a finalidade de integrar necessidades definidas por clientes ao desenvolvimento de produtos e processos. Essa ferramenta foi uma resposta ao movimento do controle da qualidade total (TQC) (FERNANDES e REBELATO, 2006).

Cada ciclo do QFD relaciona as necessidades ("objetivos") com os requisitos ("como se deseja fazer"), buscando identificar na matriz de relacionamento a intensidade dessa relação entre eles por meio do uso de símbolos (FERNANDES e REBELATO, 2006).

Na matriz estão contidas as seções “quês” (requisitos), “comos” (forma de atendimento do requisito), avaliação competitiva (comparação com outros produtos ou processos já existentes), relacionamento de “quês” versus “comos”, avaliação técnica e a relação de “comos” versus “comos”. Embora detalhes do QFD possam variar, o princípio comum é a busca pela identificação dos requisitos para um produto ou serviço e relacioná-los com características que traduzam esses objetivos na prática (MARTINS e LAUGENI, 2006; SLACK *et al.*, 2009). A Figura 3 explicita de forma esquemática uma matriz QFD.

Para o preenchimento da matriz, devem ser em primeira instância avaliados os requisitos (“quês”). Estes serão os norteadores para o desenvolvimento do produto ou processo. Para cada um dos “quês” (1) deverão ser avaliadas formas de atendimento, representadas pelos “comos” (2). Esse item deverá ser uma especificação técnica capaz de

satisfazer o máximo dos requisitos especificados. Após o preenchimento dos primeiros dois itens, é iniciado o processo de classificação. Primeiramente é elaborada uma escala de importância (3) para o requisito e preenchida no campo, sendo o mais relevante com nota dez e os menos relevantes com notas inferiores, buscando estabelecer uma ordem de prioridade (SLACK *et al.*, 2009).

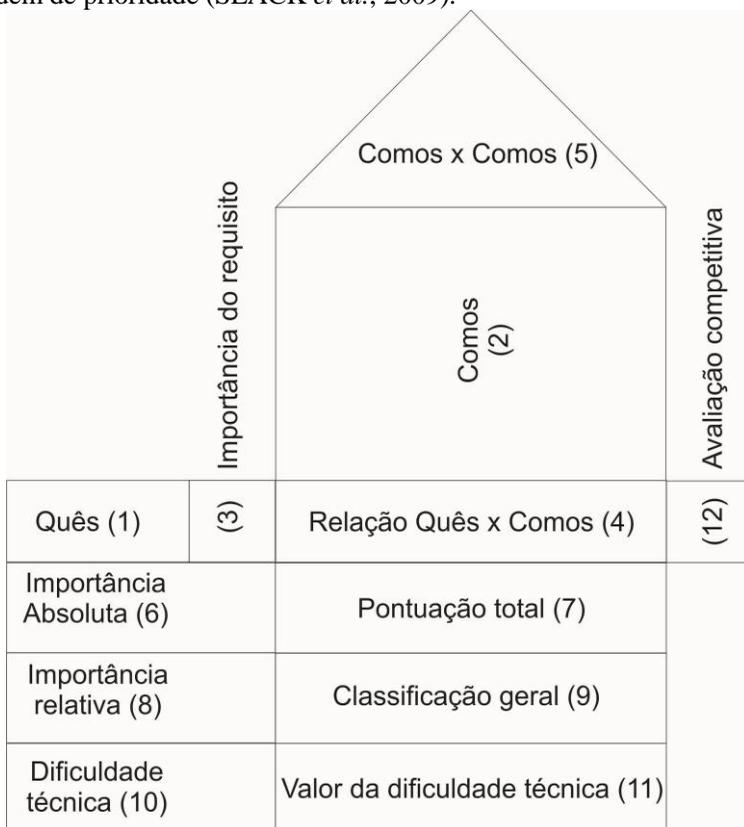


Figura 3: Diagrama esquemático de uma matriz QFD explicitando os campos a serem preenchidos para o processo de análise de características versus métodos.

Fonte: Adaptado de (SLACK *et al.*, 2009)

Efetuada essa pontuação, procede-se com a avaliação dos “quês x comos”. Essa relação é feita por meio de símbolos que possuem um valor intrínseco. Essa simbologia é apresentada no Quadro 3. Quanto mais forte a relação, maior o valor que deve ser atribuído.

Quadro 3: Simbologia a ser utilizada para a avaliação das relações "quês x comos" na matriz QFD.

Símbolo	Significado	Valor associado
●	Relações fortes	9
○	Relações médias	3
△	Relações fracas	1

Fonte: (SLACK *et al.*, 2009)

Terminado o preenchimento das relações “quês x comos”, é iniciado o processo para avaliar os “comos x comos”. Para essa avaliação também é utilizada uma simbologia, porém apenas de forma qualitativa, não havendo um valor numérico associado ao símbolo. Essa atividade tem como objetivo identificar se algum dos “comos” selecionado para atender aos “quês”, pode sofrer ou causar interferência em outro “como” (SLACK *et al.*, 2009). A simbologia para classificação desse quesito é apresentada no Quadro 4.

Quadro 4: Simbologia para relacionamento de “comos x comos” na matriz QFD.

Símbolo	Significado
●	Fortemente positivo
○	Positivo
*	Negativo
◇	Fortemente negativo

Fonte: (SLACK *et al.*, 2009)

Vencida a etapa de classificação e relacionamento, é calculada a importância absoluta de cada um dos “comos”, por meio da multiplicação dos valores atribuídos na importância dos requisitos (3) com o valor intrínseco de cada um dos símbolos do relacionamento “quês x comos”. O somatório dessa multiplicação resulta na pontuação total (7) da importância absoluta (6) (MARTINS e LAUGENI, 2006; SLACK *et al.*, 2009).

A classificação geral (9) é uma ordenação decrescente dos valores da pontuação total, representando assim a importância relativa (8).

No campo de dificuldade técnica é estabelecida uma escala de 1 a 5, sendo 5 para “comos” com grande dificuldade de execução e 1 para baixíssima dificuldade de execução. Valores intermediários são

permitidos. Esta etapa tem como objetivo informar os “comos” com menor dificuldade técnica para sua consecução (SLACK *et al.*, 2009).

A última etapa trata da comparação dos “quês” do produto ou processo entre o desenvolvimento proposto e outros já ofertados. Nesta fase, verifica-se se a proposta está oferecendo um produto, processo ou serviço melhorado em relação ao que já está disponível (SLACK *et al.*, 2009).

De posse de todas essas informações, é possível estabelecer a melhor relação de como atender determinados requisitos, buscando garantir um produto, processo ou serviço de alta qualidade.

Apesar do uso da Matriz QFD orientar a forma para o atendimento a requisitos de um produto, processo ou serviço, é essencial que durante o processo de desenvolvimento sejam avaliadas as possíveis falhas de cada um dos “comos”, tendo como intenção, desenvolver medidas mitigadoras, de forma a garantir a robustez do produto, processo ou serviço desenvolvido. Para tal, a análise dos modos e efeitos de falhas é uma ferramenta que pode ser de grande valia.

#### **2.4.2 Análise dos modos e efeitos de falhas**

Sempre que um processo é executado, existe a possibilidade da ocorrência de falhas. Atuar apenas na correção de falhas causa impacto direto no tempo de execução e custos de um processo, além de possibilitar a baixa confiabilidade nos resultados obtidos. As falhas podem ocorrer por fatores humanos, materiais ou procedimentais (SLACK *et al.*, 2009).

A Análise dos Modos e Efeitos de Falhas - FMEA (*Failure Modes and Effect Analysis*) tem por objetivo a identificação das falhas potenciais em produtos e processos e direcionar para medidas de prevenção dessas falhas antes que elas ocorram (MCDERMOTT *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2009). Essa ferramenta foca na prevenção de defeitos, melhoria da segurança e satisfação de clientes e preferencialmente deve ser aplicada durante a fase de desenvolvimento de produtos e processos em todos os seus estágios (MCDERMOTT *et al.*, 2009; ROZENFELD *et al.*, 2006).

A FMEA é uma ferramenta que foi desenvolvida na década de 60, durante a missão Apollo, pela agência norte-americana NASA (*National Aeronautics and Space Administration*). Essa metodologia orienta a identificação de forma sistemática das potenciais falhas em sistemas, processos ou serviços. Identifica efeitos, causas e, a partir disso, proporciona condições para a definição de ações que vislumbram

minimizar ou eliminar os riscos associados a essas falhas. Apesar dessa ferramenta ter sido desenvolvida na década de 60, apenas no final da década de 70 ela passou a ser utilizada pela Ford Motors Company para a fabricação de automóveis, tornando-a amplamente conhecida para o desenvolvimento de produtos e processos (FERNANDES e REBELATO, 2006; MCDERMOTT *et al.*, 2009).

A FMEA de processos pode ser aplicada em um a ampla variedade de situações relacionadas a produtos e serviços, não apenas por organizações de manufatura como também para serviços, empresas com ou sem fins lucrativos, públicas, privadas, ou outras organizações governamentais e não governamentais. Essa ferramenta pode dar suporte a qualquer tipo de processo ou de projeto (MCDERMOTT *et al.*, 2009).

A FMEA consiste em avaliar todas as possibilidades de falhas em produtos e processos (MARTINS e LAUGENI, 2006). Uma falha pode ser um mau funcionamento ou a perda completa da função. Para avaliar a potencialidade de uma falha ocorrer, a FMEA considera a severidade de cada falha, ou seja, as consequências decorrentes da existência da falha, a probabilidade ou frequência da falha ocorrer e por último a detecção da falha, que trata da probabilidade de detectar a falha caso ela ocorra (MCDERMOTT *et al.*, 2009). A partir das três componentes, severidade, ocorrência e detecção, o método promove a priorização dos modos de falha que acarretam os maiores riscos e que merecem atenção (FERNANDES e REBELATO, 2006).

A aplicação da ferramenta para o desenvolvimento de processos acontece por meio de uma sucessão de etapas, sendo iniciada pela definição de um líder para a FMEA e a formação de uma equipe que possua conhecimento sobre o processo ou produto a ser avaliado. As etapas subsequentes consistem na identificação de todas as fases do processo, listagem das formas pelas quais estes processos poderiam falhar, identificação dos efeitos dessas falhas, identificação das causas potenciais, avaliação da severidade, ocorrência e detecção da falha, cálculo do número de priorização de risco (NPR), planejamento de ações para minimização das falhas, execução das ações para minimização do risco de falha e recálculo do NPR (MCDERMOTT *et al.*, 2009; SLACK *et al.*, 2009). Para a organização de todas essas informações a FMEA utiliza uma folha de trabalho (worksheet) (Apêndice A2). A análise qualitativa é convertida em numérica com os itens severidade, ocorrência e detecção pontuados em escala de 1 a 10.

O Quadro 5 sugere a escala de pontuação a ser aplicada para a Severidade, o Quadro 6 para a Ocorrência e o Quadro 7 para a Detecção.

Quadro 5: Escala da pontuação para classificação da severidade

Severidade	Descrição
1	Severidade pequena
2 a 3	Severidade baixa
4 a 6	Severidade moderada
7 a 8	Alta severidade
9	Severidade muito alta
10	Severidade catastrófica

Fonte: (SLACK *et al.*, 2009)

Quadro 6: Escala de pontuação para a classificação da ocorrência

Ocorrência	Descrição
1	Probabilidade remota de ocorrência
2 a 3	Baixa probabilidade de ocorrência
4 a 6	Probabilidade moderada de ocorrência
7 a 8	Alta probabilidade de ocorrência
9 a 10	Probabilidade muito alta de ocorrência

Fonte: (SLACK *et al.*, 2009)

Quadro 7: escala de pontuação para a classificação da detecção

Detecção	Descrição
1	Probabilidade remota que o defeito passe despercebido
2 a 3	Baixa probabilidade que o defeito passe despercebido
4 a 6	Probabilidade moderada que o defeito passe despercebido
7 a 8	Probabilidade alta que o defeito passe despercebido
9 a 10	Probabilidade muito alta que o defeito passe despercebido

Fonte: (SLACK *et al.*, 2009)

A partir da pontuação definida para cada uma das falhas analisadas na FMEA é possível o cálculo do número de priorização de risco (NPR), por meio da multiplicação da severidade pela ocorrência e pela detecção. Quanto maior o valor do NPR, maior o risco de determinada falha. Dessa maneira, devem ser priorizadas para ações as falhas que possuem os maiores valores de NPR, sendo que estas devem possuir ações que visem a minimização desse risco.

Outras ferramentas podem auxiliar na análise para a concepção do novo produto ou processo, como por exemplo as empregadas pela metodologia 6 Sigma (Six Sigma)

### **2.4.3 Ferramentas da Metodologia Six Sigma**

O Six Sigma ( $6\sigma$ ) é composto por um conjunto de ferramentas para análise e solução de problemas. Essa metodologia teve origem na Motorola em meados da década de 80 para melhorar a satisfação dos clientes por meio da melhoria da qualidade e redução de custos (LARSON, 2003). Muitas companhias como a General Electric, Allied Signal, Raytheon e Delphi Automotive tem implementado o  $6\sigma$  e transformado seus processos produtivos, por meio da melhoria da performance operacional (CHAKRAVORTY, 2009).

A metodologia  $6\sigma$  tem como princípio a melhoria contínua de produtos, processos e serviços, sendo que muitas das ferramentas incorporadas a ela buscam por meio da análise estatística direcionar a tomada de decisão (JACOBS e CHASE, 2009). Neste trabalho serão utilizadas as ferramentas de mapa de raciocínio (*mind map*), planejamento de experimentos - DOE (*Design of Experiments*) e análise de sistema de medição (ASM).

Os mapas de raciocínio, ou mapas mentais são elaborados com o intuito de organizar o raciocínio crítico e reter informações acerca de um problema que está sendo estudado, facilitando a compreensão de informações essenciais (NOONAN, 2012), evitando idas e vindas repetidas do pesquisador a um mesmo tema.

Os mapas de raciocínio possuem forma livre, geração ilimitada de informações, ideias e ligações, que auxiliam na promoção da criatividade e no raciocínio crítico por meio do domínio do conhecimento. Estes mapas incitam à solução de problemas, organizando o pensamento de forma não linear e estabelecendo relações (NOONAN, 2012).

Para a construção de um mapa de raciocínio é necessário o desenho na área central de uma folha de papel, com o tópico principal a ser estudado. A este tópico são ligadas linhas curvas com os subitens que buscam elucidar o tópico principal. Cada um dos subitens deve receber uma nomenclatura ou uma imagem para identificá-lo. Cada subitem deve estar ligado ao tópico principal ou a outro subitem por meio de uma linha curva, que é usada para fazer o relacionamento entre os itens (NOONAN, 2012). A partir das hipóteses traçadas no mapa de

raciocínio é possível planejar experimentos para a aceitação ou rejeição das hipóteses. Esses experimentos são elaborados por meio da ferramenta DOE – *Design of Experiments*.

O DOE é uma ferramenta que propicia o desenvolvimento de estudos utilizando múltiplas variáveis ao mesmo tempo (JACOBS e CHASE, 2009), minimizando a quantidade de experimentos necessários, além de favorecer o entendimento das interações entre as variáveis analisadas. Conceitualmente, ele é um planejamento fatorial, no qual se estabelecem os fatores e os níveis de avaliação. Os DOE são técnicas eficientes de experimentação que identificam as variáveis chave para um processo (Xs) e seus valores ideais para obtenção de resultados (Ys) com mínimas variações. Ele também fornece informações acerca do que é crítico e não crítico ao processo por meio de modelos de regressão não linear multivariada (TAGHIZADEGAN, 2006).

O DOE é avaliado estatisticamente pela análise de variâncias (ANOVA). A rigor, devem ser estabelecidas em um plano de amostragem as condições nas quais determinadas variáveis devem ser testadas. A tabulação dos resultados indicará quais das variáveis influenciam de forma mais relevante as respostas medidas (BAAS, 2007). Porém, para que seja possível a correta análise das variações que um processo sofre em decorrência de mudanças nos níveis de variáveis, torna-se necessário avaliar se o sistema de medição é adequado para esse fim.

Dessa maneira, outra ferramenta de grande valia é a análise de sistemas de medição (ASM), que tem por objetivo avaliar se um sistema de medição é confiável (TAGHIZADEGAN, 2006) e se as variações causadas por ele não interferem nos resultados do que está sendo medido, já que um sistema que lê medidas incorretamente, necessariamente leva a conclusões errôneas (BAAS, 2007).

Espera-se que um sistema de medição consiga apresentar precisão, ou seja, se uma mesma peça é medida repetidas vezes pelo mesmo instrumento, o valor encontrado em cada medida deveria ser precisamente igual. Quando se fala em precisão, basicamente o que se busca é repetibilidade de reprodutibilidade. Para avaliar esses dois fatores existem vários métodos estatísticos, incluindo ANOVA, cartas de controle  $\bar{X}R$ , Gage R&R e Gage cartas de controle (BAAS, 2007). A repetibilidade é a busca por medidas iguais, usando o mesmo instrumento, sendo feitas leituras pela mesma pessoa. A reprodutibilidade está ligada à obtenção da mesma medida, variando a pessoa que realiza a leitura.

O estudo “*Gage R&R crossed*” é conduzido para descrever o desempenho do sistema de medição por meio da interpretação das variações no processo de medição, por meio de análise gráfica e de resultados estatísticos. Neste sistema é possível quantificar o percentual de participação na variação total das medidas de cada um dos componentes do sistema, neste caso, repetibilidade, reprodutibilidade, operadores e diferenças entre as peças medidas. Almeja-se que o sistema possua a maior participação nas variações causadas pelas diferenças entre as peças, o que reforçaria a discriminação do sistema, que pode ser descrita como a capacidade de visualizar a diferença entre cada uma das peças avaliadas. As contribuições de repetibilidade, reprodutibilidade e de operador devem ficar abaixo de 10% para garantir um sistema confiável (BAAS, 2007).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CULTIVO DE *Mysidopsis juniae*

Para o desenvolvimento do estudo proposto, foram utilizados organismos da espécie *Mysidopsis juniae* provenientes do cultivo do Labtox, uma empresa instalada junto à fundação BioRio na cidade do Rio de Janeiro (RJ), sendo que tanto o cultivo quanto os testes de toxicidade ocorreram no laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, em São Francisco do Sul, que opera em parceria com o Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX/ENS/UFSC.

O início do cultivo, sua manutenção e a verificação da sensibilidade dos organismos foi realizado de acordo com as recomendações das normas L5.251:1992 da Cetesb (CETESB, 1992), 15308:2011 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011) bem como as recomendações de (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002).

De forma geral, as normas e demais referências da literatura oferecem direcionamentos para o cultivo, porém todos os parâmetros a serem controlados são apresentados dentro de uma faixa de variação, sendo então necessário o estudo das condições ótimas de cultivo visando a maximização da reprodução e minimização da mortalidade, além da manutenção da sensibilidade dos organismos.

Para esse estudo, a primeira etapa consistiu na análise das condições físicas para manutenção de mínimas variações nos parâmetros indicados como relevantes para o cultivo dos organismos. Assim, foi montado um mapa de raciocínio (Figura 4) para identificar quais seriam os parâmetros que poderiam sofrer variação durante o cultivo, decorrente das condições do laboratório. Esse mapa direcionou o DOE para identificação das condições físicas mais indicadas para minimizar essas variações.

A partir do mapa de raciocínio, foi elaborado um planejamento de experimento (DOE), considerando as variáveis nos balões preenchidos em cinza, na Figura 4. O experimento foi executado durante 7 dias consecutivos e os dados coletados após decorrido esse tempo. Foram montados experimentos com duas réplicas para cada tipo de frasco. O plano de amostragem para o DOE é apresentado no Quadro 8.

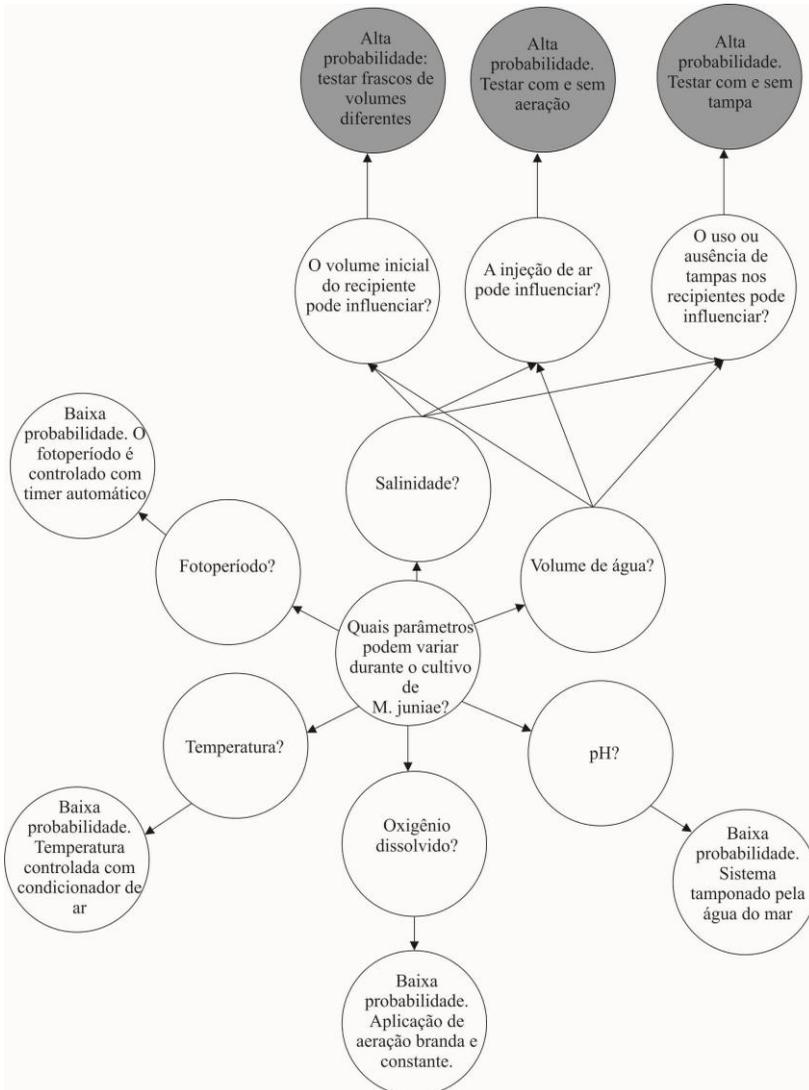


Figura 4: Mapa de raciocínio para identificação das condições físicas para o cultivo de *Mysisidopsis juniae*.

Quadro 8: Parâmetros a avaliar conforme indicações do mapa de raciocínio, bem como os níveis de variação considerados para cada um dos fatores, visando a execução do planejamento fatorial.

Recipiente	Aeração	Tampa
Frasco de vidro 2 litros	Com	Com
Frasco de vidro 2 litros	Com	Sem
Frasco de vidro 2 litros	Sem	Com
Frasco de vidro 2 litros	Sem	Sem
Erlenmeyer 1 litro	Com	Com
Erlenmeyer 1 litro	Com	Sem
Erlenmeyer 1 litro	Sem	Com
Erlenmeyer 1 litro	Sem	Sem
Copo plástico 500 mL	Com	Com
Copo plástico 500 mL	Com	Sem
Copo plástico 500 mL	Sem	Com
Copo plástico 500 mL	Sem	Sem

Para que fosse possível simular uma tampa nos erlenmeyers foi utilizado filme de PVC (mesmo filme utilizado para embalar alimentos) como elemento para vedar o gargalo. No copo plástico e no frasco de 2 litros foram utilizadas tampas plásticas específicas dos mesmos, sendo que todos os experimentos foram mantidos nessas condições por sete dias consecutivos.

A análise dos dados foi feita pelo módulo DOE (*Design of Experiments*) do software estatístico Minitab 16, da Minitab Inc. Para a avaliação dos resultados, foram utilizados os gráficos dos efeitos principais (*main effects plot*) e das interações (*interactions plot*).

Após a escolha das condições físicas para a condução do cultivo e de testes de toxicidade que minimizaria variações nos parâmetros controlados no cultivo, principalmente relacionado à salinidade e direcionadas pelo mapa de raciocínio, foi elaborado um estudo para

análise da melhor condição de salinidade e temperatura (condições ideais de cultivo).

A temperatura é uma característica física das águas considerada um dos fatores mais importantes nos fenômenos biológicos existentes no cultivo. Todas as atividades fisiológicas dos organismos (respiração, digestão, excreção, alimentação, movimentos) estão intimamente ligadas à temperatura da água. Quanto mais alta a temperatura, maior a atividade dos organismos e consequentemente, maior consumo de oxigênio (QUAYLE et al., 1989).

O simples aumento ou queda da temperatura a limites fora da faixa tolerável pelas respectivas espécies podem levar, sem influência de um agente tóxico, à morte dos organismos (KNIE e LOPES, 2004).

O fator salinidade é importante para o desenvolvimento das espécies cultivadas, pois cada uma possui uma faixa ideal em que se desenvolve melhor. Valores diferentes da faixa ideal levam ao crescimento lento e quando extremos podem levar a mortalidade (FOCKEDEY et al., 2006; FOCKEDEY et al., 2005).

Para esse estudo, foi elaborado um DOE, considerando como resposta a sobrevivência dos organismos, em diferentes condições de salinidade e temperatura. Os fatores e níveis avaliados no DOE são apresentados no Quadro 9 e baseados em dados presentes na literatura. O teste teve duração de 60 dias e os organismos foram expostos em triplicata para cada uma das condições definidas no DOE do Quadro 9.

Quadro 9: Fatores e níveis avaliados no DOE para descoberta das condições ideais de salinidade e temperatura para o cultivo de *Mysidopsis juniae*.

Salinidade (‰)	Temperatura (°C)
28	17
28	25
28	28
32	17
32	25
32	28
35	17
35	25
35	28

Além dos fatores que exigiram estudos, outras condições foram escolhidas de acordo com o recomendado pelas normas e literatura

pesquisada (ABNT, 2011; BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002; CETESB, 1992), sendo elas o fotoperíodo de 12/12h (claro/escuro), alimentação diária com náuplios de *Artemia sp.* com 48 h de vida e enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau, aeração branda e constante, com limpeza semanal total dos aquários. A água utilizada para o cultivo foi reconstituída a partir de água deionizada com adição de sal marinho da marca Red Sea Salt. A quantidade de organismos foi limitada a no máximo 1 adulto para 50 mL de água.

### 3.2 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS CULTIVADOS

O controle de sensibilidade da cultura foi realizado com o uso da substância referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS) e a carta controle foi elaborada no *software* Minitab 16, a partir dos valores de  $CL_{50(96h)}$  calculados pelo método dos Probitos, no mesmo software. Quando os dados não apresentavam normalidade para o uso do método dos Probitos, o teste de sensibilidade era repetido.

Para esse teste de sensibilidade são expostos 10 organismos em triplicada (30 no total) para cada concentração de DSS, sendo elas: 0 (controle); 2 mg.L<sup>-1</sup>; 4 mg.L<sup>-1</sup>; 8 mg.L<sup>-1</sup>; 12 mg.L<sup>-1</sup> e 16 mg.L<sup>-1</sup>. Os organismos sobreviventes foram quantificados após 96 horas de exposição. O teste possui validade quando a mortalidade no controle não excede 10% do total de organismos expostos nessa condição. Para iniciar um teste de toxicidade é essencial a verificação da sensibilidade dos organismos, buscando garantir a confiabilidade dos resultados.

### 3.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS PARA A DEFINIÇÃO DO MÉTODO PARA O TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Com o objetivo de desenvolver o teste de toxicidade crônica, foi necessário o estudo de variáveis que apresentassem algumas características para oferecer respostas relevantes ao final do ensaio. Este estudo foi realizado com a aplicação da matriz QFD. O modelo da matriz em branco, elaborada em uma planilha eletrônica do Excel® é apresentado no Apêndice A1.

Nesta matriz são descritos os requisitos necessários para atender a uma determinada necessidade (“quês”) e estes são relacionados com a forma pela qual serão atendidos (“comos”).

Para a elaboração da matriz, foram primeiramente definidos os objetivos (“quês”) do teste que seria proposto a partir de premissas

técnicas e de ordem operacional, além da classificação da importância de cada um dos itens para a concepção do método. Concluída esta etapa, procedeu-se com o preenchimento dos “comos” da matriz, a partir da listagem de variáveis medidas por autores (FOCKEY *et al.*, 2006; GHEKIERE *et al.*, 2007; MCKENNEY JR e CELESTIAL, 1996; VERSLYCKE *et al.*, 2007) pesquisados para identificação da toxicidade crônica em organismos vivos.

Terminadas as duas primeiras etapas, foi feito o relacionamento entre os “quês” e “comos” para promover um entendimento da importância absoluta e relativa de cada “como” para o atendimento aos objetivos do teste (“quês”). O cálculo para essa quantificação é feito pelo somatório da multiplicação do valor atribuído para cada “como” versus “quê”. A equação para esse cálculo é expressa na eq.1:

$$IA(x) = \sum_{i=1}^y \sum_{j=1}^z Como_i \times Quê_j \text{ (eq. 1)}$$

Também foi avaliada a relação de “comos” versus “comos” para caracterizar as relações entre cada uma das variáveis propostas. Esse relacionamento auxilia na identificação de variáveis que são muito semelhantes e possuem relação positiva entre si, e variáveis que são antagônicas, oferecendo uma relação negativa, proporcionando um direcionamento na tomada de decisão para a escolha dos “comos” mais adequados.

A outra etapa foi a avaliação da dificuldade técnica para a execução de determinado “como”, principalmente no que diz respeito a disponibilidade de equipamentos, qualificação da mão-de-obra e metodologia para execução da variável.

A última etapa foi a comparação entre o método proposto e dois métodos validados existentes para ensaio com misidáceos utilizados no hemisfério norte, para condições de clima diferenciados do Brasil (ASTM, 2008; USEPA, 2002b). Essa avaliação teve por objetivo identificar se o método desenvolvido é tão eficiente e dá respostas de mesmo nível ou melhoradas em relação ao que está disponível para países de clima temperado.

### **3.3.1 Previsão de falhas na aplicação da metodologia e medidas de prevenção**

Após a definição das variáveis a serem medidas no teste de toxicidade crônica, foi necessário efetuar um estudo para prever as

falhas na aplicação da metodologia e sugerir os controles ou ações de prevenção, neste caso, foi utilizada como ferramenta a FMEA. Essa ferramenta prevê o uso de uma equipe de trabalho para seu preenchimento, sendo assim, a equipe foi montada com um estudante de iniciação científica e três estudantes de mestrado que trabalham no laboratório de Toxicologia Ambiental na Univille, além do coordenador dos trabalhos. Essa equipe teve como tarefa, avaliar para cada um dos processos a serem executados durante o ensaio de toxicidade crônica, quais os modos de falha, os efeitos se essa falha acontecesse, a causa potencial da falha, bem como pontuar a severidade (S), ocorrência (O) e detecção (D), conforme escala sugerida por (SLACK *et al.*, 2009) e listar todas essas informações na planilha FMEA. Também foram definidos os meios de controle ou sugestões de ações para minimização do risco de cada falha. Um modelo vazio da planilha elaborada em Microsoft Excel® pode ser visualizada no Apêndice A2.

### **3.3.2 Análise do sistema de medição**

O processo de medição é uma das tarefas críticas do método, já que podem ocorrer variações causadas pelo próprio sistema de medição utilizado em decorrência da troca de técnicos que efetuam a atividade ou até mesmo por dificuldade do técnico manter um padrão adequado, além da capacidade do equipamento utilizado oferecer resolução adequada.

Dessa maneira, optou-se por definir um padrão de medição e avaliar se o sistema utilizado possuía reprodutibilidade, repetitividade e discriminação para medir os organismos. A análise do sistema de medição foi realizada por meio de um estudo Gage R&R, com o objetivo de avaliar se o sistema de medição estava adequado. O plano de amostragem definido para a avaliação do sistema de medição é apresentado na Figura 5.

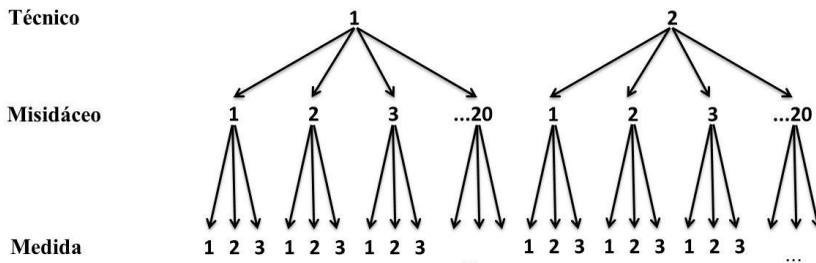


Figura 5: Plano de amostragem para o desenvolvimento da análise do sistema de medição com lupa e escala milimétrica acoplada à lente ocular.

### 3.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM ESTUDOS DE CASO

Nesta etapa, foram feitas aplicações da metodologia desenvolvida em dois diferentes estudos de caso. O primeiro deles com amostras ambientais da Baía da Babitonga (BB), com o intuito de verificar quais os locais da BB que poderiam oferecer toxicidade crônica aos organismos teste e o segundo deles, com nanopartículas de óxido de cobre, um material muito utilizado em tintas anti-incrustantes para cascos de navios. Neste segundo experimento, buscou-se detectar a concentração de nanopartículas em suspensão na água salgada, que não oferece efeitos crônicos ao organismo teste.

#### 3.4.1 Estudo de caso da Baía da Babitonga

Foram selecionados 3 pontos diferentes dentro da baía da Babitonga e um ponto próximo ao Arquipélago das Graças, uma região exterior à baía (Figura 6), para a identificação dos efeitos que as amostras de água podem causar aos organismos-teste, comparados a controles preparados com a água que o cultivo do laboratório. A área selecionada está contida no complexo estuarino da baía de Babitonga, situada ao norte do litoral catarinense, entre as coordenadas geográficas de  $-26^{\circ} 00'$  (extremo norte)  $-26^{\circ} 26'$  (extremo sul) e  $48^{\circ}29'$  (extremo leste)  $49^{\circ}12'$  (extremo oeste) (KNIE, 2002). No entorno da baía estão situados os municípios de São Francisco do Sul, Araquari, Barra do Sul, Itapoá, Garuva e Joinville.

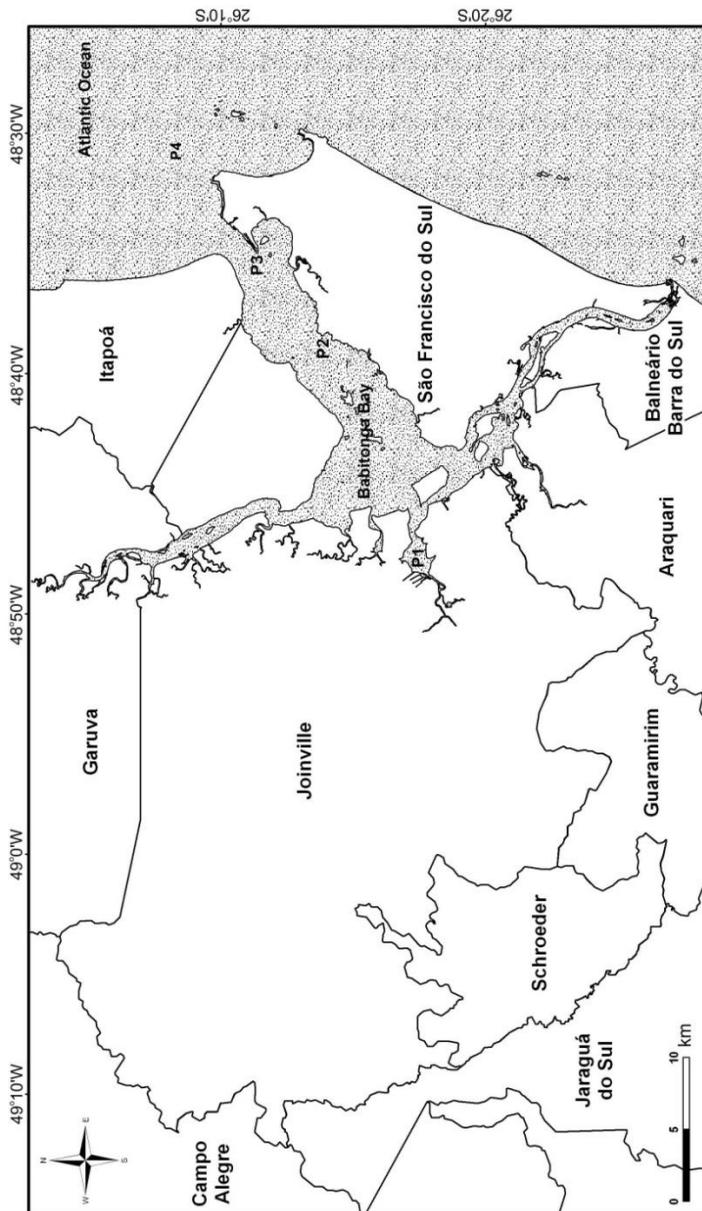


Figura 6: Locais de amostragem selecionados na foz do Rio Cachoeira (P1), próximo ao Porto de São Francisco do Sul (P2), próximo à Praia do Capri (P3) e próximo ao Arquipélago das Graças (P4).

A oeste, a Baía da Babitonga limita-se pela unidade geomorfológica da serra do mar (ROSA, 2002) e, a leste, a Ilha de São Francisco subdivide o complexo em dois setores: a baía da Babitonga e o canal do Linguado. A baía da Babitonga é composta por três bacias hidrográficas perfazendo uma área total de 160 km<sup>2</sup>. Dados de batimetria mostram uma profundidade média de 6 m com oscilação de maré de 1,30 m em períodos de 6 horas aproximadamente. O volume de água é de  $7,8 \times 10^8 \text{ m}^3$  com renovação diária de 20% (IBAMA, 1998).

O primeiro ponto de amostragem está localizado na foz do rio Cachoeira (P1) na área mais interior do estuário, onde as variações de marés causam gradientes de salinidade da ordem de 17 a 22‰ (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Este local recebe aproximadamente 90% de todo esgoto da cidade de Joinville que possui um sistema de coleta e tratamento em cerca de 16% do seu território, além da descarga de efluentes de múltiplas indústrias (OLIVEIRA *et al.*, 2006), principalmente do ramo metalomecânico. Neste local há uma marina (área 88.540 m<sup>2</sup>) que executa manutenção de barcos e possui uma doca de abastecimento. Dessa forma, o local selecionado pode ser considerado um lugar de alta possibilidade de descargas de poluentes.

O Segundo ponto selecionado para estudo está localizado nas proximidades do Porto de São Francisco do Sul (P2). Neste local, várias fontes de poluição como a dragagem de sedimentos, navegação, descarga de água de lastro de navios, derramamentos de óleo e contato com tintas anti-incrustantes, bem como descarga de esgoto doméstico não tratado estão presentes.

O ponto de amostragem P3 está localizado na praia do Capri, próximo a uma área de cultivo de moluscos. Assim como no ponto P1, há uma marina na região, porém de menor porte (área de 3.000 m<sup>2</sup>), além do despejo de esgoto doméstico não tratado. Neste local não há atividade industrial e a vegetação é ainda amplamente preservada. O gradiente de salinidade na região é pequeno (30 a 32‰), sofrendo uma pequena influência das marés, principalmente pela proximidade com o oceano (BÖHM, 2010).

O quarto e último ponto selecionado (P4) foi próximo à ilha das Graças, região de mar aberto, nas proximidades da Baía da Babitonga. Esse ponto foi selecionado para efeitos de comparação com as áreas mais interiores à Baía.

As amostras de água para a realização dos ensaios foram coletadas nos 4 pontos selecionados da baía de Babitonga, sendo todos georreferenciados com GPS da marca Garmin. O estudo de caso limitou-se a inferir sobre as amostras testadas, não tecendo conclusões a

respeito de fatores climáticos, meteorológicos e variações temporais ou sazonais, porém todas as coletas foram realizadas na ausência de precipitação. As coletas foram feitas em galões de polietileno higienizados, com capacidade para 5 litros cada, deixando-se um pequeno volume vazio nos mesmos para a expansão da água quando congelada. As coletas foram realizadas em profundidades que variaram de 0,5 a 1,0 metro de profundidade e congeladas no máximo 2 horas após o envase, visando a manutenção das características iniciais da amostra seguindo as recomendações de (GREENBERG *et al.*, 1998). Parâmetros físico-químicos foram medidos *in situ* com o auxílio de uma sonda multiparamétrica da marca Hanna com o objetivo de quantificar pH, sólidos dissolvidos totais, temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade. Também foram analisados esses parâmetros no início e fim de cada teste.

Foram feitas coletas em 19 galões de 5 litros por dia, durante 5 dias consecutivos em cada um dos pontos dentro da Baía da Babitonga, no mesmo horário, para que fosse possível obter uma amostra composta de água em diferentes condições de maré. Para cada ponto foram coletados 475 litros de água para preparação de uma amostra composta para entender a condição média do ambiente estudado.

No ponto de coleta em mar aberto, as amostras foram coletadas em uma única campanha, em função das variações da qualidade da água em mar aberto serem minimizadas em relação ao interior da baía pela elevada circulação de água (OLIVEIRA *et al.*, 2006), que recebe continuamente despejos das cidades circunvizinhas, além da dificuldade técnica de deslocamento até o ponto de coleta e dos riscos associados às questões climáticas.

Após o período final de coleta as amostras de água foram descongeladas e misturadas em um tanque previamente higienizado, para obtenção de uma amostra composta homogênea daquele ponto, na semana específica de coleta. Foram medidos os parâmetros físico-químicos dessa amostra composta com o auxílio da sonda multiparamétrica da marca Hanna com o objetivo de calcular as necessidades de correção de salinidade. A água do tanque teve a salinidade corrigida para 32‰, visto que os misidáceos são cultivados de acordo com as recomendações das normas L5.251 (CETESB, 1992), NBR 15308 (ABNT, 2011) e também de (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002). A correção de salinidade teve como objetivo minimizar interferências na observação de efeitos tóxicos crônicos causadas por stress dos organismos pela mudança de ambiente. Não foram feitos outros tratamentos para a água, como por exemplo filtração.

A quantidade inicial de 180 misidáceos (90 para o controle e 90 para a amostra) foi exposta às duas condições em triplicata (30 misidáceos por réplica), durante 60 dias de teste, o que compreende cerca de 2/3 do seu ciclo de vida. As condições de teste seguiram o método desenvolvido neste estudo. Como esses organismos são cultivados em laboratório não foi necessário período de adaptação para o início dos testes crônicos. Os organismos foram submetidos a duas condições diferentes, sendo a primeira o controle negativo, contendo a mesma água usada para o cultivo e a segunda com a amostra de água da baía da Babitonga a ser testada. A água foi renovada semanalmente, durante todo o período de exposição.

Em todos os casos supracitados foram utilizados aquários higienizados e codificados de acordo com as características do experimento, seguindo as recomendações do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Um exemplo de etiqueta que foi utilizada para a identificação dos aquários é apresentada no Apêndice A3. A etiqueta é fixada com uma linha de *nylon* no gargalo do recipiente de teste.

Também foram monitoradas diariamente as temperaturas ambiente do laboratório da água do teste, sendo anotados na planilha do Apêndice A4 os valores máximos e mínimos de cada uma dessas temperaturas no momento da chegada ao laboratório, para observar o comportamento da temperatura durante o período noturno e na saída do expediente, para observar o comportamento da temperatura ao longo do dia a partir da leitura dessa informação em um termômetro digital (Apêndice A5).

Os ensaios de toxicidade crônica foram realizados na estrutura física do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade da Região de Joinville (Univille), em cooperação do o Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os resultados desse estudo de caso geraram informações para um artigo científico que foi aceito para publicação no periódico FRESSENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN, conforme aceite e artigo apresentado no ANEXO I.

### **3.4.2 Teste de toxicidade crônica com nanopartículas de óxido de cobre**

A metodologia utilizada para a preparação e caracterização da suspensão foi baseada em na literatura e realizada com algumas adaptações do modelo sugerido (BLINOVA *et al.*, 2010; HEINLAAN *et*

al., 2011). A solução utilizada neste trabalho foi preparada usando a nanopartículas de óxido de cobre adquiridas pela MTI Corporation (Richmond, CA, USA). A suspensão foi preparada a uma concentração de  $2\text{g.L}^{-1}$ , pesando 2 g e diluindo em 20 mL de água ultra pura ( $\sigma = 18,1\text{ M}\Omega\text{ cm}$ ). A solução foi colocada em erlenmeyer de 50 mL em banho de gelo e colocada sobre um agitador magnético e sonicada por 30 minutos em um Disruptor de Células Ultra Sônico. Após este processo, o volume da suspensão final foi aferido até completar 1 litro com água ultra pura.

A caracterização das suspensões foi realizada a partir de uma solução de  $2\text{g.L}^{-1}$ . A forma e a distribuição do tamanho das nanopartículas de óxido de cobre após o processo de ultra som foram avaliados por Microscopia de Transmissão Eletrônica - TEM – 100 KV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para a leitura no TEM, depositou-se uma gota da amostra sobre o grid de 300 mesh. Deixou-se secar por 24 horas antes da leitura no microscópio. Não foi usado contraste.

Antes de proceder o teste de toxicidade crônica foi realizado um teste agudo (ABNT, 2011). Essa etapa teve como finalidade, subsidiar as concentrações que seriam utilizadas para o teste crônico.

Para o teste agudo foram utilizadas soluções de nanopartículas de óxido de cobre (NPs de CuO) com concentrações de 2, 4, 8, 16 e 32  $\text{mg.L}^{-1}$  em água deionizada reconstituída com sal marinho da marca Red Sea, juntamente com um controle (água idêntica ao do cultivo). Foram expostos 10 organismos com idade entre 3 e 5 dias em cada uma das diluições e no controle, em triplicata, durante 96 horas. Os organismos foram alimentados com náuplios de *Artemia sp.* Após o período de teste foi quantificado o número de mortos.

Para o teste crônico, como se tratou de um ensaio semi-estático, a renovação total da água foi executada semanalmente nos aquários do controle e da amostra, mantendo as mesmas concentrações iniciais de nanopartículas. Diferentemente das amostras ambientais da BB, este teste com as nanopartículas foi iniciado com organismos que já possuíam dimorfismo sexual, com idade entre 21 e 23 dias de vida. A quantidade inicial de organismos para o teste crônico foi de 160 misidáceos, sendo 80 para o controle e 80 cada diferente concentração de NPs de CuO.

O teste crônico com as NPs teve duração total de 31 dias, visando promover um estudo inicial para verificação da possibilidade de redução do tempo total do teste de toxicidade crônica proposto.

Os nascimentos e mortalidade foram acompanhados nos dias 0, 5, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 e 31. O período para a primeira reprodução

da segunda geração também foi acompanhado nos dias supracitados. As medidas do tamanho total dos organismos foram feitas nos dias 7, 16, 25 e 31.

Tanto para o teste agudo quanto para o teste crônico, as condições físicas, físico-químicas e de alimentação foram análogas às do cultivo.

A análise de dados físico-químicos foi feita através da média e desvio-padrão, aplicação da Análise de Variância, teste Qui-Quadrado e geração de gráficos, com o uso do software MASCoTE, desenvolvido em VBA (Visual Basic for Applications) no Excel® 2010, para a concentração de 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . As concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foram analisadas com o software Minitab 16.

### 3.5 DESENVOLVIMENTO DE PROGRAMA DE COMPUTADOR PARA GESTÃO E TABULAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Após o desenvolvimento do método para teste de toxicidade crônica, foi desenvolvido um software baseado na linguagem *Visual Basic for Applications* – VBA, presente no software Excel 2010®.

Foram consideradas para o software as características físico-químicas e biológicas a serem acompanhadas, a periodicidade de coleta das informações e uma forma de tabulação padronizada, utilizando tabelas, gráficos e estatística inferencial baseada na análise de variâncias (ANOVA) e teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ).

A linguagem de programação foi escolhida em função da facilidade de uso, orientada a objeto e de que grande parte dos computadores utilizados no mundo possuem o aplicativo Excel®, não obrigando o usuário a fazer uma instalação, e sim apenas a abertura de um arquivo que contém as rotinas pré-definidas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CULTIVO DE *Mysidopsis juniae*

Para o estabelecimento do cultivo de *Mysidopsis juniae*, foram adquiridos organismos na fundação BioRio no Rio de Janeiro (laboratório Labtox). Este laboratório presta serviços de ensaios de toxicidade agudos com misidáceos para as mais diversas finalidades.

A partir do lote inicial de organismos, buscou-se cultivar os misidáceos conforme normas e recomendações da literatura (ABNT, 2011; BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002; CETESB, 1992). Percebeu-se, no entanto, que como as indicações desses documentos preveem faixas nas quais os organismos podem ser cultivados, seria necessário entender quais as condições ótimas para esse cultivo. Os primeiros fatores dos quais se buscou conhecimento foram as condições físicas, buscando minimizar as variações de salinidade e de volume de água nos recipientes, com o uso de um sistema semi-estático. A avaliação foi realizada por meio da execução de um DOE em que foram combinadas as diferentes condições. A leitura das informações relativas a salinidade e volume final foi feita após uma semana de funcionamento do experimento.

Após a execução do experimento planejado, todos os fatores avaliados mostraram-se como relevantes, pois dependendo das condições escolhidas, são minimizadas ou maximizadas as variações no volume e na salinidade da água. Os dados obtidos com esse estudo são apresentados em forma de Quadro no Apêndice A6. Os gráficos dos efeitos principais e das interações são apresentados nas Figuras 7 e 8 para a variação na salinidade e nas Figuras 9 e 10 para as variações no volume em relação ao volume inicial.

A interpretação do Gráfico da Figura 7 é realizada a partir da comparação da linha traçada no valor médio (linha que recorta o gráfico horizontalmente) com a linha gerada pela tabulação dos dados para cada uma das condições avaliadas. Quando a linha apresentada está paralela à média, como é o caso da ligação entre o frasco 1 (Recipiente de vidro) e 2 (Erlenmeyer de 1 litro), seção (a) do gráfico, a interpretação é de que os dois métodos possuem comportamentos muito semelhantes, não diferindo significativamente entre si. Pode-se notar que a variação de salinidade tanto para o uso do frasco 1 quanto do 2, varia aproximadamente 2%. Quando avalia-se o frasco 3 (Copo plástico de 500 mL) a linha que representa a ligação dele com o frasco 2 possui uma forte inclinação, atravessando a linha do valor médio, demonstrando que

há diferenças relevantes entre eles. A variação média do processo utilizando o frasco 3 foi de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  e quando este é comparado com os frascos 1 e 2, demonstra-se menos eficaz para a manutenção de baixa variação na salinidade.

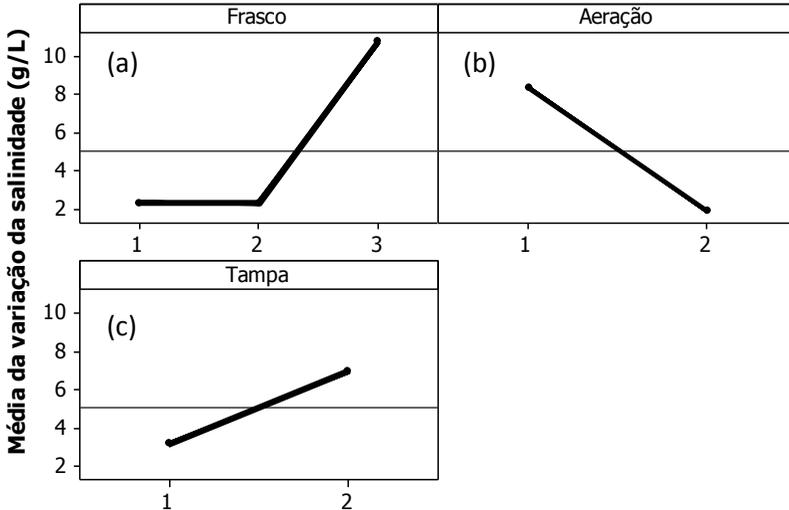


Figura 7: Gráfico dos efeitos principais para a variação no parâmetro salinidade em ‰. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra.

Quando é analisada a condição de presença e ausência de aeração, nota-se pela inclinação da linha que liga o método 1 (com aeração) com o método 2 (sem aeração) que há diferenças representativas entre as condições avaliadas. A manutenção do processo sem aeração seria a condição mais adequada, com variação próxima a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , considerando a análise da seção (b) do gráfico da Figura 7.

Para o fator tampa, demonstrado pela seção (c) do gráfico da Figura 7, observou-se uma forte influência da presença de tampa (1) para a manutenção de variações mínimas na salinidade quando este dado é comparado com a ausência de tampa (2). A variação com a presença de tampa ficou próximo a 3‰ e na ausência de tampa em torno de 7‰.

Considerando apenas a análise dos gráficos da Figura 7, seria possível concluir que a melhor condição para garantir variações mínimas na salinidade seria utilizar o Frasco 1 ou 2, na presença de tampa e sem aeração

Porém, como serão efetuadas apenas trocas de água uma vez por semana no cultivo e nos testes de toxicidade, a aeração torna-se condição técnica necessária. Para fazer um refinamento das informações apresentadas pelo gráfico dos efeitos principais da Figura 7, foi elaborado o gráfico das interações (Figura 8).

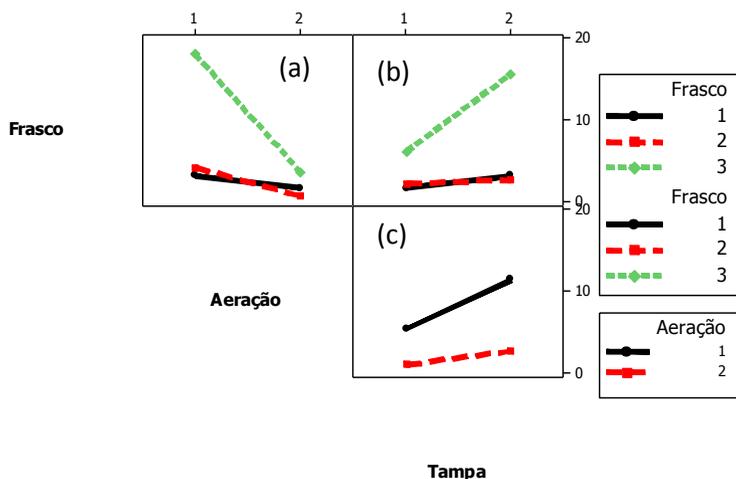


Figura 8: Gráfico das interações para a variação no parâmetro salinidade. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra.

No gráfico das interações fica facilitada a interpretação de como cada um dos fatores avaliados interage com os outros. Fazendo uma análise da seção (a) do gráfico da Figura 8, nota-se que a presença da aeração é mais influente na variação da salinidade quando o frasco 3 é utilizado (linha tracejada em verde), causando alterações da ordem de 20%, quando essa combinação é feita. Para os frascos 1 e 2 (linhas

tracejadas em vermelho e preto) a aeração exerce pouca influência, sendo que a presença de tampa minimiza ainda mais essas variações, ficando muito próxima a zero (seção (b) do gráfico). Dessa forma pode-se concluir que o uso dos frascos 1 ou 2 com a presença de tampa, pode possuir aeração e mesmo assim manter com variação mínima a salinidade do meio, sendo possível aplicar essa combinação para o cultivo ou testes de toxicidade semi-estáticos, com períodos de troca de uma semana.

Com relação ao volume de água final nos frascos as conclusões são muito semelhantes às da salinidade, já que os frascos 1 e 2 apresentaram os melhores valores médios de manutenção do volume de água. A ausência de aeração e a presença de tampa também foram fatores que promoveram essa menor variação na salinidade. A seção (a) do gráfico apresentado na Figura 9 apresenta a variação no volume em relação aos frascos utilizados.

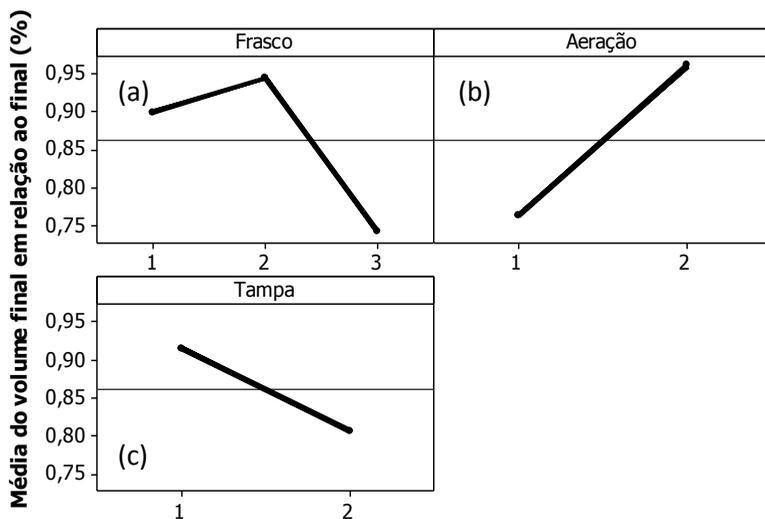


Figura 9: Gráfico dos efeitos principais no parâmetro de variação no volume da água após uma semana de teste. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra.

O Recipiente de vidro e o Erlenmeyer mantiveram mais que 90% do volume inicial de água, enquanto que o frasco 3 (copo plástico) mantém menos que 75% do volume inicial.

A presença de aeração (1), seção (b) do gráfico da Figura 9, promove uma maior evaporação da água, como seria esperado, em relação à ausência de aeração, que mantém mais de 95% do volume inicial. Assim como para a salinidade, a presença de tampa é benéfica, como é demonstrado pela seção (c) do gráfico da Figura 9.

O refinamento das informações de variação no volume inicial de água, também foi realizado a partir do gráfico das interações (Figura 10).

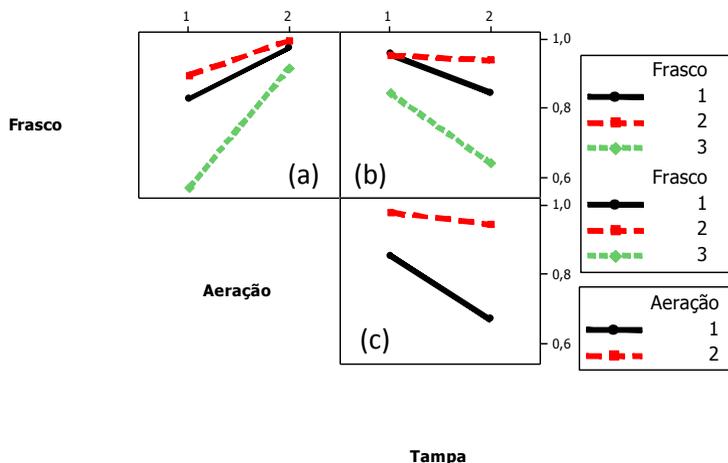


Figura 10: Gráfico das interações no parâmetro de variação no volume da água após uma semana de teste. Frasco: 1 = Recipiente de vidro de 2 L; 2 = Erlenmeyer de 1 L; 3 = Copo plástico de 500 mL. Aeração: 1 = com; 2 = sem. Tampa: 1 = com; 2 = sem. A inclinação das linhas demonstra variação entre as condições analisadas. Quanto maior a inclinação, maiores as variações entre uma condição e outra.

Percebe-se que o volume de água é influenciado mais fortemente após os 7 dias de teste quando do uso do frasco 3 (copo plástico), apresentado pela linha tracejada verde, na seção (a) do gráfico da Figura

10, e que a presença de tampa também auxilia na minimização da variação do volume de água (seção (b) do gráfico).

Assim, conclui-se que o uso do Frasco de vidro de 2 litros assim como o Erlenmeyer de 1 litro, utilizando-se tampa e aeração, são condições apropriadas para a minimização da variação no volume de água.

Portanto, as condições que se mostraram mais adequadas para o cultivo semi-estático de misidáceos seriam utilizando Recipientes de vidro de 2 litros ou Erlenmeyers de 1 litro, ambos com tampa e com aeração. Para o cultivo, visando concentrar maior quantidade de organismos em um mesmo frasco, sugere-se o uso dos Recipientes de vidro de 2 litros com tampa, na presença de aeração branda, já para a realização dos testes de toxicidade crônica semi-estáticos, como a quantidade de organismos é reduzida em relação ao cultivo, sugere-se a substituição do Recipiente de vidro de 2 litros por Erlenmeyers de 1 litro, poupando assim espaço no laboratório.

Além da definição do tipo de recipiente e condições de aeração, os fatores abióticos salinidade e temperatura foram avaliados para definir as condições de teste. Partindo-se da análise das Figuras 11 e 12, é possível perceber que a condição que garante a maior percentual de sobrevivência ao final de 60 dias de experimentação é a de salinidade 32‰ e temperatura de 25 °C. Os dados referentes a esse ensaio são apresentados na forma de Quadro no Apêndice A7.

Como a inclinação da linha na seção (a) do gráfico da Figura 11 é grande entre a salinidade 32‰ e as salinidades 28 e 35‰, afirma-se que há diferenças entre essa salinidade e as outras para a sobrevivência dos organismos, sobretudo porque a linha atravessa a média do gráfico. Quando são comparadas as salinidades 28 e 35‰, a sobrevivência é muito semelhante, da ordem de 5 a 10% após 60 dias de teste.

Além da salinidade, o fator temperatura foi avaliado. Pela interpretação da seção (b) do gráfico da Figura 11, a maior sobrevivência é obtida na temperatura de 25 °C, na faixa de 25%, enquanto que as temperaturas de 17 e 28 °C tiveram sobrevivência próxima a 10%.

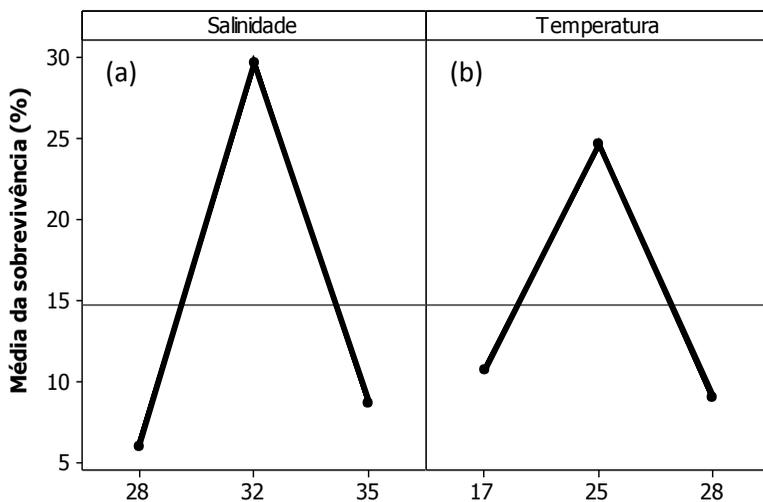


Figura 11: Gráfico dos efeitos principais para identificação da média da mortalidade em diferentes condições de temperatura e salinidade.

No gráfico da Figura 12 (interações) observa-se que a combinação de temperatura 25 °C e salinidade 32‰ (ponto central da linha tracejada em vermelho) maximiza a sobrevivência dos organismos substancialmente quando comparada com as outras condições (cerca de 45%) após 60 dias de teste.

Dessa maneira, sugere-se que o teste de toxicidade seja mantido com temperatura controlada na faixa de 25 °C, de acordo com as recomendações de (ABNT, 2011) e com salinidade de  $33 \pm 1‰$ , já que salinidades muito maiores ou menores que essa, apresentaram condições desfavoráveis para a sobrevivência do organismo teste. O monitoramento da salinidade é efetuado com o auxílio de um refratômetro (Apêndice A8) e o monitoramento da temperatura é realizado com o auxílio de um termômetro digital que registra as temperaturas máxima e mínima do ambiente do laboratório e da água. O fotoperíodo recomendado é de 12/12h (luz/escuro), e a alimentação é feita com náuplios de *Artemia sp.*, enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau, conforme estabelecido na norma brasileira para ensaios de toxicidade aguda. O processo de eclosão de Artemias é realizado diariamente, sendo montados dois diferentes frascos: o

primeiro para eclosão dos cistos e o segundo para enriquecimento dos náuplios.

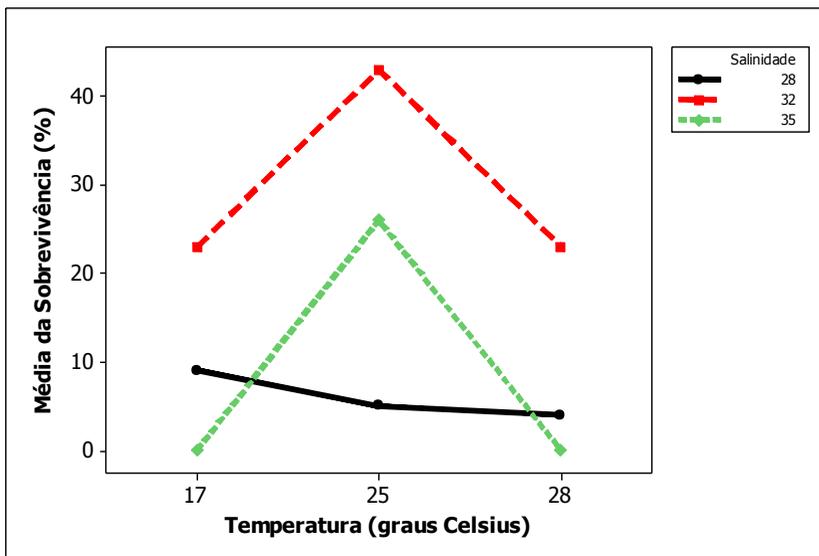


Figura 12: Gráfico de interações entre a temperatura, salinidade e o percentual de sobrevivência nas condições testadas, após 60 dias de teste.

#### 4.2 SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS CULTIVADOS

Após definidas as condições ótimas de cultivo, iniciou-se o processo de acompanhamento da sensibilidade dos organismos. Essa atividade foi realizada por meio de ensaios de toxicidade aguda com o uso da substância referência Dodecil Sulfato de Sódio. Os organismos foram expostos durante 96 horas a concentrações que variam de 0 (controle) a  $16 \text{ mg.L}^{-1}$ . O cálculo da  $CL_{50(96h)}$  foi realizado com o auxílio do *software* estatístico Minitab 16 da Minitab Inc. Os dados da  $CL_{50(96h)}$  são acompanhados ao longo do tempo por meio de uma carta controle dos valores individuais (I) e da amplitude móvel (AM). Os misidáceos devem manter-se com sensibilidade de até 2 desvios padrão em relação à média, sendo não recomendável mais que 7 pontos do mesmo lado da linha da média, o que indicaria uma alteração no nível da sensibilidade (ABNT, 2011). Os dados utilizados para a elaboração da carta-control

estão presentes no Apêndice A9. A carta-controlé utilizada no laboratório é apresentada na Figura 13.

A análise da carta controle pode ser realizada de forma simples. Espera-se que nenhum dos valores da  $CL_{50(96h)}$  extrapole os limites de controle (linhas em vermelho). Nesta condição, significa que não há pontos com variação superior a  $2\sigma$  (2 desvios-padrão). Outro requisito, é que não haja tendência na carta controle, que pode ser detectado pela existência de 7 pontos consecutivos de um mesmo lado da linha média na carta dos valores individuais (ABNT, 2011). O valor da média de sensibilidade com os pontos obtidos ficou em  $4,838 \text{ mg.L}^{-1}$ , e o desvio-padrão em  $1,4988 \text{ mg.L}^{-1}$ .

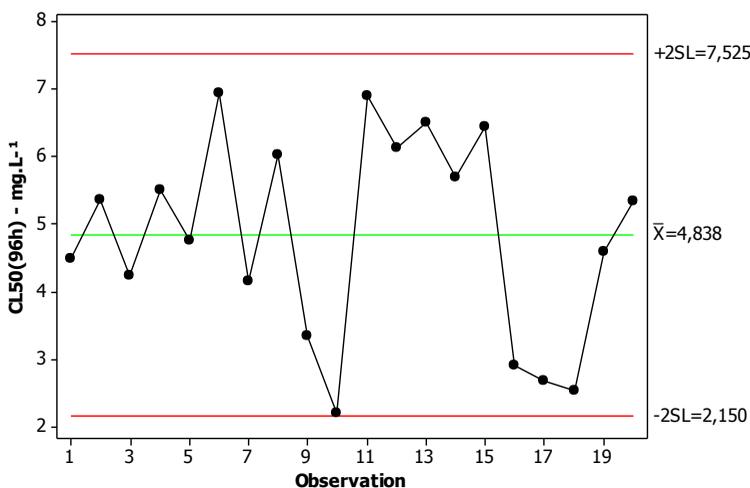


Figura 13: Carta controle da sensibilidade dos misidáceos cultivados no laboratório. Os dados são dos valores individuais da  $CL_{50(96h)}$ .

Além da interpretação da carta controle, elaborou-se um teste de normalidade de Anderson-Darling dos dados de  $CL_{50(96h)}$ , apresentado na Figura 14.

Como o valor obtido de “p” (legenda do gráfico apresentado na Figura 14) para o teste de normalidade de Anderson-Darling foi de 0,423 (superior a 0,05), para um intervalo de confiança de 95%, pode-se dizer que os dados seguem uma distribuição normal, comprovando novamente que os valores de  $CL_{50(96h)}$  obtidos durante os testes de sensibilidade não estão variando de forma abrupta ao longo do tempo. O acompanhamento deve continuar sendo feito de forma mensal (ABNT,

2011) para garantia do uso de proles em teste de toxicidade que possuam sensibilidade dentro da faixa conhecida pelo laboratório.

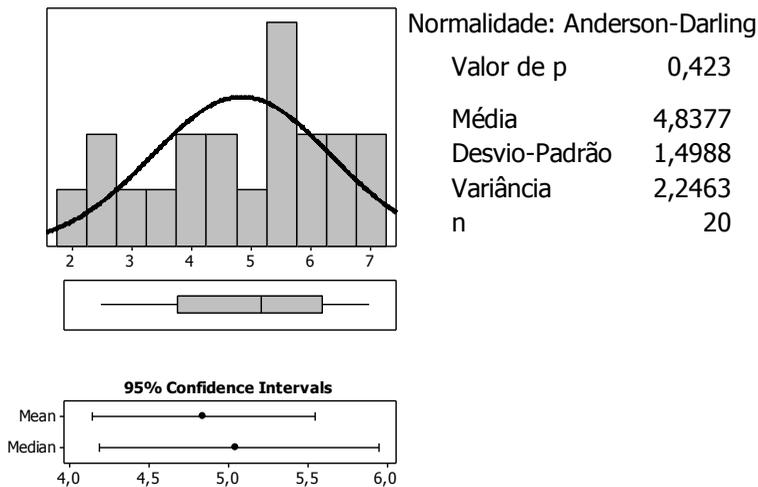


Figura 14: Teste de normalidade de Anderson-Darling da  $CL_{50(96h)}$  calculada nos testes de sensibilidade com Dodecil Sulfato de Sódio. O valor de  $p > 0,05$  representa que não há diferenças significativas nas populações testadas, para um intervalo de confiança de 95%.

Finalizada a etapa de cultivo e análise de sensibilidade dos organismos teste, iniciou-se o processo de estudo das variáveis para a definição da metodologia para o teste de toxicidade crônica.

#### 4.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS PARA DEFINIÇÃO DO MÉTODO PARA O TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Esta etapa foi desenvolvida com o auxílio da matriz QFD (Figura 15), sendo possível a partir do preenchimento da ferramenta, estabelecer a classificação das variáveis a serem sugeridas para a elaboração do teste de toxicidade crônica, bem como compará-las com os métodos existentes em outros países para outras espécies de misidáceos.

O primeiro e mais importante fator é que uma característica medida deve apresentar relevância ecológica, já que os estudos de toxicologia ambiental intentam prever os efeitos sobre grupos de

indivíduos ou comunidades, especialmente quando são realizados estudos de cunho ecotoxicológico (PERIN, 2005). Dessa maneira, a relevância ecológica recebeu como nota para o nível de importância o valor 10. O segundo fator mais importante é a relevância toxicológica/ecotoxicológica da característica, visando obter uma indicação quantitativa dos efeitos da exposição a xenobióticos. Esse “quê” recebeu nota 9. Os demais “quês” da matriz QFD, receberam pontuações inferiores, conforme pode ser visualizado na Figura 15.

Como as análises multicriteriais são apenas orientativas (GOMES e DUARTE JR, 1992), após a análise dos resultados da ferramenta, as características que ficaram entre as 4 mais pontuadas, como pode ser observado pelos valores apresentados nas linha da Importância Absoluta e da Importância Relativa (totalizando 9 características chave), foram novamente julgadas para aplicação. Esta segunda análise foi apenas qualitativa, sendo escolhidas aquelas que foram consideradas mais simples de serem medidas ou que possuíssem um potencial minimizado de interferências na leitura.

No Quadro 10 é apresentado um resumo das características que obtiveram as maiores pontuações, bem como é feita uma menção às inter-relações das características citadas. A reprodução é a única característica que não possui uma relação direta com as outras listadas.

Considerando o Quadro 10, a primeira característica selecionada foi a reprodução, sendo apenas uma contagem simples dos neonatos. Para esse item foi decidido avaliar a reprodução da 1ª e 2ª geração, com o objetivo de visualizar efeitos geracionais e transgeracionais. Considerando os aspectos ecológicos, pode-se afirmar que essa característica está ligada diretamente à manutenção da espécie nos ecossistemas. Além desse fator, como a reprodução sofre influência direta quando ocorrem variações no sistema endócrino dos misidáceos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007), pode-se sugerir a presença de compostos que interferem nesse sistema, causando variações hormonais nos misidáceos e, portanto na quantidade de neonatos. Dessa maneira, essa característica possui tanto relevância ecológica como ecotoxicológica.



Quadro 10: Características chave classificadas com as maiores pontuações.

Número da característica	Característica	Relação com
1	Reprodução	-
2	Mortalidade	3
3	População total	2
4	Tamanho total	5, 6 e 7
5	Tamanho do télson	4, 6 e 7
6	Tamanho do endópodo	4, 5 e 7
7	Tamanho do exópodo	4, 5 e 6
8	Idade para a maturação sexual	9
9	Tempo para a 1ª reprodução	8

A segunda característica selecionada foi a mortalidade, sendo essa uma característica que possui interações com a população total. Essa variável traz um indicativo mais direto sobre os efeitos letais em relação à população total, pois não são considerados como mortalidade os organismos retirados para efetuar medições. Novamente, essa característica tem relação direta com a manutenção da espécie nos ecossistemas.

A terceira característica selecionada foi o tempo para a primeira reprodução, que possui relação direta com a idade para a maturação sexual. Essa característica foi escolhida em detrimento à outra por minimizar a manipulação dos organismos, o que poderia causar estresse, além da perda de organismos viáveis para a reprodução em decorrência da análise em microscópio para verificação da maturação sexual, por meio do dimorfismo sexual e aparecimento de ovos nos ovidutos. Para essa característica foram definidas leituras para a 1ª e 2ª geração, de modo a quantificar efeitos geracionais e transgeracionais. O tempo para a primeira prole tem relevância ecotoxicológica porque os misidáceos possuem um complexo sistema endócrino que regula todas as fases do seu ciclo de vida (WITTMANN, 1981). Variações nos tempos para aparecimento das proles podem indicar a presença de compostos que promovem alterações hormonais nos misidáceos.

A quarta característica elencada foi o tamanho total dos organismos. Essa característica deve ser avaliada primordialmente na 1ª geração, mas pode ser avaliada também na 2ª geração, desde que haja número suficiente de organismos para efetuar as medições, pois no processo de medição ocorre a letalidade do organismo. Há interações

entre essa característica e o tamanho do télson, tamanho do endópodo e tamanho do exópodo. A mensura o do tamanho total do organismo   facilitada em rela o às partes do corpo, que podem sofrer danos por canibalismo. Sugere-se medir os misidáceos do início dos olhos até o último segmento abdominal antes do télson. Essa característica também pode indicar altera es no sistema endócrino dos misidáceos, já que seu crescimento está diretamente ligado com as mudas, que ocorrem em fun o do seu desenvolvimento hormonal (GHEKIERE *et al.*, 2007).

Dessa forma, as variáveis a serem consideradas para a elabora o do método de toxicidade crônica geracional e transgeracional: reprodu o, mortalidade, tempo decorrido para a 1  reprodu o na 1  e na 2  gera o e tamanho total dos organismos estudados, por possuir semelhanças com as demais características com pontua o equivalente na matriz QFD. Para que fosse possível mensurar essas variáveis, foi definido que o teste de toxicidade crônica terá dura o de 60 dias (compatível com todo o ciclo de vida dos misidáceos).

Um resumo das variáveis selecionadas e das análises que poderão ser observadas a partir desse modelo   apresentado no Quadro 11:

Quadro 11: Variáveis selecionados com o tipo de efeito avaliado e o tempo de resposta para mensura o do efeito.

Vari�vel	Tipo de efeito	Tempo de resposta
Reprodu�o da 1� gera�o	Geracional	Longo
Reprodu�o da 2� gera�o	Transgeracional	Longo
Mortalidade da 1� gera�o	Geracional	Curto
Tempo para a 1� reprodu�o na 1� gera�o	Geracional	Longo
Tempo para a 1� reprodu�o na 2� gera�o	Transgeracional	Longo
Tamanho total dos organismos da 1� gera�o	Geracional	M�dio

### 4.3.1 Frequência e metodologia de quantifica o

Após a sugestão das variáveis a mensurar durante o teste de toxicidade crônica, torna-se necessário definir a frequência e metodologia de quantifica o para cada uma delas, objetivando

mensurar adequadamente os efeitos observados, porém buscando garantir o mínimo de estresse aos organismos em função da manipulação.

Considerando as informações listadas no Quadro 11, o Quadro 12 apresenta uma organização para a execução do teste de toxicidade, informando o tipo de avaliação, o período em que deve ser realizada, as unidades de medida a utilizar e os instrumentos necessários para a quantificação do fator analisado.

Quadro 12: Frequência e metodologia de quantificação das variáveis definidas para o teste de toxicidade crônica com *Mysidopsis juniae*.

Variável	Tipo de avaliação	Período	Unidade de medida	Instrumentos utilizados
Reprodução da 1ª geração	Não letal	Semanal	Quantidade de neonatos	Contador mecânico manual
Reprodução da 2ª geração	Não letal	Semanal	Quantidade de neonatos	Contador mecânico manual
Mortalidade da 1ª geração	Não letal	Primeira medição após 96 horas de teste e após Semanal	Quantidade de organismos mortos	Contador mecânico manual
Tempo para a 1ª reprodução na 1ª geração	Não letal	Diário	Número de dias para ocorrência da primeira prole	Calendário de teste
Tempo para a 1ª reprodução na 2ª geração	Não letal	Diário	Número de dias para ocorrência da primeira prole	Calendário de teste
Tamanho total dos organismos da 1ª geração	Letal	Semanal	Milímetros	Microscópio óptico com escala milimétrica adaptada à lente ocular

A frequência de medição foi definida em função do tipo de avaliação necessária. Para a mortalidade, sugere-se a primeira medição após 96 horas de teste, com o objetivo de identificar se a amostra está oferecendo efeitos agudos aos organismos. Caso ocorra mortalidade superior a 10% da população neste período, o teste deve ser encerrado,

pois a amostra apresenta efeito agudo sobre os organismos. Caso essa variação não ocorra, as contagens subsequentes serão realizadas sempre no dia da limpeza dos aquários (a cada 7 dias). As medidas de reprodução, mortalidade e tamanho foram definidas semanais para coincidir com o dia da troca de água dos aquários, momento em que ocorre a manipulação dos organismos, minimizando assim interferências que poderiam causar estresse. Quanto à natalidade da primeira prole na primeira e segunda geração, o acompanhamento é feito diariamente e são anotados os dias em que ocorreram as primeiras proles no controle e na amostra.

Apesar da metodologia a ser empregada ter sido definida, podem ocorrer falhas durante a execução do teste. Para visualizar essas potenciais falhas e prevenir a sua ocorrência, foi utilizada a ferramenta FMEA.

#### **4.3.2 Estudo das potenciais falhas no processo do teste de toxicidade crônica**

Para prevenir a ocorrência de interferências nos resultados do teste de toxicidade, foi elaborado uma análise dos modos e efeitos das falhas (FMEA) para cada um dos processos de avaliação das características selecionadas para o método desenvolvido. A primeira FMEA é relativa ao controle do ambiente onde os testes serão realizados. Essa FMEA é apresentada no Quadro 13:

Avaliando a FMEA do Quadro 13, nota-se a importância de sistemas de segurança secundários para a garantia das condições de temperatura, luminosidade e aeração do ambiente, além da necessidade de monitoramento da salinidade para evitar variações nesse parâmetro. Foram instalados no laboratório um condicionador de ar adicional ao existente (Apêndice A10), com ciclo quente e frio e também um sistema de aeração secundário (Apêndice A11), no caso de falhas do sistema principal, alimentado por um soprador centrífugo. O sistema de aeração e iluminação instalado nas estantes do laboratório é apresentado no Apêndice A12. Ainda é necessária a instalação de um gerador de energia elétrica para resolver os problemas de falta de energia elétrica, porém esse item ainda está pendente e listado como um investimento necessário para o laboratório.

Quadro 13: FMEA do controle do ambiente do laboratório para realização dos testes de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Controle da temperatura da água	Manter a T em $25 \pm 1$ °C	Aumento ou diminuição da temperatura da água	Mortalidade / baixa taxa de natalidade dos organismos	10	Variações climáticas	10	Uso de sala climatizada com condicionador de ar e monitoramento da temperatura com termômetro digital com data logger de temperatura máxima e mínima	1	100
		Aumento ou diminuição da temperatura da água	Mortalidade / baixa taxa de natalidade dos organismos	10	Condicionador de ar em manutenção	10	Condicionador de ar reserva (ciclo frio) + aquecedores elétricos	1	100
		Aumento ou diminuição da temperatura da água	Mortalidade / baixa taxa de natalidade dos organismos	10	Falta de energia elétrica	5	Instalação de gerador de energia elétrica a diesel	1	50
Controle da salinidade	Manter a salinidade em $3.3 \pm 1\%$	Aumento ou diminuição da salinidade em curto período de tempo	Mortalidade / baixa taxa de natalidade dos organismos	10	Evaporação acentuada da água dos aquários	1	Monitoramento diário da salinidade por amostragem	1	10
Controle do fotoperíodo	Manter o fotoperíodo em 12/12h (claro/escuro)	Variação no tempo de acendimento das lâmpadas das estantes	Variações nas taxas de mortalidade e natalidade	10	Esquecimento do técnico de ligar e apagar as luzes	5	Uso de timer para controle do fotoperíodo	1	50
		Variação no tempo de acendimento das lâmpadas das estantes	Variações nas taxas de mortalidade e natalidade	10	Falta de energia elétrica	5	Instalação de gerador de energia elétrica a diesel	1	50

Continuação – Quadro 13: FMEA do controle do ambiente do laboratório para realização dos testes de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Controle da aeração nos aquários	Manter Oxigênio dissolvido acima de 4 mg L <sup>-1</sup>	Desligamento da aeração	Mortalidade / baixa taxa de natalidade dos organismos	10	Falta de energia elétrica	5	Instalação de gerador de energia elétrica a diesel	1	50
				10	Falha no soprador centrífugo	10	Instalação de compressores de ar reserva	1	100

No Quadro 14 é apresentada a FMEA para a identificação da primeira prole na primeira e na segunda geração. Neste processo uma das principais falhas que podem ocorrer são que o técnico pode confundir a presença do alimento, *Artemia sp.*, com os neonatos de misidáceo, já que o tamanho dos náuplios servidos de alimento é muito semelhante aos juvenis recém liberados do marsúpio. Para essa situação, recomenda-se a avaliação da natalidade antes de efetuar-se o processo de alimentação dos misidáceos, minimizando assim a existência de náuplios de *Artemia* dentro dos aquários.

A outras duas falhas com elevado NPR foram a dificuldade de observação dos neonatos em função de seu tamanho reduzido e o canibalismo de filhotes. Para a primeira falha, recomenda-se efetuar a leitura em uma superfície de fundo branco com iluminação direta na parte superior do aquário. Quanto ao canibalismo, sugere-se alimentar os organismos sempre no mesmo horário, em quantidade compatível com a idade.

No Quadro 15 são apresentadas as falhas com maior potencial de ocorrência para o processo de quantificação da mortalidade dos misidáceos.

Quadro 14: FMEA do processo de identificação da primeira prole na primeira e segunda geração do teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Identificação da primeira prole na 1ª e 2ª geração	Identificar efeitos sobre o tempo para início da reprodução na 1ª e 2ª geração	Esquecer de avaliar algum aquário diariamente	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falha no sequenciamento de leitura dos aquários	1	Identificação das tarefas diárias por meio de planilha e sequência de avaliação de aquários	5	50
		Confundir misidáceos juvenis com <i>Artemia sp.</i>	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	O tamanho dos neonatos de misidáceo é parecido com os náuplios de <i>Artemia sp.</i> usadas como alimento	1	Proceder com a alimentação diária apenas após a contagem de todo o aquário	10	100
		Dificuldade para observar o nascimento de misidáceos em função do tamanho reduzido	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Técnico não enxerga organismo recém nascido em função do tamanho	1	Utilizar fundo branco e luz com incidência direta sobre o aquário para melhorar visualização	10	100
		Canibalismo de juvenis	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falta de alimento	1	Alimentar os organismos sempre no mesmo horário diariamente e nas proporções adequadas para a idade	10	100

Nesta avaliação, a contagem incorreta, mortalidade de adultos causada por interferências de manipulação e a confusão de sexo dos organismos se apresentaram mais relevantes. Para a mitigação dessas falhas, os controles definidos foram a utilização de um contador manual analógico, análise semanal de características que exigem manipulação para diminuir o estresse aos organismos causados por essa atividade e, capacitação dos técnicos por meio de fotos ampliadas em microscópio dos misidáceos.

Quadro 15: FMEA do processo de quantificação da mortalidade dos misidáceos durante o teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Contagem da mortalidade na 1ª e 2ª Geração	Identificar efeitos sobre a mortalidade na 1ª e 2ª geração	Contagem incorreta	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Perda da sequência de contagem	1	Contador manual analógico	10	100
		Contagem incorreta	Necessidade de recontagem quando técnico tem dúvidas	8	Perda da sequência de contagem	1	Contador manual analógico	10	80
		Stress	Interferência nos resultados	8	Excesso de manipulação	1	Contagem dos organismos semanal, no ato da limpeza dos aquários	10	80
		Stress	Interferência nos resultados	8	Manipulação inadequada	1	Uso de pipeta Pasteur plástica com ponta recortada	10	80
		Mortalidade dos adultos	Interferência nos resultados	10	Excesso de manipulação	1	Contagem dos organismos semanal, no ato da limpeza dos aquários	10	100
		Mortalidade dos adultos	Interferência nos resultados	10	Manipulação inadequada	1	Uso de pipeta Pasteur plástica com ponta recortada	10	100
		Não observar presença de adultos	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Técnico não enxerga organismo	1	Uso de rede para separar organismos	3	30
		Não observar presença de adultos	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Técnico não enxerga organismo	1	Contagem em pequenos lotes de organismos, em alíquotas de 200 mL de água	1	10

Continuação – Quadro 15: FMEA do processo de quantificação da mortalidade dos misidáceos durante o teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Contagem da mortalidade na 1ª e 2ª Geração	Identificar efeitos sobre a mortalidade na 1ª e 2ª geração	Confundir misidáceos machos com fêmeas	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falta de treinamento do técnico para identificação de machos e fêmeas	1	Treinamento dos técnicos com fotos de misidáceos macho e fêmea ampliados em lupa	10	100
		Esquecer de contar algum dos aquários	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Mistura de aquários sobre a mesa de manipulação	1	Padronizada a manipulação de um aquário de cada vez	5	50
		Esquecer de contar algum dos aquários	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falha na identificação de aquários	1	Identificação dos aquários com etiqueta no gargalo, presa com fio de nylon	1	10
		Confundir aquários de 1ª e 2ª geração	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falha na identificação de aquários	1	Identificação dos aquários com etiqueta no gargalo, de cores diferenciadas para cada geração	1	10

No Quadro 16 é apresentada a FMEA do processo de contagem de neonatos, necessária para a variável reprodução. Essa quantificação deve ser feita na primeira e segunda prole.

Como o processo de quantificação de neonatos é muito semelhante à quantificação da mortalidade, os modos de falha potenciais que variam são a não observação da presença dos juvenis pelo seu reduzido tamanho e a confusão deles com o alimento que é fornecido (náuplios de *Artemia sp.*). Para esses dois modos de falha, os controles definidos são utilizar uma rede para peneirar os neonatos e contê-los num volume menor de água e alimentar os misidáceos apenas após o processo de contagem e separação dos filhotes. Com essas ações, espera-se manter sob controle os modos de falha citados.

Quadro 16: FMEA do processo de quantificação de neonatos durante o teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Contagem dos neonatos na 1ª e 2ª geração	Identificar efeitos sobre os neonatos na 1ª e 2ª geração	Contagem incorreta	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Perda da sequência de contagem	1	Contador manual analógico	10	100
		Contagem incorreta	Necessidade de recontagem quando técnico tem dúvidas	8	Perda da sequência de contagem	1	Contador manual analógico	10	80
		Stress	Interferência nos resultados	8	Excesso de manipulação	1	Contagem dos organismos semanal, no ato da limpeza dos aquários	10	80
		Stress	Interferência nos resultados	8	Manipulação inadequada	1	Uso de pipeta Pasteur plástica com ponta recortada	10	80
		Mortalidade dos juvenis	Interferência nos resultados	10	Excesso de manipulação	1	Contagem dos organismos semanal, no ato da limpeza dos aquários	10	100
		Mortalidade dos juvenis	Interferência nos resultados	10	Manipulação inadequada	1	Uso de pipeta Pasteur plástica com ponta recortada	10	100
		Não observar presença de juvenis	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Técnico não enxerga organismo recém nascido em função do tamanho	1	Uso de rede para separar organismos	3	30
		Não observar presença de juvenis	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Técnico não enxerga organismo recém nascido em função do tamanho	1	Contagem em pequenos lotes de organismos, em alíquotas de 200 mL de água	6	60
		Confundir misidáceos neonatos com Artemia sp.	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	O tamanho dos neonatos de misidáceo é parecido com os náuplios de Artemia sp. usadas como alimento	1	Contagem dos neonatos antes do processo de alimentação	10	100

Continuação – Quadro 16: FMEA do processo de quantificação de neonatos durante o teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Contagem dos neonatos na 1ª e 2ª geração	Identificar efeitos sobre os neonatos na 1ª e 2ª geração	Esquecer de contar algum dos aquários	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Mistura de aquários sobre a mesa de manipulação	1	Padronizada a manipulação de um aquário de cada vez	5	50
		Esquecer de contar algum dos aquários	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falha na identificação de aquários	1	Identificação dos aquários com etiqueta no gargalo, presa com fio de nylon	1	10
		Confundir aquários de 1a e 2a geração	Resultados apresentam valores diferentes da realidade	10	Falha na identificação de aquários	1	Identificação dos aquários com etiqueta no gargalo, de cores diferenciadas para cada geração	1	10

A FMEA apresentada no Quadro 17 é relativa ao processo de medição dos misidáceos.

Quadro 17: FMEA do processo de medição dos misidáceos durante o teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Medição dos misidáceos	Identificar efeitos sobre o crescimento dos organismos	Organismo mal posicionado para medição	Dificuldade para obtenção da medida correta	8	Padrão de posicionamento não definido	3	Posicionar misidáceos de forma linear, acompanhando a marcação da escala da lupa	1	24
		Dificuldade de visualização da medida	Dificuldade para obtenção da medida correta	8	Foco da lupa mal posicionado	1	Efetuar regulagem do foco da lupa no início do processo de medição	1	8

Continuação – Quadro 17: FMEA do processo de medição dos misidáceos durante o teste de toxicidade crônica.

Processo	Função	Modo de falha potencial	Efeito potencial	S	Causa Potencial / Mecanismo de Falha	O	Controles	D	R.P.N.
Medição dos misidáceos	Identificar efeitos sobre o crescimento dos organismos	Organismo movimentando-se durante o processo de medição	Dificuldade para obtenção da medida correta	8	Medição de organismos ainda vivos	1	Sacrificar organismos com uma gota álcool etílico 70% antes da medição	1	8
		Sistema de medição não apresenta reprodutibilidade	Diferentes técnicos obtém medidas diferentes de um mesmo organismo	8	Falha na identificação dos pontos de medição	1	Definir pontos de medição dos organismos	10	80
		Sistema de medição não apresenta repetibilidade	O mesmo técnico obtém medidas diferentes de um mesmo organismo	8	Falha na identificação dos pontos de medição	1	Definir pontos de medição dos organismos	10	80
		Sistema de medição não apresenta discriminação	Misidáceos com tamanhos diferentes aparentam mesmo tamanho	8	Escala de medição com baixa resolução	1	Utilizar lupa com escala de 1/10 de milímetro	10	80
		Interferência na medida devido a canibalismo de partes do corpo do misidáceo	Misidáceos terão computadas medidas menores que as reais	8	Falta de alimento / comportamento o natural dos misidáceos	5	Alimentar os misidáceos diariamente / estabelecer ponto de medição diferente das extremidades	5	200

Avaliando-se a FMEA do processo de medição, os itens que apresentaram maior probabilidade de ocorrência são relativos a interferências na medição proveniente do canibalismo e também das características inerentes ao processo de medição, como a discriminação, repetibilidade e reprodutibilidade. Sendo assim, procedeu-se com a análise do sistema de medição proposto, utilizando o método Gage R&R.

### 4.3.3 Análise do sistema de medição de misidáceos

A definição do processo de medição partiu inicialmente da definição do método a ser aplicado. Assim sendo, o processo de medição considera três fatores primordiais, o primeiro o equipamento a ser utilizado, o segundo a forma de medição e o terceiro, o fator humano envolvido para a execução da medição.

O equipamento selecionado para efetuar as medições foi uma lupa com escala milimétrica (microscópio estereoscópico) instalada na lente ocular. Esse equipamento pode ser visualizado na Figura 16.



Figura 16: Lupa selecionada para o desenvolvimento do método para avaliação do sistema de medição de misidáceos.

Esta lupa possui escala milimétrica acoplada na lente ocular, dessa forma, o próximo item a ser definido, foi a localização da medição no corpo do misidáceo. Definiu-se como padrão executar a medição dos olhos até o último segmento abdominal, minimizando assim possíveis interferências causadas por canibalismo. A localização dos pontos de medição pode ser observada na Figura 17.

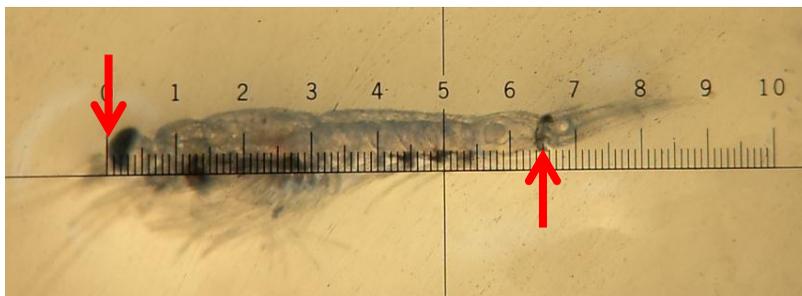


Figura 17: Misidáceo da espécie *Mysidopsis juniae*, observado na lupa com escala milimétrica de medição. A visualização está com ampliação do tamanho do organismo de 2x (duas vezes). As setas em vermelho indicam os pontos de medição.

Para a verificação da repetibilidade, reprodutibilidade e discriminação, foram efetuadas medições de 20 misidáceos, por duas técnicas com três repetições. O resultado da tabulação dos dados é apresentado na Figura 18, por meio do resumo do estudo Gage R&R ANOVA para o tamanho dos misidáceos. Os dados obtidos durante o processo de análise são apresentados no Apêndice A13.

Um bom sistema de medição é aquele que apresenta reprodutibilidade e repetibilidade, ou seja, pessoas diferentes fazendo o processo de medição apresentam valores muito semelhantes e também a mesma pessoa, fazendo a medida do mesmo organismo várias vezes obtém valores semelhantes. Não obstante, o sistema de medição deve ser capaz de identificar as diferenças de tamanho entre cada um dos indivíduos medidos (possuir discriminação).

Todas essas características podem ser avaliadas por meio da análise dos gráficos da Figura 18. No gráfico de amplitudes por técnico (b), é possível observar que a mesma pessoa, medindo várias vezes o mesmo organismo, consegue obter valores semelhantes, pois não há causas especiais no gráfico (pontos fora dos limites de controle superior e inferior). No gráfico das médias por técnico (c), é possível observar que o sistema possui discriminação, já que a maioria dos pontos

apresenta-se fora dos limites de controle superior e inferior, demonstrando assim que o sistema consegue capturar as diferenças de tamanho entre os indivíduos. Nos gráficos do tamanho por técnicos e interações = misidáceo x técnico (f), é possível observar que diferentes operadores, obtêm medidas semelhantes para o mesmo organismo na maioria dos casos.

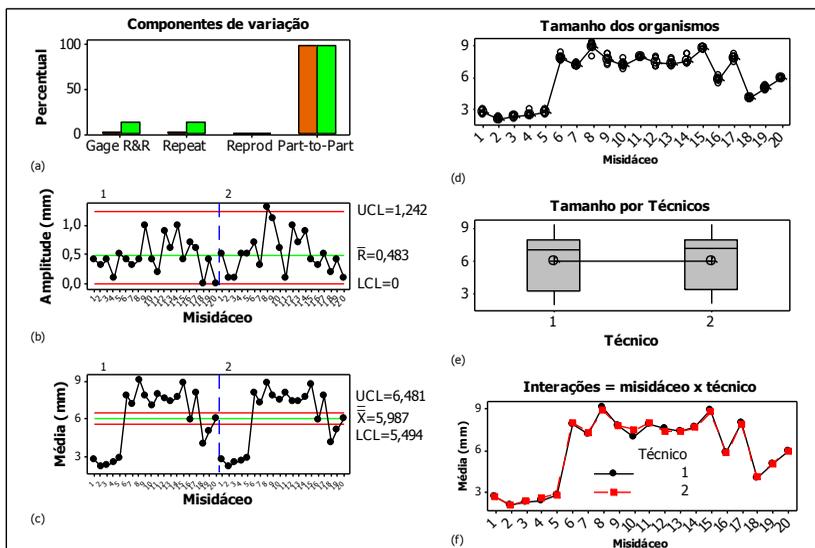


Figura 18: Análise do sistema de medição utilizando a técnica Gage R&R. Neste estudo foram avaliados 20 misidáceos por dois técnicos em uma mesma lupa, com medições realizadas em triplicata.

Assim, pode-se afirmar que o sistema de medição definido para quantificar o tamanho dos misidáceos é confiável, oferecendo todas as características necessárias para garantir a medição correta dos organismos.

#### 4.3.4 Montagem do teste

Sugere-se que sejam utilizados para o início do teste apenas organismos que apresentem sensibilidade adequada, por meio de monitoramento realizado com Dodecil Sulfato de Sódio, ou outra substância de referência, conforme recomendações da ABNT 15308:2011 (ABNT, 2011) que padroniza ensaios de toxicidade aguda.

Também sugere-se iniciar o teste de toxicidade com 90 organismos juvenis com 5 a 7 dias de vida para o controle e 90 para a amostra, considerando que, após o dimorfismo sexual, possam ser criadas famílias na proporção de 1 macho para 4 fêmeas. Deve-se montar um número igual de famílias para o controle e para a amostra, a partir dos 90 juvenis iniciais, em triplicata. Os organismos excedentes após o dimorfismo sexual devem ser descartados. Um esquema desse sistema a ser elaborado é demonstrado na Figura 19.

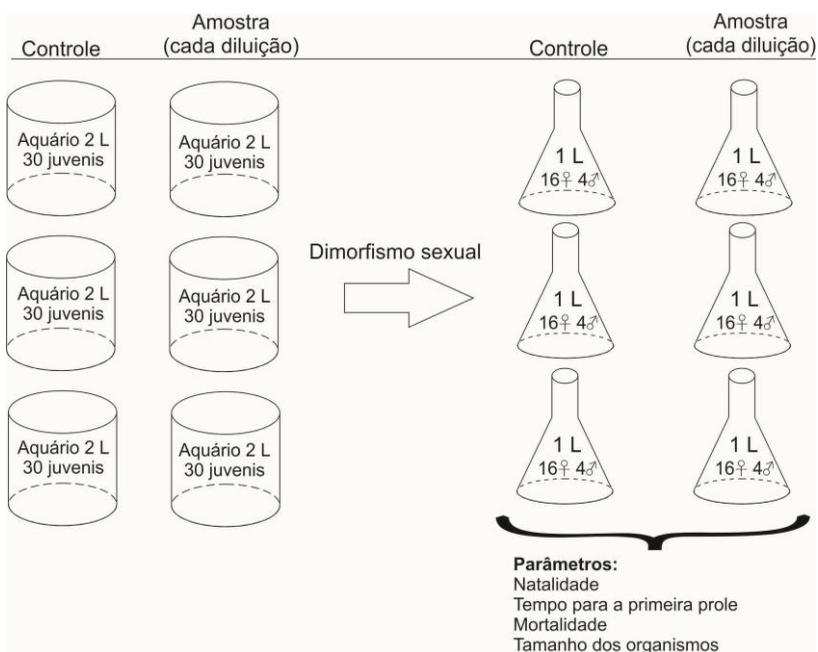


Figura 19: Diagrama esquemático para a montagem de um teste de toxicidade crônica com *M. juniae*.

No caso do teste de toxicidade, o uso de Erlenmeyer de 1 litro é mais adequado, já a quantidade de organismos necessária para um teste é menor que a de cultivo e que este tipo de recipiente ocupa menor espaço em relação aos frascos de 2 litros. Este tipo de frasco também apresenta robustez para minimizar as variações no volume de água e na salinidade entre os períodos de troca de água do teste. Em cada um dos recipientes devem estar contidos uma quantidade de 16 fêmeas para 4 machos, garantindo assim uma densidade máxima de 20 organismos por litro de amostra (1 misidáceo/50 mL).

A alimentação dos misidáceos deve ser realizada diariamente de acordo com a idade dos organismos, conforme recomendado pela ABNT 15308:2011, utilizando *Artemia sp.* eclodidas com 48 horas de vida e enriquecidas com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau.

#### 4.3.5 Condições abióticas para o teste

As condições para o a execução dos testes de toxicidade crônica devem ser semelhantes ao cultivo, buscando dessa forma minimizar variações nos resultados causadas por variações em parâmetros abióticos.

Essa manutenção das condições análogas ao cultivo tornam desnecessários períodos de adaptação dos organismos teste. Caso sejam necessárias análises com amostras ambientais que possuem características diferentes das listadas no Quadro 18, deverá se tomar o cuidado para não causar variações abruptas nas condições em que os misidáceos estão adaptados.

O Quadro 18 apresenta as condicionantes para o teste de toxicidade crônica. De maneira geral, busca-se com o estabelecimento desse padrão causar o mínimo de interferências durante a avaliação da toxicidade crônica e dessa maneira, garantir a confiabilidade nos resultados observados durante o teste de toxicidade, além de tornar possível a reprodução dessa metodologia em outros laboratórios de toxicologia ambiental e ecotoxicologia.

Quadro 18: Condições definidas para o teste de toxicidade crônica.

<b>Descrição</b>	<b>Recomendado</b>
Sistema	Semi-estático
Temperatura	25±1 °C
Fotoperíodo	12 horas luz; 12 horas escuro
Capacidade do Recipiente	Erlenmeyers de 1 litro
Densidade populacional	50 mL/indivíduo
Aeração	Constante e branda
Água marinha	Reconstituída a partir de água deionizada com sal marinho
Troca de água	1 vez por semana – total
Relação macho:fêmea	Proporção de 4 fêmeas para cada macho

Continuação – Quadro 18: Condições definidas para o teste de toxicidade crônica.

<b>Descrição</b>	<b>Recomendado</b>
Idade dos organismos	3 a 5 dias de vida
Tipo de Alimento	Náuplio de <i>Artemia sp.</i> com 48 h de vida, enriquecida com óleo de fígado de bacalhau e óleo de peixe (na proporção de 0,1 mL de cada óleo para 100 mL de água marinha)
Controles diários	Temperatura máxima e mínima da água e máxima, salinidade e aeração
Controles semanais	Nº de adultos e de filhotes, medição do tamanho por amostragem simples, salinidade da água
Controle da Sensibilidade das culturas	Teste com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio. A $CL_{50(96h)}$ obtida deve estar em um intervalo de $\pm 2$ desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para uso da prole para início do teste crônico.

#### 4.4 ESTUDO DE CASO UTILIZANDO O MÉTODO DESENVOLVIDO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA BAIÁ DA BABITONGA

Após a definição da metodologia para avaliação da toxicidade crônica, buscou-se a aplicação desse método primeiramente em amostras ambientais, já que nessas amostras, normalmente os poluentes encontram-se muito diluídos e não oferecem efeitos agudos ao organismo teste.

A baía da Babitonga (BB) é um ambiente que possui essa característica. Apesar da intensa antropização, como o volume de água da BB é elevado e o tempo de residência de 99% da água da BB é de 237 dias (AMORIM *et al.*, 2006), é propiciada a dispersão dos poluentes ao longo do tempo e também sua diluição no interior do estuário.

Os experimentos foram conduzidos ao longo de 60 dias, conforme definido no método, com a água coletada nos pontos selecionados. Foram realizadas trocas de água semanais dos aquários controle e dos aquários com a amostra, bem como o acompanhamento de parâmetros físico-químicos de forma a garantir acuracidade no teste. Os dados obtidos nos testes de toxicidade crônica são apresentados nos Apêndices A14 a A17.

Os parâmetros oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade, pH da água nos controles e amostras estudadas ficaram na faixa de 4,3-6,3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (> 60% de saturação), 23-26 °C, 32-35‰, 8,1-8,3 respectivamente. A sobrevivência de 96 horas na primeira geração foi  $\geq 95\%$  nos controles e nas amostras em todos os casos testados.

O teste executado apresentou-se adequado para a identificação de alterações nas características definidas para avaliação. Foi possível identificar diferenças estatísticas significativas nas características crescimento, reprodução, tempo para primeira prole e mortalidade, quando comparados os grupos controle com as amostras nos pontos interiores à BB. No ponto P4, localizado em uma região de mar aberto, não houve diferença estatística significativa em nenhuma das variáveis avaliadas. Esse comportamento dos resultados confirma a hipótese de que a BB é um local em que a presença de poluentes pode causar interferências na saúde dos ecossistemas. Os resultados das características avaliadas são apresentados de forma resumida no Quadro 19. A codificação APn significa “Amostra do Ponto n” e CPn “Controle do Ponto n”, sendo n o número do ponto. Foram usados métodos estatísticos inferenciais para identificar se ocorreram diferenças significativas entre os controles e as amostras e também para verificar se ocorreram diferenças significativas entre os controles dos pontos P1 a P4, visando verificar a estabilidade dos testes executados. Cada um dos testes foi realizado em períodos diferentes, por esse motivo, cada um deles possui um controle associado.

As regiões preenchidas em cinza no Quadro 19 denotam as características que apresentaram diferenças significativas com base no método estatístico utilizado.

Quadro 19: Comparação entre as amostras e os controles considerando as variáveis estudadas nos ensaios de toxicidade crônica, reprodução, tamanho e mortalidade.

Variável	AP1	CP1	AP2	CP2	AP3	CP3	AP4	CP4
Primeira prole na primeira geração (dias)	<sup>(1)</sup> 17	<sup>(1)</sup> 34	18	27	23	28	16	16
Primeira prole na segunda geração (dias)	<sup>(1)</sup> 57	<sup>(1)</sup> 36	16	23	24	21	13	16
Média e desvio-padrão do tamanho dos organismos (mm) na 1ª geração	3,802 ± 0,8764	3,89 ± 0,6176	* 3,180 ± 0,7423	* 3,513 ± 1,193	* 3,422 ± 0,8977	* 3,731 ± 0,8140	4,243 ± 0,3765	4,083 ± 0,2350
Nascidos na primeira geração	*142,35% maior que o controle	*100%	24,71% menor que o controle	100%	19,51% menor que o controle	100%	16% menor que o controle	100%
Nascidos na segunda geração	21,43% maior que o controle	100%	*45,24% menor que o controle	* 100%	100% igual ao controle	100%	18% maior que o controle	100%
Mortalidade total após 50 dias de teste na 1ª geração	* 70%	* 65,6%	* 88,7%	* 60%	** 79,2%	** 72,1%	52,8%	48,3%

<sup>(1)</sup> variáveis que apresentaram diferenças significativas entre a amostra e o controle para um intervalo de confiança de 95% utilizando o teste estatístico Qui-quadrado com um intervalo de confiança de 95%.

\* variáveis que apresentaram diferenças significativas entre a amostra e o controle utilizando o teste t de Student, para um intervalo de confiança de 95%.

\*\* variáveis que apresentaram diferenças significativas entre a amostra e o controle apenas após 40 dias de teste, utilizando o teste t de Student com intervalo de confiança de 95%.

#### 4.4.1 Tempo para a primeira prole

Os pontos P2 e P3 e P4 não apresentaram diferenças significativas para essa característica quando comparados com os controles, utilizando o teste Qui-Quadrado com intervalo de confiança de 95% ( $p>0,05$ ).

Para a amostra do ponto P1, o tempo para a primeira prole tanto na primeira como na segunda geração foram significativamente diferentes que o controle. Na primeira geração, a primeira prole da amostra do ponto P1 sofreu uma indução, sendo que os primeiros neonatos foram observados em 17 dias de teste. Na segunda geração a primeira prole da amostra ocorreu apenas após 57 dias após o nascimento da segunda geração (3,35 vezes maior que a primeira geração), com um retardo substancial no tempo para surgimento dos primeiros neonatos. Utilizando o teste Qui-quadrado com  $\alpha=0,05$ , essa variável resultou num valor de  $p<0,05$  comparando o controle com a amostra, apresentando assim diferença estatística significativa.

Para avaliar se ocorreram diferenças significativas entre os controles, foi aplicado o teste não-paramétrico de Friedman. Para um intervalo de confiança de 95%, detectou-se que não há diferenças significativas entre os controles dos pontos P1, P2, P3 e P4 no quesito tempo para primeira prole na primeira e segunda geração ( $p>0,05$ ).

#### 4.4.2 Comprimento total dos organismos

Para as amostras do ponto P1 e P4, o comprimento total dos organismos foi similar ao encontrado no controle. Utilizando o teste t de Student para  $\alpha=0,05$ , foi possível observar que não há diferença estatística significativa entre a amostra e o controle ( $p>0,05$ ).

Já nas amostras P2 e P3, o comprimento total nos controles foram 10,5% e 9,03% maiores que nas amostras, respectivamente. O teste t de Student mostrou que há diferenças significativas entre os controles e as amostras ( $p<0,05$ ). Efetuando o teste t de Student para comparar os controles dos testes entre si, observou-se que não há diferenças significativas entre os controles para um intervalo de confiança de 95%, com valor de  $p>0,05$ .

#### 4.4.3 Natalidade

Para a avaliação desta característica, foram convertidos os valores do número total de nascidos em percentual, considerando que o valor

obtido nos controles representam 100% e calculando os valores relativos às amostras (maiores ou menores que o controle). A análise estatística inferencial foi realizada por meio do teste t de Student com  $\alpha=0,05$ .

Os neonatos da 1ª geração não apresentaram diferenças significativas entre o controle e a amostra para os pontos P2, P3 e P4. Porém a amostra do ponto P1 apresentou uma quantidade de neonatos muito superior ao do controle (142,35% maior). Neste caso, ocorreram diferenças significativas entre o controle e a amostra.

Os neonatos da segunda geração não apresentaram diferenças significativas entre o controle e a amostra para os pontos P1, P3 e P4. Para o ponto P2 essa diferença foi significativa, com nascimentos 45,24% menores que no controle.

Um dos dados que chama a atenção neste fator é que na primeira geração ocorreu uma reprodução acentuada no ponto P1, a qual deveria gerar uma quantidade de neonatos muito elevada em relação ao controle na segunda geração em função dos potenciais reprodutores. Porém a quantidade de neonatos na segunda geração desse ponto foi muito semelhante ao controle.

Na comparação entre os controles dos testes efetuados, utilizado um intervalo de confiança de 95% ( $p>0,05$ ), não foram observadas diferenças significativas.

#### **4.4.4 Mortalidade**

A mortalidade foi um dos dados medidos que apresentou diferenças significativas entre os controles e as amostras para os pontos P1, P2 e P3 (teste t de Student,  $p<0,05$ ), com a ressalva de que no ponto P3 essa diferença só se mostrou significativa após 40 dias de teste. No ponto P4, essa diferença não foi significativa. A comparação entre os controles dos pontos P1 a P4 também não apresentou diferenças significativas entre eles, com  $p>0,05$ .

#### **4.4.5 Discussão**

Este estudo, enquanto descrevendo os efeitos das amostras de água da BB e de um ponto de mar aberto em misidáceos expostos durante um estudo transgeracional em laboratório, provê informações sobre os impactos relativos à carga poluidora descarregada na BB aos organismos teste. A exposição de *Mysidopsis juniae* após o dimorfismo sexual às amostras de água, ocasionou efeitos adversos no tempo decorrido para a primeira prole, mortalidade, quantidade de neonatos e

tamanho dos organismos, sendo que os resultados das amostras diferiram significativamente do controle nos pontos do interior da baía.

Estes efeitos adversos podem estar relacionados à presença de misturas dos metais Cd, Pb, Cu, Cr, Ni e Zn nas amostras de água., sendo que a presença desses metais na BB já foi relatada nesta região em amostras de água, sedimentos e bioacumulada em organismos marinhos. Os metais que mais se acumularam em organismos semelhantes aos misidáceos são em primeiro lugar o Zn e em segundo lugar o Cu (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em virtude do alto poder de complexação dos íons de cloro presentes na água salgada, supõe-se que os metais Cádmio e Chumbo sejam aqueles que tenham menor influência na toxicidade, já que os dois são fortemente influenciados pelos íons cloreto (VERSLYCKE *et al.*, 2003), além do Cd provavelmente competir com o Zn pelos sítios ativos para a síntese da metalotioneína, gerando um efeito antagônico entre esses dois metais (FRÍAS-ESPERICUETA *et al.*, 2009), visto que o Zn tem prioridade na síntese da metalotioneína. O metal Cromo também exerce pouca influência sobre a toxicidade por estar provavelmente presente na forma de Cr III, sua forma menos tóxica, decorrente do potencial redox e do pH do meio marinho.

Já os metais Cobre, Níquel e Zinco podem ter contribuído de forma substancial para a toxicidade. O Cu é relatado como um metal de alta toxicidade, com  $CL_{50(96h)}$  para misidáceos da ordem de 68 ppm (VERSLYCKE *et al.*, 2003). Na concentração de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  foram observadas alterações significativas em misidáceos após 96 horas de exposição e mortalidade em concentrações acima de  $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  após 10 dias de exposição (GARNACHO *et al.*, 2001). O Zinco possui toxicidade de aproximadamente 17 vezes maior que o Cobre em salinidade 35‰ (FRÍAS-ESPERICUETA *et al.*, 2009), podendo ser considerado a variável predominante para a toxicidade encontrada. Além da elevada toxicidade como metais isolados, o Cobre e Zinco são relatados como compostos que apresentam interação sinérgica entre si, intensificando sobremaneira os efeitos tóxicos a *Vibrio fischeri* quando existentes presentes de forma conjunta no meio aquático (UTGIKAR *et al.*, 2004).

O Níquel também deve ter contribuído para a toxicidade, porém este composto possui um potencial tóxico menor que Cu e Zn (LUSSIER *et al.*, 1985; MCLUSKY e HAGERMAN, 1987; VERSLYCKE *et al.*, 2003). Em um estudo para avaliar as interações de misturas de Ni e Zn, foi observado que a toxicidade se dá principalmente pelo aumento da concentração de Zn (HERKOVITS *et*

*al.*, 2000), sugerindo assim que Cu e Zn podem ser os principais causadores da toxicidade observada. Cu (HANDY, 2003; KHANGAROT e DAS, 2010; MEDESANI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008; RHEE *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007) e Zn (RHEE *et al.*, 2009) são relatados como potenciais desreguladores endócrinos, sendo essa uma possível explicação para os efeitos observados no crescimento, tempo para primeira prole e mortalidade dos organismos nas amostras de água no interior da baía.

Dessa maneira, conclui-se que os efeitos tóxicos observados sobre a mortalidade, natalidade e tamanho dos organismos, podem estar relacionados ao sinergismo entre cobre e zinco, porém sem descartar as contribuições dos outros metais e compostos orgânicos presentes na água, que podem ter influenciado nos resultados, mas de forma menos relevante, já que Pb (HIRSCH *et al.*, 2010), Cd (KETATA *et al.*, 2007; MEDESANI *et al.*, 2004; RHEE *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007) e Cr (BANU *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008) também são relatados como desreguladores endócrinos.

A partir da comparação dos resultados com o estudo de (OLIVEIRA *et al.*, 2006), sugere-se que os metais Zn e Cu são os principais causadores da toxicidade nos misidáceos, visto que além de possuírem um poder de bioacumulação maior que os outros metais, eles atuam sinergicamente para aumentar sua toxicidade na mistura. O Zn merece especial atenção, em função do seu poder de bioacumulação diferenciado de todos os outros metais estudados para amostras com salinidade de 33‰, associado à sua elevada toxicidade.

Como os misidáceos estão entre os organismos mais sensíveis (NIMMO e HAMAKER, 1982) a uma ampla gama de contaminantes (VERSLYCKE *et al.*, 2007; VERSLYCKE *et al.*, 2004c), a aplicação de testes de toxicidade crônica transgeracionais com *Mysidopsis juniae*, uma espécie endêmica do Brasil, pode ser útil para a identificação de poluentes nos ambientes aquáticos de regiões tropicais.

Como os misidáceos são importantes membros da cadeia alimentar, servindo de alimento para várias espécies de peixes, pode-se assumir que um decréscimo na população desse microcrustáceo pode causar um desequilíbrio no ecossistema da BB pela diminuição da oferta de alimento.

Os testes de toxicidade crônica com *Mysidopsis juniae* podem ser úteis para estudos similares, pela facilidade de execução, sensibilidade e possibilidade de uso em águas tropicais, bem como para estudos com substâncias puras.

## 4.5 ESTUDO DE CASO PARA IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

Em uma segunda etapa de aplicação do método, buscou-se avaliar os efeitos crônicos de nanopartículas de óxido de cobre, um material que está sendo estudado pela equipe do LABTOX da UFSC em decorrência de sua ampla variedade de aplicações, incluindo, mas não se limitando ao uso em tintas anti-incrustantes para cascos de navios. Os dados obtidos durante o teste com  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de NPCuO estão listados no Apêndice A18 a A21. Como primeira etapa, foi efetuada uma caracterização desse material, para garantir que o mesmo em solução aquosa estaria em dimensões nanométricas.

### 4.5.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de cobre por microscopia eletrônica de transmissão

A imagem da microscopia eletrônica de transmissão mostra a nanopartícula de óxido de cobre utilizada no experimento em nanoescala (Figura 20). A média do diâmetro dos aglomerados foi de 200 nm, demonstrando assim que o material permanece na forma de nanopartícula, mesmo em solução aquosa, porém com elevado nível de aglomeração.

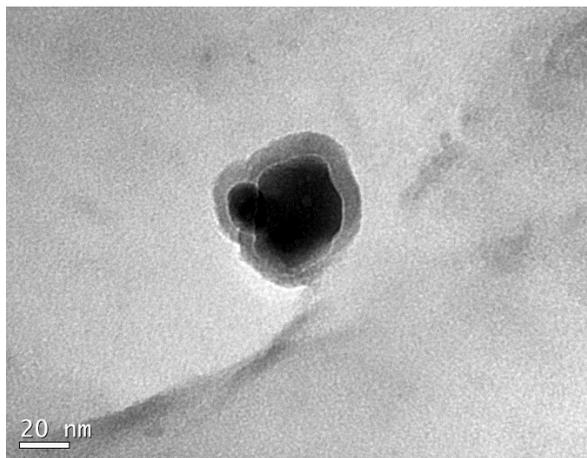


Figura 20: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com dimensão da nanopartícula de óxido de cobre.

### 4.5.2 Toxicidade aguda

Para a definição da faixa de concentração que seria utilizada no teste de toxicidade crônica, foi realizado como primeiro experimento a avaliação da toxicidade aguda das amostras de nanopartículas de óxido de cobre. A concentração que não apresentou efeitos adversos aos misidáceos foi de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A  $CL_{50(96h)}$  calculada a partir de um segundo teste foi de  $9,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , usando o método dos probitos para esta estimativa. A Figura 21 apresenta o gráfico gerado pelo software Minitab para o cálculo da concentração mediana. Uma escala de toxicidade para compostos químicos, classifica como: extremamente tóxico ( $<0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), muito tóxico ( $0,1 \text{ a } 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), tóxico ( $1 \text{ a } 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), nocivo ( $10 \text{ a } 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e não tóxico ( $>100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (BLAISE *et al.*, 2006). De acordo com a  $CL_{50(96h)}$  ( $9,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) obtida neste estudo, pode-se afirmar que as NPCuO são classificadas como um material tóxico, nas condições estudadas.

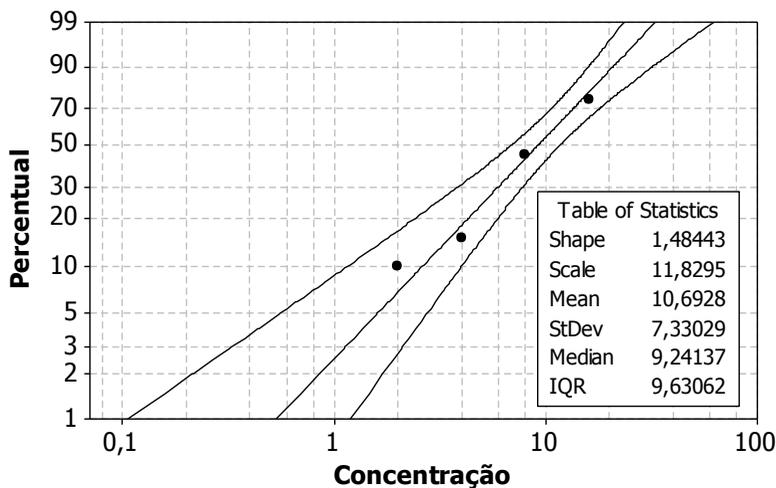


Figura 21: Representação da  $CL_{50(96h)}$  utilizando o software Minitab 16. O valor da concentração é expresso pela mediana ( $9,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 4.5.3 Teste de toxicidade crônica

Para determinar a toxicidade crônica, foram estabelecidas três diferentes concentrações, sendo elas  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $75 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

de NPCuO. Esses valores foram definidos a partir da concentração que não gerou efeito durante o teste de toxicidade aguda ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Foram observados efeitos adversos nas características natalidade e mortalidade dos organismos apenas na concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , podendo ser considerada  $75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a concentração de efeito não observado (CENO).

Para a concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , os efeitos das NPCuO na mortalidade apareceram após 7 dias de exposição. Os efeitos da exposição na natalidade foram observados a partir dos 39 dias de vida dos misidáceos. O teste Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95% foi utilizado para identificar diferenças na natalidade causadas pela exposição às nanopartículas. A natalidade dos misidáceos expostos à concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pode ser observada na Figura 22. Foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a amostra e o controle apenas na segunda metade do período de exposição. Na primeira metade do período de exposição, o número de juvenis foi muito similar entre o controle e a amostra, porém após 39 dias o número de juvenis no controle foi 6 vezes maior que na amostra. Sugere-se que em concentrações reduzidas de NPCuO, apenas exposições de longa duração podem causar alterações na natalidade dos misidáceos.

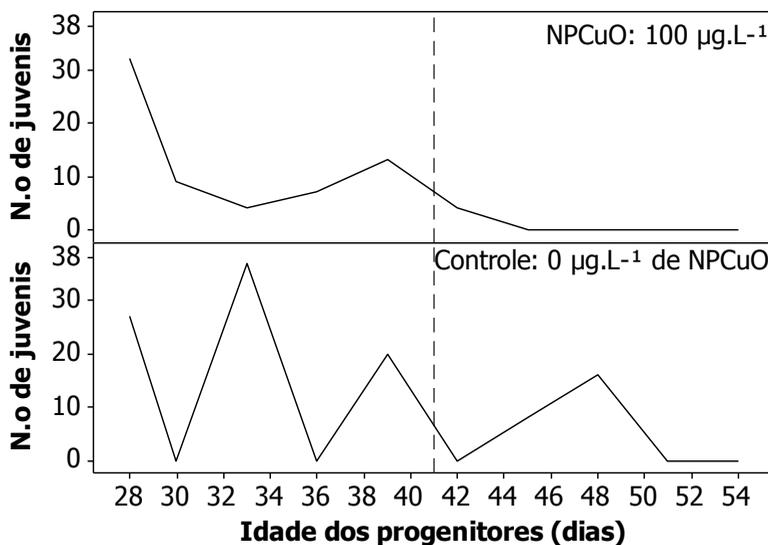


Figura 22: Natalidade dos misidáceos expostos ao controle e à amostra com concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de nanopartículas de óxido de cobre.

A mortalidade dos misidáceos foi mais intensa nas fêmeas que nos machos, quando expostos às NPCuO (Figura 23), apresentando diferenças significativas quando utilizado o teste Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95%. Já a mortalidade dos machos foi muito semelhante na amostra e no controle, sugerindo assim que as fêmeas são mais sensíveis às nanopartículas que os machos. Não foram observadas diferenças significativas para o tamanho dos organismos.

A segunda geração dos misidáceos também foi avaliada. Para as concentrações de 50 e 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$  não ocorreram diferenças significativas entre o controle e a amostra, porém para a concentração de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , a segunda geração não conseguiu reproduzir até o final do teste, em que os progenitores já estavam com 26 dias de vida. Os organismos do controle iniciaram a reprodução da 2ª geração com 18 dias de vida.

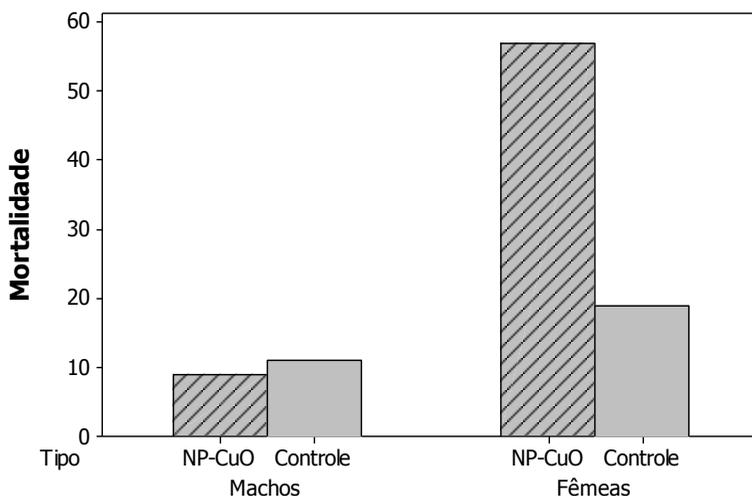


Figura 23: Mortalidade de misidáceos por sexo no controle e na amostra, durante os 31 dias de duração do teste de toxicidade crônica. A amostra contém 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de concentração de NPCuO em água reconstituída.

#### 4.5.4 Discussão

Os efeitos tóxicos agudos das nanopartículas de óxido de cobre foram observados apenas em concentrações acima de 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em ensaios com 96 h de duração. A  $CL_{50(96h)}$ , calculada pelo método dos

probitos foi de  $9,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sendo que foram encontrados valores de  $\text{CL}_{50}$  da ordem de  $0,06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para *Daphnia pulex* e  $0,94 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para adultos de *Danio rerio* expostos à NPCuO (GRIFFITT *et al.*, 2008). Valores de  $\text{CL}_{50}$  para *Ceriodaphnia dubia* ficaram entre 0,00214 a 0,048  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , e sugere-se que altas concentrações de carbono orgânico dissolvido resultam em menor toxicidade, causado pela complexação do metal cobre com o carbono orgânico dissolvido (GAO *et al.*, 2009). Ainda não estão disponíveis outros estudos com misidáceos para comparar os resultados obtidos neste ensaio. O mecanismo de complexação pode explicar a menor toxicidade encontrada para os misidáceos, já que a água em que os testes foram executados possui alta concentração de íons cloreto, um potente agente complexante, podendo ocasionar a formação de complexos de tetraclorocuprato ( $\text{CuCl}_4^{3-}$ ), resultando em toxicidade reduzida (BERG *et al.*, 1979), porém mais estudos para identificar esse tipo de comportamento devem ser realizados.

Outra explicação para a menor toxicidade da NPCuO ao organismo *M. juniae*, quando comparados com os estudos com outros organismos, pode ser a agregação das NPCuO causada pela presença de água salgada, resultando em partículas de maior diâmetro. Essa agregação pode ocorrer após 2 dias (BUFFET *et al.*, 2011), tornando as NPCuO indisponíveis, sendo que quando elas se agregam, o comportamento do bloco pode ser distinto das NP não agregadas (PERALTA-VIDEA *et al.*, 2011). Apesar dessa condição poder existir, as trocas de água semanais, expõem os misidáceos a amostras em que a agregação ainda não ocorreu, já que as mesmas são preparadas apenas algumas horas antes da troca de água.

Os mecanismos precisos da toxicidade de NP ainda são desconhecidos (GRIFFITT *et al.*, 2008), porém estudos indicam que as NPCuO são altamente reativas e tóxicas. Os efeitos das NP podem resultar da sua reatividade intracelular e excessiva acumulação no interior das células, causando sobrecarga das concentrações intracelulares de íon cobre (MENG *et al.*, 2007). Este efeito das NP nas células é conhecido como mecanismo de “cavalo de Tróia”. As membranas celulares possuem barreiras para evitar a absorção da maioria dos íons, todavia, as NP podem eficientemente passar pela membrana celular. Após atravessar essa barreira, as nanopartículas podem ser dissolvidas dentro das células, presumidamente pelos lisossomos, resultando em danos causados pelo metal na sua forma de íon livre. A forma livre deste metal traço pode afetar as células pela

mudança da pressão osmótica, associada com a dissolução do óxido gerando radicais livres no interior das células (STUDER *et al.*, 2010).

Já a exposição de longa duração, causa efeitos nos misidáceos a partir da concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de NPCuO, que pode ser causada pela bioacumulação e/ou ionização intracelular das nanopartículas nos organismos.

O uso intensivo de NP e nanomateriais tem resultado em numerosos avanços tecnológicos, sejam em novos produtos ou processos, porém, uma nova classe de poluentes surge com esses avanços. Este estudo apresenta uma avaliação dos efeitos agudos e crônicos de NPCuO, demonstrando que esse material merece atenção em seu uso, disposição e relacionado a acidentes ambientais. O estudo também demonstra que o uso de *M. juniae* é adequado para identificar os efeitos tóxicos dessas NP em ambientes aquáticos marinhos.

Considerando o uso de NPCuO para a composição de tintas anti-incrustantes para navios e plataformas de extração de petróleo *offshore*, este estudo sugere cuidado no uso dessas nanopartículas.

#### 4.6 SOFTWARE PARA ACOMPANHAMENTO E TABULAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE

Após a identificação de que o processo de organização das informações e posterior tabulação dos resultados dos testes de toxicidade demandava cuidados e trabalho intenso, decidiu-se elaborar um software que propiciasse auxílio tanto na gestão do teste de toxicidade quanto na tabulação final dos dados. O código fonte do software desenvolvido é apresentado no Apêndice A22.

Para o acompanhamento e a tabulação do teste de toxicidade, foi criado um software baseado em linguagem VBA (*Visual Basic for Applications*) do Microsoft Excel® 2010, que auxilia na informação de quais parâmetros devem ser acompanhados diariamente, bem como na organização das informações. Após a coleta de dados, o pesquisador tem a possibilidade de verificar dia-a-dia os resultados do teste de toxicidade, podendo avaliar se há tendências na amostra ou até mesmo no controle, não necessitando aguardar o fim do teste para tomada de ações, como por exemplo, reiniciar o teste após a detecção de mortalidade acima do esperado no controle. O software foi nominado MASCoTE – Metodologia para análise simplificada e coordenada da toxicidade estudada.

Para o correto funcionamento do sistema, o usuário deve habilitar o uso de macros no Excel. A tela apresentada na Figura 24 mostra a lista

de opções para o usuário, sendo elas a configuração do início do teste, o lançamento de dados de 1ª ou de 2ª geração e a análise de resultados.

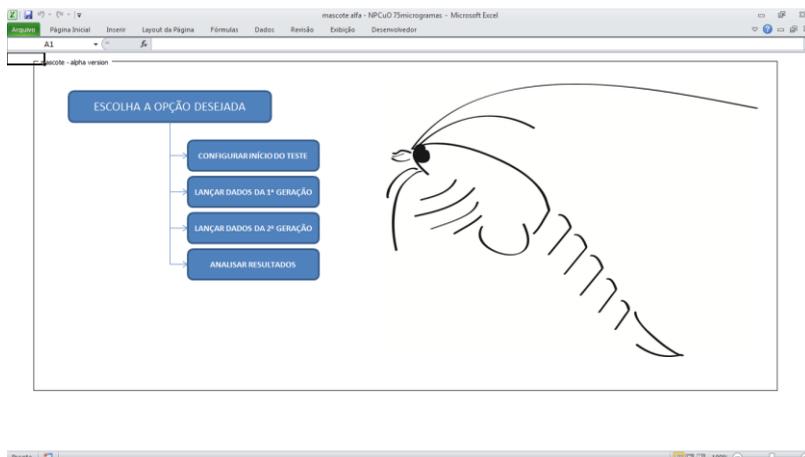


Figura 24: Tela de opções do MASCOTE para interface com o usuário.

**CAPA E RESUMO - TESTE CRÔNICO COM *Mysidopsis juniae***

DATA DE INÍCIO DO TESTE	01/08/2011	Número de dias para a primeira prole	
1ª PROLE DA 1ª GERAÇÃO CONTROLE	05/08/2011		4
1ª PROLE DA 2ª GERAÇÃO CONTROLE	19/08/2011		14
1ª PROLE DA 1ª GERAÇÃO AMOSTRA	05/08/2011		4
1ª PROLE DA 2ª GERAÇÃO AMOSTRA	19/08/2011		14
Nascidos controle 1ª geração	469	Nascidos controle 2ª geração	449
Nascidos amostra 1ª geração	484	Nascidos amostra 2ª geração	637
Tamanho médio no controle 1ª geração	7,908333333	<b>AMOSTRA TESTADA</b>	
Tamanho médio na amostra 1ª geração	8,025	NP_CuO_75 microgramas/L	
População total (sobrevivência) no controle 1ª geração	105	População total (sobrevivência) no controle 2ª geração	0
População total (sobrevivência) na amostra 1ª geração	95	População total (sobrevivência) na amostra 2ª geração	0
Fêmeas descartadas no controle 1ª geração	16	Fêmeas descartadas no controle 2ª geração	215
Fêmeas descartadas na amostra 1ª geração	21	Fêmeas descartadas na amostra 2ª geração	228
Machos descartados no controle 1ª geração	1	Machos descartados no controle 2ª geração	223
Machos descartados na amostra 1ª geração	4	Machos descartados na amostra 2ª geração	169
Salinidade média controle 1ª geração	31,6896517	Salinidade média controle 2ª geração	32,04
Salinidade média amostra 1ª geração	32,44827586	Salinidade média amostra 2ª geração	32,6
Temperatura máxima média	25,48275862		
Temperatura mínima média	24,26206897		
Temperatura média do condicionador	27		
Mortos sem maturação sexual controle 1ª geração	0	Mortos sem maturação sexual controle 2ª geração	58
Mortos sem maturação sexual amostra 1ª geração	0	Mortos sem maturação sexual amostra 2ª geração	54
Machos mortos no controle 1ª geração	5	Machos mortos no controle 2ª geração	2
Machos mortos na amostra 1ª geração	2	Machos mortos na amostra 2ª geração	6
Fêmeas mortas no controle 1ª geração	11	Fêmeas mortas no controle 2ª geração	0
Fêmeas mortas na amostra 1ª geração	6	Fêmeas mortas na amostra 2ª geração	2

Figura 25: Tela para configuração do início do teste e apresentação do resumo do teste de toxicidade crônica.

Na tela de Configuração do Início do Teste (Figura 25), o usuário deverá informar a data do início do teste e o nome e concentração da amostra a ser testada (campos em amarelo). Essa mesma tela apresenta um resumo dos dados já lançados pelo usuário, caso já tenha sido preenchido algum dado nas telas de Lançamento de Dados da 1ª Geração ou Lançamento de Dados da 2ª Geração. O botão vermelho no canto direito superior, quando clicado, leva ao menu inicial.

A tela de lançamento de dados (Figura 26) contém os campos para lançamento de informações físico-químicas e bióticas do teste. O usuário deve preencher apenas os espaços em branco, nos dias em que forem solicitados, indicado pelo campo da data em amarelo. Os espaços com hachuras em cinza não estão habilitados para edição. Cada um dos campos possui uma caixa de informações, visando ajudar o usuário a identificar qual a informação que deverá ser digitada naquele campo. Alguns dos campos possuem uma lista suspensa para seleção do valor. Sempre que o campo é preenchido, a cor da célula muda de branca para azul.

Na tela de análise dos resultados (Figura 27), são apresentados gráficos de salinidade da primeira e segunda geração, no controle e na amostra, bem como um gráfico da temperatura máxima e mínima ao longo do período do teste.

A partir dos dados de tamanho, natalidade e primeira prole, apresentados em tabelas, são calculadas as variâncias desses dados a partir de uma análise de ANOVA além da avaliação do tempo para a primeira prole com o método Qui-Quadrado. Os resultados dessa análise aparecem em tabelas logo abaixo dos valores do tamanho e natalidade. A mortalidade e os dias para a primeira prole na primeira e segunda geração são apresentados em gráficos de colunas. A mortalidade é separada em machos e fêmeas e a análise estatística inferencial com ANOVA e Qui-Quadrado é apresentada também em tabelas.

Após o lançamento de todos os dados de 1ª e 2ª geração, o usuário deve acionar o botão calcular. Esse procedimento efetua todos os cálculos estatísticos e a geração dos gráficos. As tabelas com o resultado da ANOVA e Qui-Quadrado já possuem uma funcionalidade que indica se as diferenças entre o controle a amostra foram significativas ou não, para um  $\alpha=0,05$ . Com esse resumo, é possível inferir se a amostra testada apresentou efeito crônico aos misidáceos ou se esse efeito não teve significância estatística.

masquete alfa - NF

Arquivo    Página Inicial    Inserir    Layout da Página    Fórmulas    Dados    Revisão    Exibição    D

F30    fx    25,1

Dias de teste	Data	volets	Limpeza	Água contro	Água Test	T água máxim	T água mínim	T Condicionad	Salinidade Contro	Salinidade A
0	15/07/2012	OK		Preparada	Preparada	24,6	24,2	27	31	
1	16/07/2012					25,8	24,3	27	31	
2	17/07/2012					25,2	23,7	27	31	
3	18/07/2012					25,2	23,2	27	31	
4	19/07/2012					25,1	23,9	27	31	
5	20/07/2012					24,8	23,4	27	31	
6	21/07/2012					25,5	24,3	27	31	
7	22/07/2012	OK		Preparada	Preparada	26	24,7	27	31	
8	23/07/2012					25,8	24,7	27	31	
9	24/07/2012					25,8	25	27	31	
10	25/07/2012					26,1	25,1	27	32	
11	26/07/2012					25,6	24,8	27	32	
12	27/07/2012					25,4	24,1	27	32	
13	28/07/2012					26,5	25,4	27	32	
14	29/07/2012	OK		Preparada	Preparada	25,6	24,4	27	32	
15	30/07/2012					25,3	24,7	27	32	
16	31/07/2012					25,6	24,8	27	32	
17	01/08/2012					26,2	25,2	27	32	
18	02/08/2012					25,7	24,7	27	32	
19	03/08/2012					25,6	24,5	27	32	
20	04/08/2012					25	23,5	27	32	
21	05/08/2012	OK		Preparada	Preparada	24,2	22,8	27	32	
22	06/08/2012					25,6	25,1	27	32	
23	07/08/2012					25,7	24,4	27	32	
24	08/08/2012					25,5	24,6	27	32	
25	09/08/2012					26,1	25,2	27	32	
26	10/08/2012					25,3	22,5	27	32	
27	11/08/2012					25,1	23,2	27	32	
28	12/08/2012	OK		Preparada	Preparada	25,1	23,2	27	33	

Figura 26: Tela para lançamento de dados do teste de toxicidade crônica. Os campos em azul representam informações já preenchidas. A linha com destaque em amarelo representa o dia que está em avaliação, indicando assim a linha que deve ser preenchida na tabela de dados.

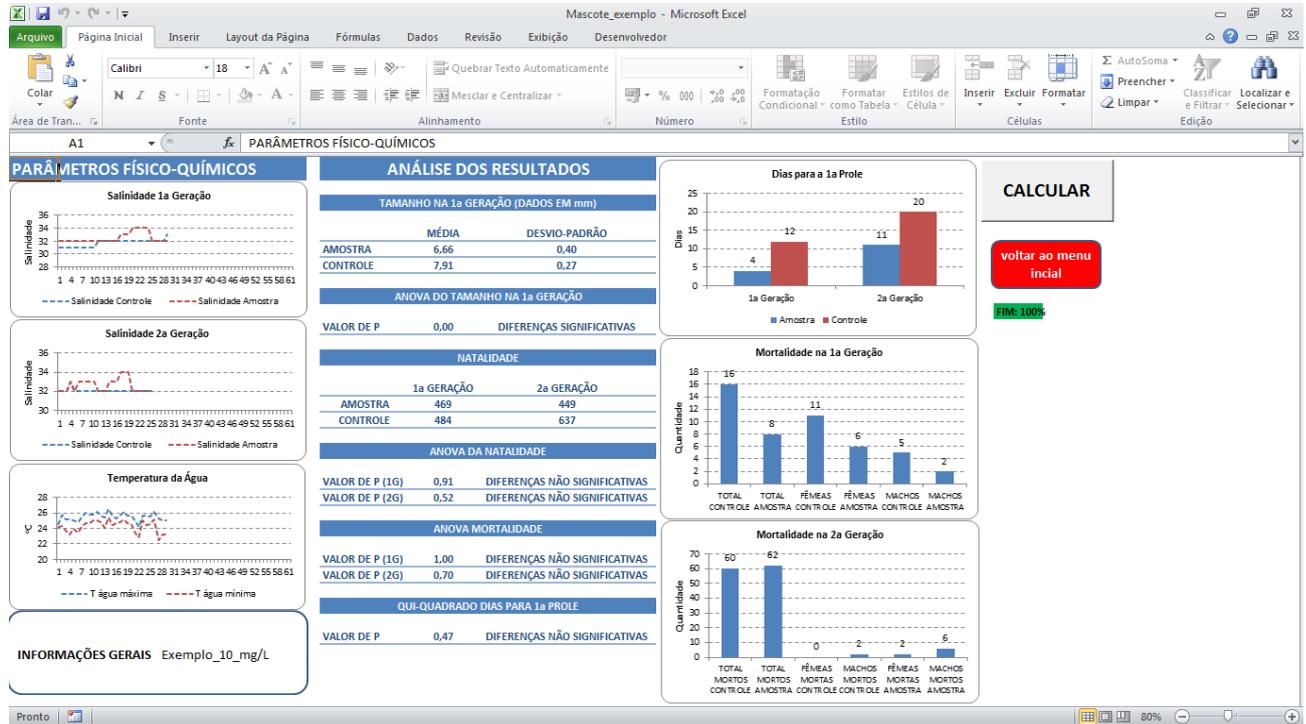


Figura 27: Tela de análise dos resultados em um exemplo. Os dados são tabulados após o usuário acionar o botão “Calcular” no canto direito superior da tela.

Toda essa automatização visa eliminar a necessidade de escolha de métodos estatísticos para a análise dos dados de toxicidade crônica, além de padronizar o uso para diferentes laboratórios. De maneira geral, os técnicos que executam o teste crônico poderão acompanhar ao longo do experimento o resultado das reações observadas em cada uma das características que são acompanhadas. Essa metodologia ajuda a identificar variações e definir exatamente em qual momento a toxicidade começou a apresentar diferenças significativas entre o controle e a amostra estudada.

O software foi utilizado de forma piloto para a avaliação dos efeitos de NPCuO nas concentrações de 75 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . O uso da metodologia proposta atendeu às necessidades de gerenciamento do teste, organização e tabulação dos dados, além do indicativo dos efeitos observados, demonstrando a efetividade do modelo sugerido. As Figuras 28 a 30 apresentam os resultados do teste de toxicidade crônica com concentração de 75  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de nanopartículas de óxido de cobre.

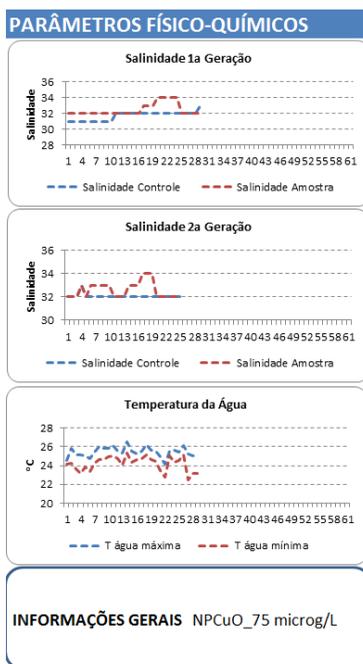


Figura 28: Tabulação gráfica dos parâmetros abióticos acompanhados ao longo do teste de toxicidade crônica, realizada pelo software MASCoTE.

Na Figura 28, os dados de temperatura e salinidade acompanhados durante o teste de toxicidade são apresentados por meio de gráficos. Esses gráficos servem para observar de maneira rápida de ocorreram variações acima ou abaixo das especificações para o teste de toxicidade crônica.

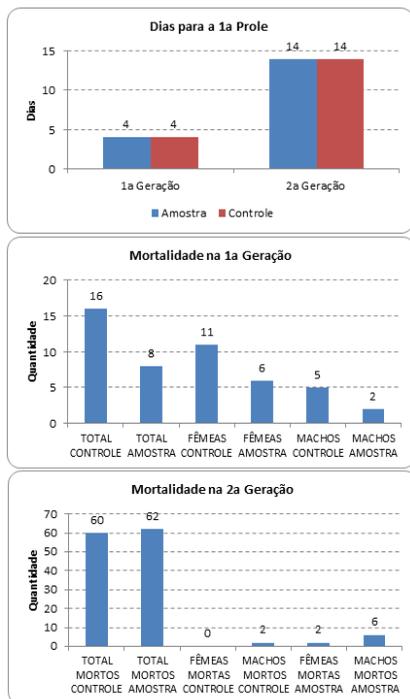


Figura 29: Tabulação gráfica dos dados relativos ao tempo para primeira prole, mortalidade na primeira e segunda geração, com distinção entre machos e fêmeas. Os gráficos são elaborados automaticamente pelo software MASCoTE.

Na Figura 29 estão os gráficos gerados pelo MASCoTE para interpretação dos dados relativos aos fatores dias para a primeira prole e mortalidade. Essa análise gráfica auxilia o pesquisador a visualizar de maneira facilitada os efeitos sobre essas características. Já na Figura 30, são demonstrados os valores de médias, desvios-padrão e a análise inferencial com ANOVA e teste Qui-Quadrado. Além dos valores tabulados, o MASCoTE faz menção em cada uma das análises inferenciais se ocorreram diferenças significativas entre a amostra e o

controle (sempre considerando um intervalo de confiança de 95%;  $\alpha=0,05$ )

ANÁLISE DOS RESULTADOS		
TAMANHO NA 1a GERAÇÃO (DADOS EM mm)		
	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO
AMOSTRA	8,03	0,31
CONTROLE	7,91	0,27
ANOVA DO TAMANHO NA 1a GERAÇÃO		
VALOR DE P	0,34	DIFERENÇAS NÃO SIGNIFICATIVAS
NATALIDADE		
	1a GERAÇÃO	2a GERAÇÃO
AMOSTRA	469	449
CONTROLE	484	637
ANOVA DA NATALIDADE		
VALOR DE P (1G)	0,91	DIFERENÇAS NÃO SIGNIFICATIVAS
VALOR DE P (2G)	0,52	DIFERENÇAS NÃO SIGNIFICATIVAS
ANOVA MORTALIDADE		
VALOR DE P (1G)	1,00	DIFERENÇAS NÃO SIGNIFICATIVAS
VALOR DE P (2G)	0,70	DIFERENÇAS NÃO SIGNIFICATIVAS
QUI-QUADRADO DIAS PARA 1a PROLE		
VALOR DE P	1,00	DIFERENÇAS NÃO SIGNIFICATIVAS

Figura 30: Tabulação dos dados relativos ao teste de toxicidade crônica, utilizando média, desvio-padrão e análise inferencial ANOVA e Qui-Quadrado para interpretação dos resultados do ensaio. Essa tabulação é realizada automaticamente pelo software MASCoTE.

Espera-se que com esse agrupamento de funções do software, os pesquisadores que desejarem efetuar um teste de toxicidade crônica necessitem dispor de menos tempo para o planejamento, organização e tabulação dos dados, possibilitando assim maior disponibilidade de tempo para a observação e acompanhamento do teste propriamente dito, além de minimizar a dificuldade com ferramentas estatísticas.



## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Este estudo apresentou como principal objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para testes de toxicidade crônica com o organismo marinho *Mysidopsis juniae*. Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que:

- O cultivo de *Mysidopsis juniae* em laboratório é viável a partir de adaptações das informações contidas em normas técnicas e na literatura. Dentre as condições de cultivos avaliadas neste estudo a partir do DOE, os valores de salinidade  $33\pm 1\%$  e temperatura da água de  $25\pm 1$  °C são os mais adequados para maximização da sobrevivência dos organismos.
- Os recipientes mais adequados para o cultivo e para os testes de toxicidade, considerando variações no volume de água e interferências na salinidade, avaliados por meio de DOE, são erlenmeyer de 1 litro e recipiente de vidro de 2 litros, na presença de tampa e de aeração. O uso de frascos de 2 litros se adaptou melhor para o cultivo e o erlenmeyer foi o mais indicado para os testes de toxicidade crônica.
- A sensibilidade do cultivo desenvolvido ficou com média de  $4,84$   $\text{mg.L}^{-1}$  e desvio-padrão de  $1,50$   $\text{mg.L}^{-1}$ , para a substância de referência dodecil sulfato de sódio (DSS).
- As variáveis relacionadas à natalidade, mortalidade e crescimento mostraram-se adequadas para a avaliação da toxicidade crônica de longa duração com *Mysidopsis juniae*, sendo que o uso da matriz QFD foi de fundamental importância para a seleção dessas características.
- O uso da FMEA possibilitou identificar as potenciais falhas para o uso do método proposto e auxiliou na definição de meios de controle para mitigar essas falhas.
- O método de medição dos organismos utilizando lupa com escala milimétrica na lente ocular apresentou alta reprodutibilidade e repetitividade, tornando-se adequado para mensurar o comprimento total dos misidáceos, após análise com o método Gage R&R.
- O estudo de caso para avaliar a toxicidade crônica com amostras de água da baía da Babitonga, demonstrou que todos os pontos no interior da baía oferecem toxicidade crônica quando comparados com o controle. O ponto de coleta exterior á baía, assemelha-se ao controle.

- As nanopartículas de óxido de cobre, testadas no segundo estudo de caso, oferecem toxicidade aguda na concentração de  $9,24 \text{ mg.L}^{-1}$  e toxicidade crônica em concentrações acima de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , para os misidáceos. As fêmeas sofreram efeitos mais intensos na mortalidade que os machos.
- O software desenvolvido em linguagem Visual Basic for Applications, intitulado MASCoTE, auxilia na gestão e tabulação dos dados de ensaios de toxicidade crônica com *M. juniae*, proporcionando maior agilidade e segurança na tabulação dos resultados.

Além disso, o método desenvolvido poderá contribuir para:

- Avaliar a toxicidade crônica de outras substâncias puras de interesse comercial, para verificar seu possível impacto no meio marinho.
- Investigar a toxicidade crônica próximo às áreas de exploração, processamento e transporte de petróleo, visando oferecer um monitoramento mais refinado das condições ambientais. Estes estudos são de grande relevância, já que está ocorrendo um aumento das atividades da indústria de petróleo causado pelo descobrimento da camada do pré-sal, sendo possivelmente de grande interesse da Petrobrás.
- Estabelecer avaliações dos efeitos de nanopartículas na cadeia trófica, considerando seu potencial de bioacumulação e biotransformação. Assim, a rede NANOTOX, que é uma rede que atua em estudos toxicológicos de nanomateriais, financiada pelo CNPq e coordenada pelo ENS/UFSC, poderá utilizar essa metodologia para seus estudos.
- Estudar a toxicidade crônica de misturas de compostos em condições controladas, para identificar os efeitos sinérgicos, aditivos e /ou antagônicos, com o intuito de prever os riscos da presença delas no ambiente marinho, como por exemplo, a presença de nanopartículas de óxido de cobre (presente nas tintas anti-incrustantes das plataformas petrolíferas, com compostos de petróleo como HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), oriundos do processamento do petróleo.

Algumas recomendações para pesquisas futuras baseadas neste estudo são:

- Investigar a possibilidade de realização do teste em períodos de tempo menores, mantendo a proposta de ensaio de longa duração,

porém verificando a redução do tempo adotado neste trabalho (2/3 do ciclo de vida do organismo), de forma a acelerar a obtenção de resultados para o monitoramento de ambientes marinhos.

- Avaliar a possibilidade de redução do número de organismos iniciais para o teste de toxicidade, com objetivo de redução dos custos com materiais e minimização da necessidade de mão-de-obra para acompanhamento do teste.
- Desenvolver aquários com capacidade de 1 litro, encamisados, possibilitando circular fluído térmico em seu interior, e dessa maneira garantir a temperatura da água dos testes com variações menores que 0,5 °C, independente da temperatura ambiente.
- Estudar a viabilidade de reciclo da água de cultivo, a partir da filtração em carvão ativado.
- Desenvolver um software para o teste de toxicidade crônica que possa ser hospedado em nuvem, visando criar um banco de dados com todos os usuários que utilizarem a tecnologia desenvolvida. Esse banco de dados poderá subsidiar a criação de uma base de informações consolidada para consulta em qualquer lugar do mundo, relativa a testes de toxicidade crônica com *M. juniae*.



## 6 REFERÊNCIAS

**Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.** W. Horwitz. Gaithersburg, MD, USA 2000.

ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M.; RACHID, B. R. F.; MASTROTI, R. R. Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a tool in marine sediments contamination assessment. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v.41, p.0-0, 1998.

ABNT. **NBR 15308. Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea).** Brazil: Associação Brasileira de Normas Técnicas 2011.

\_\_\_\_\_. **NBR 15350. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).** Brazil: Associação Brasileira de Normas Técnicas 2012.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. **Aquatic toxicology test methods.** In: D. J. Hoffmann, B. A. Rattner, *et al* (Ed.). Handbook of ecotoxicology. Florida: CRC Press, 2002. Aquatic toxicology test methods

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings.** Issue 1, v.59, p.2-20, 2007.

AMORIM, J. C. C.; ELFRINK, B.; CARVALHO, J. L. B. D.; CASAROLI, L. F. R. **Diagnóstico dos estudos de circulação de água no canal do linguado e na Baía da Babitonga.** In: M. J. Cremer, P. R. D. Morales, *et al* (Ed.). Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga. Joinville: Univille, 2006. Diagnóstico dos estudos de circulação de água no canal do linguado e na Baía da Babitonga, p.256

ASTM. **Standard guide for conducting life-cycle toxicity tests with saltwater mysids.** United States: ASTM International. E1191-03a: 17 p. 2008.

BAAS, I. **Six Sigma Statistics with Excel and Minitab:** McGraw-Hill. United States of America, 2007.

BADARÓ-PEDROSO, C. **Toxicidade crônica de amostras ambientais do Canal de São Sebastião, e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA: MYSIDACEA)**. (Dissertação). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993. 170 p.

BADARÓ-PEDROSO, C.; NIPPER, M. Effect of seawater samples from a pollution impacted area in Southeastern Brazil to *Mysidopsis juniae*. In: 14 the Annual Meeting (SETAC) - Ecological Risk Assessment: Lessons Learned?, 1993. **Anais**. Houston: SETAC, 1993.v.p.

BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. **Testes de toxicidade aguda com misidáceos - Ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* E *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea)**. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, *et al* (Ed.). Métodos em Ecotoxicologia Marinha - Aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas, 2002. Testes de toxicidade aguda com misidáceos - Ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* E *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea), p.262

BANU, S. K.; SAMUEL, J. B.; AROSH, J. A.; BURGHARDT, R. C.; ARULDHAS, M. M. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Issue 2, v.232, p.180-189, 2008.

BARROS GRACE, V.; MAS-PLA, J.; OLIVEIRA NOVAIS, T.; SACCHI, E.; ZUPPI, G. M. Hydrological mixing and geochemical processes characterization in an estuarine/mangrove system using environmental tracers in Babitonga Bay (Santa Catarina, Brazil). **Continental Shelf Research**. Issue 4-5, v.28, p.682-695, 2008.

BERG, C. M. G. V. D.; WONG, P. T. S.; CHAU, Y. K. Measurement of Complexing Materials Excreted from Algae and Their Ability to Ameliorate Copper Toxicity. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**. Issue 8, v.36, p.901-905, 1979.

BILLOIR, E.; PÉRY, A. R. R.; CHARLES, S. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of

*Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. **Ecological Modelling**. Issue 3-4, v.203, p.204-214, 2007.

BLAISE, C.; CAGNÉ, F.; EULLAFFROY, P.; FÉRARD, J.-F. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Québec, Canada): A review. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. Issue 2, v.10, p.29-51, 2006.

BLINOVA, I.; IVASK, A.; HEINLAAN, M.; MORTIMER, M.; KAHRU, A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environmental Pollution**. Issue 1, v.158, p.41-47, 2010.

BÖHM, R. F. S. **Teste de toxicidade crônica com *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979): avaliação de amostra ambiental da área de aquicultura do Capri - Baía da Babitonga/SC. Joinville, SC., Univille, Joinville, 2010.**

Ministério do Meio Ambiente do Brasil. **Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNCGII)**. 1997.

Ministério do Meio Ambiente. **LEI Nº 7.661, DE 16 DE MAIO DE 1988.**, 1998.

BROOKINS, D. G. **Eh-pH diagrams for geochemistry**: Springer-Verlag, New York, 1988.

BUFFET, P.-E.; TANKOUA, O. F.; PAN, J.-F.; BERHANU, D.; HERRENKNECHT, C.; POIRIER, L.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; BÉRARD, J.-B.; RISSO, C.; GUIBBOLINI, M.; ROMÉO, M.; REIP, P.; VALSAMI-JONES, E.; MOUNEYRAC, C. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. **Chemosphere**. Issue 1, v.84, p.166-174, 2011.

BURGESS, R. M.; TERLETSKAYA, A. V.; MILYUKIN, M. V.; POVOLOTSKII, M.; DEMCHENKO, V. Y.; BOGOSLAVSKAYA, T. A.; TOPKIN, Y. V.; VOROBYOVA, T. V.; PETROV, A. N.; LYASHENKO, A.; HO, K. T. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 8, v.58, p.1103-1115, 2009.

CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**. v.34, p.1021-1031, 2011.

CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; SANTOS, A. R.; ABESSA, D. M. D. S.; FERNÁNDEZ, N.; CHOUERI, R. B.; DELVALLS, T. A. Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system- Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v.54, p.55-63, 2006.

CETESB. **Água do mar teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* SILVA, 1979 (crustacea mysidacea)**. São Paulo: Companhia ambiental do estado de São Paulo 1992.

CHAKRAVORTY, S. S. Six Sigma programs: An implementation model. **International Journal of Production Economics**. Issue 1, v.119, p.1-16, 2009.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **Intoxicação e avaliação da toxicidade**. In: A. a. M. Chasin e F. A. Azevedo (Ed.). As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo: Rima, 2003. Intoxicação e avaliação da toxicidade, p.340

CHÈVRE, N.; BRAZZALE, A. R.; BECKER-VAN SLOOTEN, K.; BEHRA, R.; TARRADELLAS, J.; GUETTINGER, H. Modeling the concentration–response function of the herbicide dinoseb on *Daphnia magna* (survival time, reproduction) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (growth rate). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.62, p.17-25, 2005.

CIOFFI, N.; DITARANTO, N.; TORSI, L.; PICCA, R. A.; SABBATINI, L.; VALENTINI, A.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G.; BLEVE-ZACHEO, T.; ZAMBONIN, P. G. Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Issue 3, v.381, p.607-616, 2005.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. v.31, p.1820-1830, 2008.

CREMER, M. J.; MORALES, P. R. D.; OLIVEIRA, T. M. N. **Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga** UNIVILLE. JOINVILLE, 2006.

DAUVIN, J.-C.; ALIZIER, S.; VALLET, C.; RUELLET, T. Does the Port 2000 harbour construction have an effect on the Seine estuary suprabenthic community? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. Issue 1, v.86, p.42-50, 2010.

DÍAZ-ASENCIO, M.; ALONSO-HERNÁNDEZ, C. M.; BOLANOS-ÁLVAREZ, Y.; GÓMEZ-BATISTA, M.; PINTO, V.; MORABITO, R.; HERNÁNDEZ-ALBERNAS, J. I.; ERIKSSON, M.; SANCHEZ-CABEZA, J. A. One century sedimentary record of Hg and Pb pollution in the Sagua estuary (Cuba) derived from <sup>210</sup>Pb and <sup>137</sup>Cs chronology. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 4–7, v.59, p.108-115, 2009.

ERK, M.; MUYSSSEN, B. T. A.; GHEKIERE, A.; JANSSEN, C. R. Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.357, p.172-180, 2008.

ESSIEN, J. P.; ESSIEN, V.; OLAJIRE, A. A. Heavy metal burdens in patches of asphyxiated swamp areas within the Qua Iboe estuary mangrove ecosystem. **Environmental Research**. Issue 6, v.109, p.690-696, 2009.

FERNANDES, J. M. R.; REBELATO, M. G. Proposta de um método para integração entre QFD e FMEA. **Gestão & Produção**. v.13, p.245-259, 2006.

FILSER, J. Ecotoxicology and ecosystems: Relevance, restrictions, research needs. **Basic and Applied Ecology**. Issue 4, v.9, p.333-336, 2008.

FOCKEDEY, N.; GHEKIERE, A.; BRUWIERE, S.; JANSSEN, C.; VINCX, M. Effect of salinity and temperature on the intra-marsupial development of the brackish water mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Marine Biology**. Issue 6, v.148, p.1339-1356, 2006.

FOCKEDEY, N.; MEES, J.; VANGHELuwe, M.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. R.; VINCX, M. Temperature and salinity effects on post-marsupial growth of *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 1, v.326, p.27-47, 2005.

FREITAS, C. M. D.; PORTO, M. F. S.; MOREIRA, J. C.; PIVETTA, F.; MACHADO, J. M. H.; FREITAS, N. B. B. D.; ARCURI, A. S. Segurança química, saúde e ambiente: perspectivas para a governança no contexto brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**. v.18, p.249-256, 2002.

FRÍAS-ESPERICUETA, M. G.; VOLTOLINA, D.; OSUNA-LÓPEZ, I.; IZAGUIRRE-FIERRO, G. Toxicity of metal mixtures to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Marine Environmental Research**. Issue 5, v.68, p.223-226, 2009.

GAMA, A. M. D. S.; MONTÚ, M. A.; D'INCAO, F. Ciclo de mudas e taxas de crescimento de *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea, Mysidacea) cultivado em diferentes temperaturas e salinidades. **Iheringia. Série Zoologia**. v.96, p.67-70, 2006.

GAO, J.; YOUN, S.; HOVSEPYAN, A.; LLANEZA, V. N. L.; WANG, Y.; BITTON, G.; BONZONGO, J.-C. J. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. **Environmental Science & Technology**. Issue 9, v.43, p.3322-3328, 2009.

GARCÍA-BARCINA, J. M.; GONZÁLEZ-OREJA, J. A.; DE LA SOTA, A. Assessing the improvement of the Bilbao estuary water quality in response to pollution abatement measures. **Water Research**. Issue 5, v.40, p.951-960, 2006.

GARNACHO, E.; PECK, L. S.; TYLER, P. A. Effects of copper exposure on the metabolism of the mysid *Praunus flexuosus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.265, p.181-201, 2001.

GHEKIERE, A.; FENSKE, M.; VERSLYCKE, T.; TYLER, C.; JANSSEN, C. Development of a quantitative enzyme-linked

immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 1, v.142, p.43-49, 2005.

GHEKIERE, A.; FOCKEDEY, N.; VERSLYCKE, T.; VINCX, M.; JANSSEN, C. R. Marsupial development in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) to evaluate the effects of endocrine-disrupting chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.66, p.9-15, 2007.

GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; DE SMET, L.; VAN BEEUMEN, J.; JANSSEN, C. R. Purification and characterization of vitellin from the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 4, v.138, p.427-433, 2004.

GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; FOCKEDEY, N.; JANSSEN, C. R. Non-target effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.332, p.226-234, 2006a.

GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. **General and Comparative Endocrinology**. Issue 2, v.147, p.190-195, 2006b.

GOMES, L. F. A. M.; DUARTE JR, A. M. A avaliação de projetos com múltiplos critérios. **Produção**. v.2, p.5-19, 1992.

GOROKHOVA, E. Exploring and modeling the growth dynamics of *Mysis mixta*. **Ecological Modelling**. Issue 1, v.110, p.45-54, 1998.

GOROKHOVA, E. Moults cycle and its chronology in *Mysis mixta* and *Neomysis integer* (Crustacea, Mysidacea): implications for growth assessment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.278, p.179-194, 2002.

GREENBERG, A. E.; EATON, A. D.; CLESCERI, L. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: American Public Health Association. Washington, 1998.

GRIFFITT, R. J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.-C.; BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Issue 9, v.27, p.1972-1978, 2008.

HALPERN, B. S.; WALBRIDGE, S.; SELKOE, K. A.; KAPPEL, C. V.; MICHELI, F.; D'AGROSA, C.; BRUNO, J. F.; CASEY, K. S.; EBERT, C.; FOX, H. E.; FUJITA, R.; HEINEMANN, D.; LENIHAN, H. S.; MADIN, E. M. P.; PERRY, M. T.; SELIG, E. R.; SPALDING, M.; STENECK, R.; WATSON, R. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. **Science**. Issue 5865, v.319, p.948-952, 2008.

HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 1, v.135, p.25-38, 2003.

HEINLAAN, M.; KAHRU, A.; KASEMETS, K.; ARBEILLE, B.; PRENSIER, G.; DUBOURGUIER, H.-C. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. **Water Research**. Issue 1, v.45, p.179-190, 2011.

HELLING, B.; REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Effects of the Fungicide Copper Oxychloride on the Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.46, p.108-116, 2000.

HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S.; HERKOVITS, F. D. Evaluation of Nickel–Zinc Interactions by Means of Bioassays with Amphibian Embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 3, v.45, p.266-273, 2000.

HIRSCH, H. V. B.; POSSIDENTE, D.; POSSIDENTE, B. Pb<sup>2+</sup>: An endocrine disruptor in *Drosophila*? **Physiology & Behavior**. Issue 2, v.99, p.254-259, 2010.

HOFFMANN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR., G. A.; CAIRNS JR., J. **Handbook of Ecotoxicology**: Lewis Publications. Boca Raton, 2003.

IBAMA. **Proteção e controle de ecossistemas costeiros: manguezal da baía da Babitonga**. 1998.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2010**. 2010.

JACOBS, F. R.; CHASE, R. B. **Administração da produção e de operações: o essencial**: Artmed. Porto Alegre, 2009.

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. **General Principles of Toxicology**. In: P. L. Williams, R. C. James, *et al* (Ed.). Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications. United States of America: John Wiley & Sons, 2000. General Principles of Toxicology

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H.-C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**. Issue 2–3, v.269, p.105-119, 2010.

KARLSSON, H. L.; GUSTAFSSON, J.; CRONHOLM, P.; MÖLLER, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology Letters**. Issue 2, v.188, p.112-118, 2009.

KETATA, I.; SMAOUI-DAMAK, W.; GUERMAZI, F.; REBAL, T.; HAMZA-CHAFFAI, A. In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. Issue 3, v.146, p.415-430, 2007.

KHANGAROT, B. S.; DAS, S. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. **Journal of Hazardous Materials**. Issue 1-3, v.179, p.665-675, 2010.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Toxicologia: A ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**: McGraw-Hill de Portugal. Lisboa, 2001.

KNIE, J. L. **Atlas Ambiental da Região de Joinville: Complexo hídrico da baía da Babitonga**: Fatma/GTZ. Joinville, 2002.

KNIE, J. L.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**: FATMA/GTZ. Florianópolis, 2004.

KUMAR, V.; MAJUMDAR, C.; ROY, P. Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. Issue 3-5, v.111, p.208-216, 2008.

KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; BAO, V. W. W.; LEE, J.-S. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 6–12, v.57, p.632-636, 2008.

LARSON, A. **Desmystifying Six Sigma**: AMACOM. New York, 2003.

LEDUC, F.; WHALEN, J. K.; SUNAHARA, G. I. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to leachate from wood preservatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 2, v.69, p.219-226, 2008.

LEIDY, R. B. **Toxicant Analysis and Quality Assurance Principles**. In: E. Hodgson (Ed.). A textbook of modern toxicology. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2004. Toxicant Analysis and Quality Assurance Principles

LESUTIENĖ, J.; GOROKHOVA, E.; GASIŪNAITĖ, Z. R.; RAZINKOVAS, A. Role of mysid seasonal migrations in the organic matter transfer in the Curonian Lagoon, south-eastern Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. Issue 2, v.80, p.225-234, 2008.

LOPES, C.; PÉRY, A. R. R.; CHAUMOT, A.; CHARLES, S. Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modeling approach. **Ecological Modelling**. Issue 1, v.188, p.30-40, 2005.

LOPES, C. F.; MILANELLI, J. C. C.; PROSPERI, V. A.; ZANARDI, E.; TRUZZI, A. C. Coastal monitoring program of São Sebastião channel: Assessing the effects of 'Tebar V' oil spill on rocky shore

populations. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 11, v.34, p.923-927, 1997.

LORENZON, S.; FRANCESE, M.; FERRERO, E. A. Heavy Metal Toxicity and Differential Effects on the Hyperglycemic Stress Response in the Shrimp &Palaemon elegans&. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. Issue 2, v.39, p.167-176, 2000.

LOWE, C. N.; BUTT, K. R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. **European Journal of Soil Biology**. Issue 0, v.43, Supplement 1, p.S281-S288, 2007.

LUSSIER, S. M.; GENTILE, J. H.; WALKER, J. Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (crustacea:mysidacea). **Aquatic Toxicology**. Issue 1-2, v.7, p.25-35, 1985.

MARTINEZ, C. B. R.; SUIADICANI, S. O.; FERRONI, E. N.; MOREIRA, G. S. Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Issue 5, v.25, p.487-490, 1992.

MARTINS, P. G.; LAUGENI, F. P. **Administração da produção**: Editora Saraiva. São Paulo, 2006.

MAUCHLINE, J. The predation of mysids by fish of the Rockall Trough, northeastern Atlantic Ocean. **Hydrobiologia**. Issue 1, v.93, p.85-99, 1982.

MCDERMOTT, R. E.; MIKULAK, R. J.; BEAUREGARD, M. R. **The basics of FMEA**: CRC Press. New York, 2009.

MCKENNEY, C. L. The Influence of Insect Juvenile Hormone Agonists on Metamorphosis and Reproduction in Estuarine Crustaceans. **Integrative and Comparative Biology**. Issue 1, v.45, p.97-105, 2005.

MCKENNEY JR, C. L.; CELESTIAL, D. M. Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a

juvenile hormone analogue through a complete life cycle. **Aquatic Toxicology**. Issue 1, v.35, p.11-20, 1996.

MCLUSKY, D. S.; HAGERMAN, L. The toxicity of chromium, nickel and zinc: effects of salinity and temperature, and the osmoregulatory consequences in the mysid *Praunus flexuosus*. **Aquatic Toxicology**. Issue 4, v.10, p.225-238, 1987.

MEDESANI, D. A.; GRECO, L. S. L.; RODRÍGUEZ, E. M. Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Aquatic Toxicology**. Issue 2, v.69, p.165-174, 2004.

MEN, B.; HE, M.; TAN, L.; LIN, C.; QUAN, X. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Daliao River Estuary of Liaodong Bay, Bohai Sea (China). **Marine Pollution Bulletin**. Issue 6, v.58, p.818-826, 2009.

MENG, H.; CHEN, Z.; XING, G.; YUAN, H.; CHEN, C.; ZHAO, F.; ZHANG, C.; ZHAO, Y. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. **Toxicology Letters**. Issue 1-3, v.175, p.102-110, 2007.

MESS, J. **Mysidopsis juniae**. World Register of Marine Species 2012.

MONTAGNE, N.; DESDEVISES, Y.; SOYEZ, D.; TOULLEC, J.-Y. Molecular evolution of the crustacean hyperglycemic hormone family in ecdysozoans. **BMC Evolutionary Biology**. Issue 1, v.10, p.62, 2010.

MOURA, J. F. D.; CARDOZO, M.; BELO, M. S. D. S. P.; HACON, S.; SICILIANO, S. A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças, impactos socioeconômicos e relações benéficas. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.16, p.3469-3480, 2011.

NATIONAL WETLAND VALUES ASSESSMENT, W. **Proceedings of the National Wetland Values Assessment Workshop [microform] : May 23-26, 1983, Alexandria, Virginia / sponsoring agencies, Federal Highway Administration ... [et al.] ; cooperating agencies, Federal Energy Regulatory Commission ... [et al.] ; performed for Western Energy and Land Use Team, Division of Biological**

**Services, Research and Development, Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior: The Team.** Washington, DC :, 1984.

NICODEMO, S. C. T. E. S. **Diagnóstico ecotoxicológico dos efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiá/Potengi, Natal-RN.** (Dissertação). Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

NIETO, J. M.; SARMIENTO, A. M.; OLÍAS, M.; CANOVAS, C. R.; RIBA, I.; KALMAN, J.; DELVALLS, T. A. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. **Environment International.** Issue 4, v.33, p.445-455, 2007.

NIMMO, D. R.; HAMAKER, T. L. Mysids in toxicity testing — a review. **Hydrobiologia.** Issue 1, v.93, p.171-178, 1982.

NIPPER, M. G.; BADARÓ-PEDROSO, C.; JOSÉ, V. F.; MELO, S. L. R. Toxicity testing with coastal species of Southeastern Brazil. Mysids and copepods. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** Issue 1, v.51, p.99-106, 1993.

NOONAN, M. Mind maps: Enhancing midwifery education. **Nurse Education Today.** Issue 0, 2012.

NOPPE, H.; GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; WULF, E. D.; VERHEYDEN, K.; MONTEYNE, E.; POLFLIET, K.; CAETER, P. V.; JANSSEN, C. R.; DE BRABANDER, H. F. Distribution and ecotoxicity of chlorotriazines in the Scheldt Estuary (B-NI). **Environmental Pollution.** Issue 3, v.147, p.668-676, 2007.

ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia.**: Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2001.

Environment Directorate, Organisation of Economic Corporation and Development. **Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle toxicity tests with an emphasis on developmental, reproductive and endocrine disruptive effects.** 55, 2006.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.**: Atheneu. São Paulo, 2003.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GRISOLIA, C. K.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Trans-generation study of the effects of nonylphenol ethoxylate on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 2, v.72, p.458-465, 2009.

OLIVEIRA, M.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. J.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.70, p.20-26, 2008.

OLIVEIRA, T. M. N.; TURECK, C. R.; BASSFELD, J. C.; TORRENS, B. M. D. O.; FARIA, J. M.; BRASIL, K. **Integridade Ambiental da baía da Babitonga: Características físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicidade**. In: M. J. Cremer, P. R. D. Morales, *et al* (Ed.). Diagnóstico ambiental da baía da Babitonga. Joinville: Univille, 2006. Integridade Ambiental da baía da Babitonga: Características físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicidade, p.256

OLIVEIRA, T. M. N.; VAZ, C.; KLEINE, T.; BÖHM, R. F. S.; MATIAS, W. G. Effect of temperature and salinity in *Mysidopsis juniae* reproduction. **Toxicology Letters**. Issue 0, v.196, Supplement, p.S121, 2010.

OLIVEIRA, T. M. N. D.; VAZ, C.; KLEINE, T.; MATIAS, W. G.; BÖHM, R. F. S.; GONÇALVES, R. A.; TORTELLI, T. S.; BARROS, V. G. Influence of abiotic factors in the cultivation of *Mysidopsis juniae*. **Toxicology Letters**. Issue 0, v.205, Supplement, p.S133, 2011.

ORTEGA-SALAS, A. A.; NÚÑEZ-PASTÉN, A.; CAMACHO M, H. A. Fecundity of the crustacean *Mysidopsis californica* (Mysida, Mysidae) under semi-controlled conditions. **Revista de Biología Tropical**. v.56, p.535-539, 2008.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H. M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; STARK, L. M. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 9, v.58, p.1374-1381, 2009.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**. v.33, p.421-430, 2010.

PASSARELLI, M. M. **Toxicologia Ambiental**. In: S. Oga (Ed.). Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 2003. Toxicologia Ambiental, p.474

PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, M. L.; DE LA ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. **Journal of Hazardous Materials**. Issue 1, v.186, p.1-15, 2011.

PEREIRA, E. S.; MARTINELLI, A. R.; SPECK, M. **Relatório final do projeto de pesquisa de mercado interno para o APL metalmeccânico de Joinville**. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Joinville: Agosto de 2007, p.57, 2007.

PERIN, G. **Ecotoxicologia integrada quantitativa**: Editora Univille. Joinville, 2005.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G.; POPOVIC, R. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chemosphere**. Issue 11, v.87, p.1388-1394, 2012.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; PIRASTRU, L.; SIROIS, L.; GERSON MATIAS, W.; POPOVIC, R. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll a Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. **Journal of Botany**. v.2010, 2010.

PRÓSPERI, V. A. **Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas**. (Dissertação). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992. 120 p.

QUAYLE, D. B.; NEWKIRK, G. F.; WORLD AQUACULTURE, S.; INTERNATIONAL DEVELOPMENT RESEARCH, C. **Farming bivalve molluscs : methods for study and development**: World

Aquaculture Society in association with the International Development Research Centre. Baton Rouge, LA, 1989.

RAUSINA, G. A.; WONG, D. C. L.; RAYMOND ARNOLD, W.; MANCINI, E. R.; STEEN, A. E. Toxicity of methyl tert-butyl ether to marine organisms: ambient water quality criteria calculation. **Chemosphere**. Issue 5, v.47, p.525-534, 2002.

REGALLA JR., C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. v.6, p.153-163, 2002.

REGALLA JR., C.; NOLDIN, J.; TAMANAHA, M.; DESCHAMPS, F.; EBERHARDT, D.; RÖRIG, L. Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology**. Issue 8, v.16, p.565-571, 2007.

RHEE, J.-S.; RAISUDDIN, S.; HWANG, D.-S.; LEE, K.-W.; KIM, I.-C.; LEE, J.-S. Differential expression of metallothionein (MT) gene by trace metals and endocrine-disrupting chemicals in the hermaphroditic mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.72, p.206-212, 2009.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. The position maintenance behaviour of *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) in response to current velocity, substratum and salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 1, v.220, p.25-45, 1998.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**. Issue 3-4, v.47, p.227-241, 2000a.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. **Marine Environmental Research**. Issue 1-5, v.50, p.107-112, 2000b.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Behavioural responses of estuarine mysids to hypoxia and disruption by cadmium. **Marine Environmental Research**. Issue 3-5, v.54, p.319-323, 2002.

RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A.; FINGERMAN, M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 4, v.146, p.661-671, 2007.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**. Issue 7, v.46, p.1117-1140, 2002.

ROSA, R. O. **Geomorfologia: domínios morfoestruturais e unidades geomorfológicas**. In: J. L. Knie (Ed.). Atlas ambiental da região de Joinville: Complexo hídrico da baía da Babitonga. Joinville: FATMA/GTZ, 2002. Geomorfologia: domínios morfoestruturais e unidades geomorfológicas, p.144

ROZENFELD, H.; FORCELLINI, F. A.; AMARAL, D. C.; TOLEDO, J. C. D.; SILVA, S. L. D.; ALLIPRANDINI, D. H.; SALICE, R. K. **Gestão de desenvolvimento de produtos: uma referência para a melhoria do processo**: Editora Saraiva. São Paulo, 2006.

SAYES, C. M.; FORTNER, J. D.; GUO, W.; LYON, D.; BOYD, A. M.; AUSMAN, K. D.; TAO, Y. J.; SITHARAMAN, B.; WILSON, L. J.; HUGHES, J. B.; WEST, J. L.; COLVIN, V. L. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes. **Nano Letters**. Issue 10, v.4, p.1881-1887, 2004.

SLACK, N.; CHAMBERS, S.; JOHNSTON, R. **Administração da Produção**: Atlas. São Paulo, 2009.

SNIS. **Sistema nacional de informações sobre saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgotos**. Brasília, 2007.

SOUSA, E. C. P. M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, *et al* (Ed.). Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil, p.262

SOUZA, K. G. D.; MARTINS, L. R. S.; CAVALCANTI, V. M. M.; PEREIRA, C. V.; BORGES, L. Recursos minerais marinhos: fatos portadores de futuro, prioridades de estudo no Brasil e projetos estruturantes. **Parcerias estratégicas**. Issue 24, v.12, p.247-261, 2007.

STIMAMIGLIO, A. **Hidrografia**. In: J. L. Knie (Ed.). Atlas Ambiental da Região de Joinville: Complexo hídrico da baía da Babitonga. Joinville: Fatma/GTZ, 2002. Hidrografia, p.144

STUDER, A. M.; LIMBACH, L. K.; VAN DUC, L.; KRUMEICH, F.; ATHANASSIOU, E. K.; GERBER, L. C.; MOCH, H.; STARK, W. J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. **Toxicology Letters**. Issue 3, v.197, p.169-174, 2010.

SUBRAMONIAM, T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. Issue 2, v.125, p.135-156, 2000.

TAGHIZADEGAN, S. **Essentials of lean six sigma**: Elsevier Inc. Oxford, 2006.

TAKENO, N. **Atlas of Eh-pH diagrams Intercomparison of thermodynamic databases.**: Geological Survey of Japan, (419), 285. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Research Center for Deep Geological Environments. Tokyo, 2005.

THORPE, K. L.; BENSTEAD, R.; HUTCHINSON, T. H.; TYLER, C. R. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. **Aquatic Toxicology**. Issue 1, v.81, p.90-98, 2007.

TOMA, H. E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século.**: Editora Oficina de Textos. 2004.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**: Artmed Editora S/A. Porto Alegre, 2006.

TRUHAUT, R. Eco-toxicology - objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.1, p.151-173, 1977.

U.S. Environmental Protection Agency. **Draft detailed review paper on mysid life cycle toxicity test**. 2002a.

U.S. Environmental Protection Agency. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms**. 2002b.

UTGIKAR, V. P.; CHAUDHARY, N.; KOENIGER, A.; TABAK, H. H.; HAINES, J. R.; GOVIND, R. Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. **Water Research**. Issue 17, v.38, p.3651-3658, 2004.

VAN BRESSEM, M. F.; SANTOS, M. C. D. O.; OSHIMA, J. E. D. F. Skin diseases in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Paranaguá estuary, Brazil: A possible indicator of a compromised marine environment. **Marine Environmental Research**. Issue 2, v.67, p.63-68, 2009.

VERSLYCKE, T.; GHEKIERE, A.; JANSSEN, C. R. Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.306, p.245-267, 2004a.

VERSLYCKE, T.; GHEKIERE, A.; RAIMONDO, S.; JANSSEN, C. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. **Ecotoxicology**. Issue 1, v.16, p.205-219, 2007.

VERSLYCKE, T.; ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B.; JANSSEN, C. R. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 1, v.306, p.1-16, 2004b.

VERSLYCKE, T.; VANGHELUWE, M.; HEIJERICK, D.; DE SCHAMPHELAERE, K.; VAN SPRANG, P.; JANSSEN, C. R. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer*

(Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. **Aquatic Toxicology**. Issue 3, v.64, p.307-315, 2003.

VERSLYCKE, T. A.; FOCKEDEY, N.; MCKENNEY, C. L.; ROAST, S. D.; JONES, M. B.; MEES, J.; JANSSEN, C. R. Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: A review. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Issue 5, v.23, p.1219-1234, 2004c.

WALSH, S.; BALBUS, J. M.; DENISON, R.; FLORINI, K. Nanotechnology: getting it right the first time. **Journal of Cleaner Production**. Issue 8–9, v.16, p.1018-1020, 2008.

WEILHOEFER, C. L. A review of indicators of estuarine tidal wetland condition. **Ecological Indicators**. Issue 2, v.11, p.514-525, 2011.

WITTMANN, K. J. Comparative biology and morphology of marsupial development in *Leptomysis* and other mediterranean mysidacea (Crustacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2–3, v.52, p.243-270, 1981.

WOODWARD, R. T.; WUI, Y.-S. The economic value of wetland services: a meta-analysis. **Ecological Economics**. Issue 2, v.37, p.257-270, 2001.

WORTHAM-NEAL, J. L.; PRICE, W. W. Marsupial Developmental Stages in *Americamysis bahia* (Mysida: Mysidae). **J Crustacean Biol**. Issue 1, v.22, p.98-112, 2002.

YU, M.-H. **Environmental toxicology : biological and health effects of pollutants**: CRC Press. Boca Raton, 2005.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**. v.30, p.1469-1479, 2007.

# 7 APÊNDICES

## A1 MATRIZ QFD

Quês	Importância	Comos				
		1	2	3	4	5
Importância Absoluta						
Importância Relativa						
Dificuldade Técnica						

1 = mínimo  
5 = máximo

1 = fácil | 5 = difícil

**Comos versus Comos**  
 Escala de pontuação  
 Positivo ○  
 Negativo ●  
 Fortemente negativo ◊

**Quês versus Comos**  
 Relações fortes ● - 9  
 Relações médias ○ - 3  
 Relações fracas △ - 1



## A3 ETIQUETA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AQUÁRIOS

 
<b>BABTOX</b>
Data de nascimento:     /     /
Data de Limpeza:         /     /
Data de Descarte:        /     /
Nº Fêmeas:
Nº Machos:
Nº filhotes:
Mortos:
Responsável pela limpeza:
Documento Controlado RD 004/v1 Revisado em 10/10



A5 TERMÔMETRO DIGITAL UTILIZADO PARA O MONITORAMENTO DA TEMPERATURA AMBIENTE E DA ÁGUA DO CULTIVO E TESTES



## A6 DADOS OBTIDOS NO TESTE PARA AVALIAR VARIAÇÕES NA SALINIDADE E VOLUME DE ÁGUA

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Frasco	Aeração	Tampa	Varição da Salinidade (%)	Varição do Volume
6	1	1	1	2	1	2	4	0,885
5	2	1	1	2	1	1	4	0,905
4	3	1	1	1	2	2	2	0,953
9	4	1	1	3	1	1	10	0,743
10	5	1	1	3	1	2	26	0,394
7	6	1	1	2	2	1	0	0,998
12	7	1	1	3	2	2	5	0,886
11	8	1	1	3	2	1	2	0,943
8	9	1	1	2	2	2	1	0,990
1	10	1	1	1	1	1	2	0,915
3	11	1	1	1	2	1	1	0,995
2	12	1	1	1	1	2	4	0,735

A variação do volume está relacionada ao volume inicial adicionado no frasco.

Por exemplo: caso o valor seja 0,885, significa que foi mantido 88,5% do volume original, após 7 dias de teste.

A variação da salinidade está relacionado a quanto a salinidade variou em relação à salinidade inicial, em valor absoluto ‰ (partes por mil).

A7 DADOS OBTIDOS NO TESTE PARA AVALIAR AS CONDIÇÕES DE SALINIDADE E TEMPERATURA PARA CULTIVO E ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Salinidade (%)	Temperatura (°C)	Sobrevivência
1	1	1	1	28	17	9
3	2	1	1	28	28	4
7	3	1	1	35	17	0
5	4	1	1	32	25	43
4	5	1	1	32	17	23
8	6	1	1	35	25	26
9	7	1	1	35	28	0
2	8	1	1	28	25	5
6	9	1	1	32	28	23

A8 REFRA<sup>^</sup>OMETRO PARA O ACOMPANHAMENTO DA SALINIDADE DO CULTIVO E DOS TESTES DE TOXICIDADE CR<sup>^</sup>ONICA.



A9 DADOS PARA A ELABORAÇÃO DA CARTA-CONTROLE DA SENSIBILIDADE DOS MISIDÁCEOS

<b>CL50 (mg.L<sup>-1</sup> de DSS)</b>
4,48
5,36
4,23
5,51
4,75
6,94
4,16
6,02
3,346
2,205
6,908
6,131
6,496
5,705
6,45
2,91
2,69
2,53
4,6
5,334

A10 CONDICIONADORES DE AR INSTALADOS NO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DA UNIVILLE – PRINCIPAL E RESERVA



Condicionador de ar principal.



Condicionador de ar secundário.

## A11 SISTEMA DE AERAÇÃO SECUNDÁRIO, COM COMPRESSORES DE DIAFRAGMA



Sistema secundário de compressores de ar. O sistema principal é abastecido por um soprador centrífugo.

A12 SISTEMA DE AERAÇÃO E ILUMINAÇÃO DOS AQUÁRIOS  
INSTALADO NAS ESTANTES DO LABORATÓRIO DE  
TOXICOLOGIA AMBIENTAL DA UNIVILLE



## A13 DADOS OBTIDOS DURANTE A ANÁLISE DO SISTEMA DE MEDIÇÃO

Misidáceo	Operador	Medida	Tamanho (mm)	Misidáceo	Operador	Medida	Tamanho (mm)
1	1	1	3	1	2	1	2,5
1	1	2	2,6	1	2	2	2,6
1	1	3	2,6	1	2	3	3
2	1	1	2,3	2	2	1	2,1
2	1	2	2,1	2	2	2	2,1
2	1	3	2	2	2	3	2,2
3	1	1	2,1	3	2	1	2,4
3	1	2	2,5	3	2	2	2,5
3	1	3	2,4	3	2	3	2,5
4	1	1	2,5	4	2	1	3
4	1	2	2,4	4	2	2	2,5
4	1	3	2,5	4	2	3	2,5
5	1	1	2,5	5	2	1	3,1
5	1	2	3	5	2	2	2,9
5	1	3	2,9	5	2	3	2,6
6	1	1	8	6	2	1	7,7
6	1	2	7,6	6	2	2	7,9
6	1	3	7,9	6	2	3	8,4
7	1	1	7,1	7	2	1	7,1
7	1	2	7,3	7	2	2	7,2
7	1	3	7	7	2	3	7,4
8	1	1	9	8	2	1	8
8	1	2	8,9	8	2	2	9,3
8	1	3	9,3	8	2	3	9,2
9	1	1	8,3	9	2	1	7,2
9	1	2	7,3	9	2	2	7,8
9	1	3	7,8	9	2	3	8,3
10	1	1	6,8	10	2	1	7,4
10	1	2	7	10	2	2	7,2
10	1	3	7,2	10	2	3	7,8
11	1	1	8	11	2	1	8
11	1	2	7,8	11	2	2	8
11	1	3	7,9	11	2	3	7,9
12	1	1	7,8	12	2	1	7,1
12	1	2	7,9	12	2	2	7
12	1	3	7	12	2	3	8
13	1	1	7,7	13	2	1	7,1
13	1	2	7,1	13	2	2	7,3
13	1	3	7,3	13	2	3	7,8
14	1	1	8,3	14	2	1	7,4
14	1	2	7,4	14	2	2	7,3
14	1	3	7,3	14	2	3	8,2
15	1	1	9	15	2	1	8,6
15	1	2	8,6	15	2	2	8,6
15	1	3	8,9	15	2	3	9
16	1	1	6,2	16	2	1	5,8
16	1	2	5,8	16	2	2	5,7
16	1	3	5,5	16	2	3	6
17	1	1	8,3	17	2	1	7,5
17	1	2	7,7	17	2	2	8
17	1	3	8	17	2	3	8
18	1	1	4	18	2	1	4,2
18	1	2	4	18	2	2	4,1
18	1	3	4	18	2	3	4
19	1	1	5,2	19	2	1	5
19	1	2	5	19	2	2	4,9
19	1	3	4,8	19	2	3	5,3
20	1	1	6	20	2	1	5,9
20	1	2	6	20	2	2	6
20	1	3	6	20	2	3	6

## A14 TAMANHO DOS ORGANISMOS MEDIDOS\*

Amostra Cachoeira	Controle Cachoeira	Amostra Porto	Controle Porto	Amostra Capri	Controle Capri	Amostra Graças	Controle Graças
1,6	2,5	2,55	2,35	2,4	3,9	3,8	3,8
3,35	3,3	2,4	2	2,85	3,75	3,9	3,65
4	3,9	2,2	2,55	2,4	2,94	3,8	4
4,31	3,92	2,35	2,65	3,07	2,91	4,5	4,35
4,53	4,47	2,5	2,4	2,4	2,85	4,8	4,65
4,33	4,4	2,55	2,55	2,58	2,4	4,5	4,25
3,3	3,81	2,45	2,25	3,5	3	4,35	4,15
4,25	3,93	2,65	2,8	2,4	3,25	4,55	4
4,28	4,06	3	3	3,45	4	4,85	4,2
4,07	4,61	2,4	3	3,5	3,6	4,05	4
		2,6	3,2	3,2	3,4	4	3,95
		3,1	2,3	2,85	3,15	3,6	4,2
		3	3,4	4	5	4,2	4,05
		3,3	3,7	4,5	5	4,3	4
		3,5	3,1	5	5	4,45	4
		3,9	4,5	4	4		
		4,1	4,1	5	4,5		
		4	4,7	4,5	4,5		
		4,2	4,75				
		4,4	5				
		4,2	5,5				
		3,8	6,25				
		4	4,75				

\* Todos os dados são apresentados em mm (milímetros)

## A15 NATALIDADE DOS ORGANISMOS NA PRIMEIRA GERAÇÃO

Dias	Controle Cachoeira	Amostra Cachoeira	Controle Porto	Amostra Porto	Controle Graças	Amostra Graças	Controle Capri	Amostra Capri
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	31	1	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	4	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	31	43	200	107	0	0
24	0	0	20	0	0	0	40	17
25	0	3	0	0	0	0	0	0
26	0	1	0	0	0	0	0	0
27	0	4	46	60	135	112	0	0
30	0	4	0	0	0	0	0	0
31	0	5	0	0	0	0	0	0
32	0	5	0	0	130	136	0	0
33	0	0	55	85	0	0	0	0
34	0	0	1	0	0	0	26	24
35	0	4	0	0	0	12	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	60	81	0	0
39	5	13	0	0	0	0	0	0
40	2	0	0	0	0	0	0	0
41	0	14	33	0	30	41	0	0
42	1	3	1	0	0	0	0	0
43	7	5	20	0	0	0	0	0
44	0	17	0	0	0	0	0	0
46	2	11	0	0	49	0	0	0
48	11	23	0	0	0	0	0	0
49	9	5	70	0	0	0	0	0
50	5	0	13	0	40	28	0	15
51	7	0	13	0	0	0	0	0
52	0	8	140	140	0	0	0	0
53	5	9	0	0	11	46	0	0
54	1	11	0	0	0	0	16	10
55	3	20	0	0	0	0	0	0
56	20	21	23	166	0	0	0	0
57	4	16	53	0	0	0	0	0
58	3	1	158	0	41	27	0	0
59	0	0	197	164	0	15	0	0
60	0	3	0	0	0	0	0	0



## A17 SOBREVIVÊNCIA DOS ORGANISMOS

Dias	Vivos Controle Capri	Vivos Amostra Capri	Vivos Controle Cachoeira	Vivos Amostra Cachoeira	Vivos Controle Porto	Vivos Amostra Porto	Vivos Controle Graças	Vivos Amostra Graças
1	1	1	1	0,956	1	1	1,000	1,000
10	0,817	0,875	0,667	0,811	1	0,913	0,911	0,872
20	0,758	0,729	0,433	0,511	1	0,85	0,683	0,556
30	0,413	0,413	0,344	0,411	0,913	0,708	0,683	0,528
40	0,358	0,254	0,144	0,356	0,421	0,167	0,656	0,472
50	0,279	0,208	0,067	0,333	0,4	0,113	0,517	0,472
60	0,217	0,083	0,067	0,3	0,375	0,008	0,461	0,389

## A18 DADOS DE MORTALIDADE NO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA

<b>Concentração</b>	<b>Vivos</b>	<b>Mortos</b>
2	20	2
4	20	3
8	20	9
16	20	15
32	20	20

A19 NATALIDADE DOS ORGANISMOS EXPOSTOS AO CONTROLE E À AMOSTRA COM 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

<b>Idade</b>	<b>C ou A</b>	<b>Nascidos</b>
28	Amostra	32
30	Amostra	9
33	Amostra	4
36	Amostra	7
39	Amostra	13
42	Amostra	4
45	Amostra	0
48	Amostra	0
28	Controle	27
30	Controle	0
33	Controle	37
36	Controle	0
39	Controle	20
42	Controle	0
45	Controle	8
48	Controle	16

## A20 MORTALIDADE DOS ORGANISMOS DURANTE O TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

Idade	Tipo	Sexo	Mortes
23	Controle	Fêmea	0
28	Controle	Fêmea	0
30	Controle	Fêmea	1
33	Controle	Fêmea	0
36	Controle	Fêmea	0
39	Controle	Fêmea	5
42	Controle	Fêmea	0
45	Controle	Fêmea	0
48	Controle	Fêmea	0
51	Controle	Fêmea	0
54	Controle	Fêmea	13
23	NP-CuO	Fêmea	0
28	NP-CuO	Fêmea	0
30	NP-CuO	Fêmea	33
33	NP-CuO	Fêmea	0
36	NP-CuO	Fêmea	14
39	NP-CuO	Fêmea	0
42	NP-CuO	Fêmea	0
45	NP-CuO	Fêmea	0
48	NP-CuO	Fêmea	0
51	NP-CuO	Fêmea	0
54	NP-CuO	Fêmea	10
23	Controle	Macho	0
28	Controle	Macho	0
30	Controle	Macho	0
33	Controle	Macho	0
36	Controle	Macho	0
39	Controle	Macho	9
42	Controle	Macho	0
45	Controle	Macho	0
48	Controle	Macho	1
51	Controle	Macho	0
54	Controle	Macho	1
23	NP-CuO	Macho	0
28	NP-CuO	Macho	0
30	NP-CuO	Macho	2
33	NP-CuO	Macho	0
36	NP-CuO	Macho	4
39	NP-CuO	Macho	0
42	NP-CuO	Macho	0
45	NP-CuO	Macho	0
48	NP-CuO	Macho	1
51	NP-CuO	Macho	0
54	NP-CuO	Macho	2

A21 TAMANHO DOS MISIDÁCEOS MEDIDOS NO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

<b>Idade</b>	<b>Tipos</b>	<b>Medida (mm)</b>
30	Controle	3,9
30	Controle	4,2
30	Controle	3,9
39	Controle	3,7
39	Controle	4
39	Controle	4,35
48	Controle	4
48	Controle	3,9
48	Controle	4,05
54	Controle	4,2
54	Controle	4,15
54	Controle	4,25
54	Controle	4,05
54	Controle	4,3
54	Controle	4,2
30	Amostra	3,9
30	Amostra	3,95
30	Amostra	3,6
39	Amostra	3,75
39	Amostra	3,95
39	Amostra	3,85
48	Amostra	4,2
48	Amostra	3,9
48	Amostra	4,2
54	Amostra	4,25
54	Amostra	4
54	Amostra	3,95

## A22 CÓDIGO FONTE DO SOFTWARE MASCoTE

Sub FILTRA\_MEDIDAS\_1G()

' FILTRA\_MEDIDAS\_1G Macro

' Filtro avançado para as medidas dos organismos no controle e na amostra da 1a geração.

' Limpa o conteúdo das células onde o filtro avançado apresentará os resultados.

    Range("E8:J395").Select

    Selection.Delete Shift:=xIUUp

    Range("E8").Select

' Aplica o filtro avançado em cada uma das colunas de medidas (Medida 1, 2 e 3) no controle e na amostra.

    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("V1:V62").AdvancedFilter  
Action:= \_

        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("E5:E6"),

CopyToRange:=Range \_

    ("E8"), Unique:=False

    Range("F8").Select

    Sheets("Cronograma 1a  
Geração").Range("W1:W62").AdvancedFilter Action:= \_

        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("F5:F6"),

CopyToRange:=Range("F8"), \_

    Unique:=False

    Range("G8").Select

    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("X1:X62").AdvancedFilter  
Action:= \_

        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("G5:G6"),

CopyToRange:=Range("G8"), \_

    Unique:=False

    Range("H8").Select

    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("Y1:Y62").AdvancedFilter  
Action:= \_

        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("H5:H6"),

CopyToRange:=Range("H8"), \_

    Unique:=False

    Range("I8").Select

    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("Z1:Z62").AdvancedFilter  
Action:= \_

        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("I5:I6"),

CopyToRange:=Range("I8"), \_

```

    Unique:=False
    Range("J8").Select
    Sheets("Cronograma 1a
    Geração").Range("AA1:AA62").AdvancedFilter Action:= _
        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("J5:J6"),
    CopyToRange:=Range("J8"), _
        Unique:=False
End Sub
Sub MEDIDA_COLUNA_1G()
' MEDIDA_COLUNA_1G Macro
' Coloca as medidas do controle e amostra em colunas únicas e distintas
para a realização da ANOVA.
    Range("L5:M500").Select
    Selection.ClearContents
If Range("E9").Text <> vbNullString Then
    If Range("E10").Text <> vbNullString Then
        Range("E9").Select
        Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
        Selection.Copy
        Range("L5").Select
        Selection.Insert Shift:=xlDown
    Else
        Range("E9").Select
        Selection.Copy
        Range("L5").Select
        Selection.Insert Shift:=xlDown
    End If
End If
'Range("E9").Select
'Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
'Selection.Copy
'Range("L5").Select
'Selection.Insert Shift:=xlDown
If Range("F9").Text <> vbNullString Then
    If Range("F10").Text <> vbNullString Then
        Range("F9").Select
        Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
        Selection.Copy
        Range("L5").Select
        Selection.Insert Shift:=xlDown
    Else

```

```

Range("F9").Select
Selection.Copy
Range("L5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
'Range("F9").Select
'Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
'Application.CutCopyMode = False
'Selection.Copy
'Range("L5").Select
'Selection.Insert Shift:=xlDown
If Range("G9").Text <> vbNullString Then
If Range("G10").Text <> vbNullString Then
Range("G9").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("L5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("G9").Select
Selection.Copy
Range("L5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
'Range("G9").Select
'Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
'Application.CutCopyMode = False
'Selection.Copy
'Range("L5").Select
'Selection.Insert Shift:=xlDown
If Range("H9").Text <> vbNullString Then
If Range("H10").Text <> vbNullString Then
Range("H9").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("M5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("H9").Select

```

```

Selection.Copy
Range("M5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
'Range("H9").Select
'Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
'Application.CutCopyMode = False
'Selection.Copy
'Range("M5").Select
'Selection.Insert Shift:=xlDown
If Range("I9").Text <> vbNullString Then
If Range("I10").Text <> vbNullString Then
Range("I9").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("M5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("I9").Select
Selection.Copy
Range("M5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
'Range("I9").Select
'Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
'Application.CutCopyMode = False
'Selection.Copy
'Range("M5").Select
'Selection.Insert Shift:=xlDown
If Range("J9").Text <> vbNullString Then
If Range("J10").Text <> vbNullString Then
Range("J9").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("M5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("J9").Select
Selection.Copy

```

```

Range("M5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
'Range("J9").Select
'Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
'Application.CutCopyMode = False
'Selection.Copy
'Range("M5").Select
'Selection.Insert Shift:=xlDown
Application.CutCopyMode = False
Range("L4").Select
End Sub
Sub ANOVA_TAMANHO_1G()
' ANOVA_TAMANHO_1G Macro
' Calcula a análise de variâncias para o tamanho.
' intervalo_entrada,intervalo_saída,agrupado,rótulos,alfa (assim se
preenche os argumentos para ANOVA)
' Application.DisplayAlerts = False (essa instrução faz com que o
ANOVA não dê mensagens durante a execução)
Columns("O:U").Select
    Selection.ClearContents
    Range("O8").Select
    Application.Run "ATPVBAEN.XLAM!Anova1",
ActiveSheet.Range("$L$5:$M$1000"), ActiveSheet.Range("$O$5"),
"C", False, _
    0.05
' Application.DisplayAlerts = True (reativa os alertas)
End Sub
Sub FILTRA_NASCIDOS_1G()
' FILTRA_NASCIDOS_1G Macro
' Filtra os nascidos no controle e na amostra na primeira geração.
Range("W6:X395").Select
    Selection.ClearContents
    Range("W6").Select
    Sheets("Cronograma 1a
Geração").Range("AN1:AN62").AdvancedFilter Action:= _
        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("W3:W4"),
CopyToRange:=Range("W6"), _
        Unique:=False

```

```

Sheets("Cronograma 1a
Geração").Range("AO1:AO62").AdvancedFilter Action:= _
    xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("X3:X4"),
CopyToRange:=Range("X6"), _
    Unique:=False
End Sub
Sub ANOVA_NASCIDOS_1G()
' ANOVA_NASCIDOS_1G Macro
' Calcula a análise de variâncias para comparar os nascidos no controle e
na amostra na primeira geração.
' intervalo_entrada,intervalo_saída,agrupado,rótulos,alfa (argumentos da
rotina anova)
Columns("Z:AF").Select
    Selection.ClearContents
    Range("Z5").Select
    Application.Run "ATPVBAEN.XLAM!Anova1",
ActiveSheet.Range("$W$7:$X$1000"), ActiveSheet.Range("$Z$5"),
"C", False, _
    0.05
End Sub
Sub FILTRA_MORTALIDADE_1G()
' FILTRA_MORTALIDADE_1G Macro
' Macro para efetuar o filtro da mortalidade dos organismos na amostra e
controle na primeira geração.
    Range("AI6:AN168").Select
    Selection.ClearContents
    Range("AI6").Select
    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("P1:P62").AdvancedFilter
Action:= _
    xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("AI3:AI4"),
CopyToRange:=Range("AI6"), _
    Unique:=False
    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("Q1:Q62").AdvancedFilter
Action:= _
    xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("AJ3:AJ4"),
CopyToRange:=Range("AJ6"), _
    Unique:=False
    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("R1:R62").AdvancedFilter
Action:= _
    xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("AK3:AK4"),
CopyToRange:=Range("AK6"), _

```

```

    Unique:=False
    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("S1:S62").AdvancedFilter
Action:= _
    xIFilterCopy, CriteriaRange:=Range("AL3:AL4"),
CopyToRange:=Range("AL6"), _
    Unique:=False
    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("T1:T62").AdvancedFilter
Action:= _
    xIFilterCopy, CriteriaRange:=Range("AM3:AM4"),
CopyToRange:=Range("AM6"), _
    Unique:=False
    Sheets("Cronograma 1a Geração").Range("U1:U62").AdvancedFilter
Action:= _
    xIFilterCopy, CriteriaRange:=Range("AN3:AN4"),
CopyToRange:=Range("AN6"), _
    Unique:=False
End Sub
Sub COPIAR_MORTALIDADE_1G()
' COPIAR_MORTALIDADE_1G Macro
' Esta macro tem a função de copiar os dados relativos à mortalidade na
1a geração para uma tabela única.
' Essa informação é necessária para o cálculo da Análise de variâncias
(ANOVA)
' Apaga o conteúdo das células em uma área na planilha onde serão
atualizados os dados de mortalidade
    Range("AQ6:AR1044").Select
    Selection.ClearContents
    Range("AQ6").Select
' Checa inicialmente se os dados filtrados estão com valores ou apenas
vazios
' Se existirem valores, os mesmos serão inseridos na tabela para a
ANOVA
' Se estiverem zerados, não efetua nenhuma tarefa
' Mortalidade sem maturação sexual no controle 1g
If Range("AI7").Text <> vbNullString Then
    If Range("AI8").Text <> vbNullString Then
        Range("AI7").Select
        Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
        Selection.Copy
        Range("AQ6").Select
        Selection.Insert Shift:=xlDown
    
```

```

Else
Range("AI7").Select
Selection.Copy
Range("AQ6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
' Mortalidade sem maturação na amostra 1g
If Range("AJ7").Text <> vbNullString Then
If Range("AJ8").Text <> vbNullString Then
Range("AJ7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("AR6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("AJ7").Select
Selection.Copy
Range("AR6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
' Mortalidade de fêmeas no controle 1g
If Range("ak7").Text <> vbNullString Then
If Range("AK8").Text <> vbNullString Then
Range("AK7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("AQ6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("AK7").Select
Selection.Copy
Range("AQ6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
' Mortalidade de machos no controle 1g
If Range("AL7").Text <> vbNullString Then
If Range("AL8").Text <> vbNullString Then
Range("AL7").Select

```

```

Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("AQ6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("AL7").Select
Selection.Copy
Range("AQ6").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
'Mortalidade de fêmeas na amostra 1g
If Range("AM7").Text <> vbNullString Then
  If Range("AM8").Text <> vbNullString Then
    Range("AM7").Select
    Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
    Selection.Copy
    Range("AR6").Select
    Selection.Insert Shift:=xlDown
  Else
    Range("AM7").Select
    Selection.Copy
    Range("AR6").Select
    Selection.Insert Shift:=xlDown
  End If
End If
'Mortalidade de machos na amostra 1g
If Range("AN7").Text <> vbNullString Then
  If Range("AN8").Text <> vbNullString Then
    Range("AN7").Select
    Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
    Selection.Copy
    Range("AR6").Select
    Selection.Insert Shift:=xlDown
  Else
    Range("AN7").Select
    Selection.Copy
    Range("AR6").Select
    Selection.Insert Shift:=xlDown
  End If
End If

```

```

' Desliga o modo copiar e colar e seleciona a célula AQ6
Application.CutCopyMode = False
Range("AQ6").Select
End Sub
Sub ANOVA_MORTALIDADE_1G()
' ANOVA_MORTALIDADE_1G Macro
' Calcula a análise de variâncias para os organismos mortos.
' Limpa as colunas onde os dados serão calculados pela rotina ANOVA
Columns("AT:AZ").Select
    Selection.ClearContents
    Range("AQ6").Select
' Roda a rotina anova
Application.Run "ATPVBAEN.XLAM!Anova1",
ActiveSheet.Range("$AQ$6:$AR$1000"),
ActiveSheet.Range("$AT$6"), "C", False, _
    0.05
End Sub
Sub FILTRA_NASCIDOS_2G()
' FILTRA_NASCIDOS_2G Macro
' Filtra os organismos nascidos na 2a geração, na amostra e no controle.
    Range("BD6:BE395").Select
    Selection.ClearContents
    Range("BD6").Select
    Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("AF1:AG62").AdvancedFilter Action:= _
        xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BD3:BE4"),
CopyToRange:=Range("BD6"), _
    Unique:=False
End Sub
Sub ANOVA_NASCIDOS_2G()
' ANOVA_NASCIDOS_2G Macro
' Calcula a análise de variâncias para os organismos nascidos na 2a
geração.
    Columns("BG:BM").Select
    Selection.ClearContents
    Range("BG5").Select
    Application.Run "ATPVBAEN.XLAM!Anova1",
ActiveSheet.Range("$BD$7:$BE$1000"),
ActiveSheet.Range("$BG$5"), "C", False, _
    0.05
End Sub

```

```

Sub FILTRA_MORTALIDADE_2G()
' FILTRA_MORTALIDADE_2G Macro
' filtra os dados de mortalidade na 2a geração.
  Range("BP6:BU1247").Select
  Selection.ClearContents
  Range("BP6").Select
  Sheets("Cronograma 2a Geração").Range("N1:N62").AdvancedFilter
Action:= _
  xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BP3:BP4"),
CopyToRange:=Range("BP6"), _
  Unique:=False
  Range("BP6").Select
  Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("O1:O62").AdvancedFilter Action:= _
  xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BQ3:BQ4"),
CopyToRange:=Range("BQ6"), _
  Unique:=False
  Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("P1:P62").AdvancedFilter Action:= _
  xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BR3:BR4"),
CopyToRange:=Range("BR6"), _
  Unique:=False
  Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("Q1:Q62").AdvancedFilter Action:= _
  xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BS3:BS4"),
CopyToRange:=Range("BS6"), _
  Unique:=False
  Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("R1:R62").AdvancedFilter Action:= _
  xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BT3:BT4"),
CopyToRange:=Range("BT6"), _
  Unique:=False
  Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("S1:S62").AdvancedFilter Action:= _
  xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("BU3:BU4"),
CopyToRange:=Range("BU6"), _
  Unique:=False
End Sub
Sub COPIAR_MORTALIDADE_2G()
' COPIAR_MORTALIDADE_2G Macro

```

' Copia a quantidade de mortos para uma tabela única separando controle de amostra, com vistas ao cálculo ANOVA.

```

Range("BW5:BX922").Select
Selection.ClearContents
Range("BW5").Select
If Range("BP7").Text <> vbNullString Then
If Range("BP8").Text <> vbNullString Then
Range("BP7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("BX5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("BP7").Select
Selection.Copy
Range("BX5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
If Range("BQ7").Text <> vbNullString Then
If Range("BQ8").Text <> vbNullString Then
Range("BQ7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("BW5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("BQ7").Select
Selection.Copy
Range("BW5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
If Range("BR7").Text <> vbNullString Then
If Range("BR8").Text <> vbNullString Then
Range("BR7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("BX5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else

```

```

Range("BR7").Select
Selection.Copy
Range("BX5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
If Range("BS7").Text <> vbNullString Then
If Range("BS8").Text <> vbNullString Then
Range("BS7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("BX5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("BS7").Select
Selection.Copy
Range("BX5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
If Range("BT7").Text <> vbNullString Then
If Range("BT8").Text <> vbNullString Then
Range("BT7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("BW5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
Else
Range("BT7").Select
Selection.Copy
Range("BW5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
If Range("BU7").Text <> vbNullString Then
If Range("BU8").Text <> vbNullString Then
Range("BU7").Select
Range(Selection, Selection.End(xlDown)).Select
Selection.Copy
Range("BW5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown

```

```

Else
Range("BU7").Select
Selection.Copy
Range("BW5").Select
Selection.Insert Shift:=xlDown
End If
End If
Application.CutCopyMode = False
Range("BW5").Select
End Sub
Sub ANOVA_MORTOS_2G()
' ANOVA_MORTOS_2G Macro
' Calcula a análise de variâncias para a mortalidade na 2a Geração.
' Limpa as colunas onde serão feitos os cálculos da ANOVA
Columns("BZ:CG").Select
Selection.ClearContents
Range("BZ6").Select
' Roda a rotina ANOVA
Application.Run "ATPVBAEN.XLAM!Anova1",
ActiveSheet.Range("$BW$5:$BX$1000"),
ActiveSheet.Range("$BZ$6"), "C", False, _
0.05
End Sub
Sub FILTRA_POPULAÇÃO_TOTAL_2G()
' FILTRA_POPULAÇÃO_TOTAL_2G Macro
' Filtro para a população total na 2a Geração.
' Limpa a região onde o filtro trará os resultados
Range("CI7:CJ249").Select
Selection.ClearContents
Range("CI7").Select
' Aplicação do filtro avançado para os dados de população na 2a geração
Sheets("Cronograma 2a
Geração").Range("AD1:AE62").AdvancedFilter Action:= _
xlFilterCopy, CriteriaRange:=Range("CI4:CJ5"),
CopyToRange:=Range("CI7"), _
Unique:=False
' Esta rotina seleciona o último dado de população total na segunda
geração.
' Essa rotina é necessária porque a população da 2a geração aumenta ao
longo do tempo, já que a primeira geração não deixa de reproduzir.
Range("CI7").Select

```

```
Selection.End(xlDown).Select
Selection.Copy
Range("CL8").Select
ActiveSheet.Paste
Range("CJ7").Select
Selection.End(xlDown).Select
Application.CutCopyMode = False
Selection.Copy
Range("CM8").Select
ActiveSheet.Paste
Application.CutCopyMode = False
End Sub
Sub Roda_macros()
' Roda_macros Macro
' RODA TODAS AS MACROS
' Application.Run "Software teste crônico2_para
alterar.xlsm"!FILTRA_MEDIDAS_1G"
' ActiveWindow.LargeScroll ToRight:=1
' esconde as telas durante a execução das macros
Application.ScreenUpdating = False
' Desbloqueio das planilhas para cálculos
Sheets("Menu").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("Resultados").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("Cálculos").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("CAPA").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("Cronograma 1a Geração").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("Cronograma 2a Geração").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("Listas").Select
ActiveSheet.Unprotect Password:="oi"
Sheets("Cálculos").Select
Call FILTRA_MEDIDAS_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 5%"
```

```
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call MEDIDA_COLUNA_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 10%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call ANOVA_TAMANHO_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 15%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call FILTRA_NASCIDOS_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 20%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call ANOVA_NASCIDOS_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 30%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call FILTRA_MORTALIDADE_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 40%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call COPIAR_MORTALIDADE_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
```

```
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 50%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call ANOVA_MORTALIDADE_1G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 60%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call FILTRA_NASCIDOS_2G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 65%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call ANOVA_NASCIDOS_2G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 70%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call FILTRA_MORTALIDADE_2G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 75%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call COPIAR_MORTALIDADE_2G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 80%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call ANOVA_MORTOS_2G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
```

```

Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "CALCULANDO: 90%"
Application.ScreenUpdating = False
Sheets("Cálculos").Select
Call FILTRA_POPULAÇÃO_TOTAL_2G
Sheets("Resultados").Select
Range("R10").Select
Application.ScreenUpdating = True
ActiveCell.Value = "FIM: 100%"
Application.ScreenUpdating = False
' Bloqueia novamente as planilhas
Sheets("Menu").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
Sheets("Resultados").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
Sheets("Cálculos").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
Sheets("CAPA").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
Sheets("Cronograma 1a Geração").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
Sheets("Cronograma 2a Geração").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
Sheets("Listas").Select
ActiveSheet.Protect DrawingObjects:=True, Contents:=True,
Scenarios:=True, Password:="oi"
' Seleciona a planilha resultados
Sheets("Resultados").Select
Application.ScreenUpdating = True
End Sub
Sub auto_open()
' auto_open Macro
' Abre formulário automaticamente.
menu_inicial.Show
End Sub

```



## **8 ANEXOS**

### **A1 ACEITE DE ARTIGO PELA REVISTA FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN**

Article title: Assessment of chronic toxicity in water samples from the Babitonga Bay - South of Brazil - using transgenerational testing with *Mysidopsis juniae*

#### **Reference:SIFEB-119**

Authors: Cleiton Vaz, Tamila Kleine, Talini Sá Tortelli, Renata Falck Storch Böhm, Elaine Cristine Spitzner, Renata Amanda Gonçalves, Virgínia Grace Barros, Mariele Simm, Therezinha Maria Novais de Oliveira and William Gerson Matias

Corresponding author: Prof. Cleiton Vaz

Dear Prof. Vaz,

I am in the pleasant position to announce you that your article SIFEB-119 has been accepted for publication to the Special Issue of the Journal 'Fresenius Environmental Bulletin'.

Please notice that the publication of your article to the journal is to the responsibility of the editor of Fresenius Environmental Bulletin Journal, Professor Parlar.

Thank you very much for submitting your article and for your collaboration.

Best regards,

Dr. Vasilios Tsiridis

Guest Editor of the Special Issue of the Journal  
Fresenius Environmental Bulletin

A2 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA  
FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN

**Assessment of chronic toxicity in water samples from the  
Babitonga Bay - South of Brazil - using transgenerational  
testing with *Mysidopsis juniae***

**Cleiton Vaz<sup>a\*</sup>, Tamila Kleine<sup>b</sup>, Talini Sá Tortelli<sup>c</sup>, Renata Falck  
Storch Böhm<sup>d</sup>,  
Elaine Cristine Spitzner<sup>e</sup>, Renata Amanda Gonçalves<sup>f</sup>, Virgínia  
Grace Barros<sup>g</sup>, Mariele Simm<sup>h</sup>, Therezinha Maria Novais de  
Oliveira<sup>i</sup> and William Gerson Matias<sup>j</sup>**

<sup>a</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [cleitonvaz@yahoo.com](mailto:cleitonvaz@yahoo.com). Phone number: +55 47 8471-4294

<sup>b</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [tamila.kleine@gmail.com](mailto:tamila.kleine@gmail.com). Phone number: +55 47 8418-5476

<sup>c</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [stortelli@gmail.com](mailto:stortelli@gmail.com). Phone number: +55 47 3461-9106

<sup>d</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [renatastorch@hotmail.com](mailto:renatastorch@hotmail.com). Phone number: +55 47 9904-5488

<sup>e</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [elaine.spitzner@hotmail.com](mailto:elaine.spitzner@hotmail.com). Phone number: +55 47 3461-9106

<sup>f</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro,

P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [re.amanda@gmail.com](mailto:re.amanda@gmail.com). Phone number: +55 47 3461-9106

<sup>g</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [vgbarros@gmail.com](mailto:vgbarros@gmail.com). Phone number: +55 47 3461-9106

<sup>h</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [lelisimm@hotmail.com](mailto:lelisimm@hotmail.com). Phone number: +55 47 3461-9106

<sup>i</sup> Universidade da Região de Joinville – Univille – Laboratório de Toxicologia Ambiental. Campus Universitário - Bairro Bom Retiro, P.O. Box 246, CEP 89201-972 Joinville/SC - Brazil. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação – PRPPG. e-mail: [therenovais@hotmail.com](mailto:therenovais@hotmail.com). Phone number: +55 47 3461-9017

<sup>j</sup> Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC – Campus Universitário – Trindade, CEP 88040-900 Florianópolis/SC - Brazil. LABTOX – Laboratório de Toxicologia Ambiental. e-mail: [will@ens.ufsc.br](mailto:will@ens.ufsc.br). Phone number: +55 48 3721-7742

\*Corresponding author: e-mail: [cleitonvaz@yahoo.com](mailto:cleitonvaz@yahoo.com), Tel +55 47 3461-9106

### **Abstract**

The toxicity resulting from diffuse sources of pollution was assessed using a chronic toxicity test based on the reproduction, body size and survival of *Mysidopsis juniae* in Babitonga Bay, an estuarine complex that hosts one of the largest areas of mangroves in the southern hemisphere and that receives effluent from six adjacent municipalities, altering the chemical composition of water and interfering with the balance of the ecosystem. Water samples were collected at three points in the Bay: P1: Foz do Rio Cachoeira, an interior point; P2: Port of São Francisco do Sul, in the central Bay and P3: Capri Beach, near the Bay's connection with the Atlantic Ocean. These samples were used for toxicity testing and compared to the metals Cd, Pb, Cu, Cr, Ni and Zn mean concentrations. The results indicated that the water samples caused chronic effects in *Mysidopsis juniae* when compared to control water. Statistical analysis revealed significant differences in the size of organisms, number of neonates, total population and time to first brood

release. The birth rate can be considered the main factor analyzed because it is directly related to the reproduction of the species. Moreover, the study shows that the metals Cd, Pb, Cr and Zn are strongly correlated with birth rate, suggesting they are primarily responsible for chronic toxicity. However, it is necessary to consider the possibility of additive, synergistic and / or antagonistic effects between various metals or other substances that were not analyzed but were present in the samples.

Keywords: chronic toxicity, trace metals, transgenerational effects, *Mysidopsis juniae*, Babitonga Bay

## 1. INTRODUCTION

Joinville is located in northeastern Santa Catarina State (the state with the seventh largest GDP, comprising 3.9% of the national total for Brazil) in southern Brazil and includes 515,000 inhabitants and is the largest GDP in the state, contributing to 10.7% of the state total (IBGE, 2010). In the region of Joinville, the metallurgic and metal mechanical industries are the most important economic activities, comprising approximately 500 companies - 22% of the companies in this sector in Brazil (PEREIRA *et al.*, 2007). Associated with this economic growth, there is an increased degradation of coastal ecosystems in the region. The study area includes the Babitonga Bay (BB), an estuarine complex which contains one of the largest mangroves in the southern hemisphere.

Mangroves are sparsely distributed around the world (HALPERN *et al.*, 2008) and are directly affected by fishing, climate changes and pollution. By definition, they are ecotone areas between the terrestrial and coastal ecosystems found between latitudes 32° N and 38° S and play important roles for both systems (WEILHOEFER, 2011). In addition to mangroves, estuaries are recognized as providing numerous ecosystem services, including biomass production, the improvement of water quality, erosion control, sediment retention, flood control, recreation and habitat for fish, shellfish, birds and other wildlife (NATIONAL WETLAND VALUES ASSESSMENT, 1984; WOODWARD e WUI, 2001).

The estuarine complex of Babitonga Bay is located in northeastern Santa Catarina State, 9.69% of which is serviced by a sewage disposal system(SNIS, 2007). Around the Bay, the cities of Joinville, Garuva,

São Francisco do Sul, Itapoá, Balneário Barra do Sul e Araquari together represent more than 600,000 inhabitants (IBGE, 2010).

Within the large drainage basin of the BB, areas of agriculture, mariculture, industries, ports and marinas coexist as a unique natural area of Atlantic forest. Inputs into the Bay from all of these land uses can influence the equilibrium of the aquatic ecosystem of the BB, as the interactions between the various compounds present in water present toxicological risks to living organisms.

Therefore, analyzing the chronic toxic effects of different compounds present in the environment is important for evaluating the environmental health of the ecosystem. Chronic toxicity studies can be used to assess deleterious effects on living organisms to identify the impacts of contaminants (ADAMS e ROWLAND, 2002). For the development of these studies, mysid species are commonly used as standards for the evaluation of the toxicity of marine and estuarine environments (GHEKIERE *et al.*, 2006a; NIMMO e HAMAKER, 1982). In this context, the marine organism *Mysidopsis juniae*, a species adapted to tropical waters, is considered an alternative model for analyzing toxicity in coastal and oceanic regions of Brazil (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002), as most of the other commonly used organisms are only suitable for testing of temperate waters.

This study aimed to assess the general chronic toxicity of different locations within the estuarine complex of Babitonga Bay (BB) and to try to identify a correlation between toxicity and trace metals contained in the samples.

## **2. BIOLOGY, DISTRIBUTION AND REPRODUCTIVE CYCLE OF MYSIDS**

Mysids (*Crustacea: Mysidacea*) are small shrimp-like crustaceans characterized by the presence of a specific marsupium in which they store and carry young embryos (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002; MAUCLINE, 1982).

Mysids have suitable characteristics for use in toxicity testing, such as a short life cycle, sensitivity to a wide variety of toxicants, and ease of handling and cultivation in the laboratory (NIMMO e HAMAKER, 1982). Mysids belong to the superorder Pericarida, and approximately 1188 Mysidacea species (MESS, 2012) have been described. These organisms represent most of the diet of certain fishes. They are omnivores (ORTEGA-SALAS *et al.*, 2008) and mostly consume small particles that adhere to their body surfaces, although they can also

capture planktonic organisms. The geographical distribution of mysid species is not well known, but it is known that mysids are found in the three major oceans and at all latitudes, covering a wide range of temperature conditions (MAUCHLINE, 1982).

Reproduction is sexual and the reproductive stages are egg-laying and fertilization followed by marsupial and post-marsupial development. Eggs are transported through the oviduct to the marsupium after fertilization. During marsupial development, there are three primary stages: embryonic, larval, and post-larval. After marsupial development, the organisms reach the juvenile stage, when they are released from the marsupium (WITTMANN, 1981).

### 3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.1 Study area

The estuarine complex of BB covers an area of 1,400 km<sup>2</sup>, including the southern hemisphere's last remaining large mangrove ecosystem. BB is connected to the Atlantic Ocean via an 1,850 m opening and exhibits a salt-wedge circulation system. A significant tidal oscillation drives water renewal in this ecosystem, with a residence time to replacement of 99% of the water of approximately 237 days (AMORIM *et al.*, 2006). The region is characterized by a humid subtropical climate with an average rainfall of 2,000 mm.year<sup>-1</sup>. It exhibits two differentiated seasons: summer (from November to April) and winter (from May to October). During summer, weather is characterized by high temperature and humidity with intense precipitation. During winter, the influence of polar air masses leads to declines in temperature and precipitation in the region (BARROS GRACE *et al.*, 2008). To assess the impacts of human activities in the estuarine complex, three sampling points (Figure 1) were selected to develop the study and to identify the chronic toxicity of and presence of trace metals in water samples from different areas of BB.

#### 3.2 Sampling sites

The first sampling point is located at the mouth of the Cachoeira River (P1) in an area within the estuary where the tidal influence causes variations in salinity (17-22 ppt) (OLIVEIRA *et al.*, 2006). This site receives approximately 90% of the untreated domestic sewage of the city of Joinville, which has a 16.5% rate of collection and treatment of

sewage, as well as effluents from multiple industries (OLIVEIRA *et al.*, 2006), primarily from the metal mechanical industries. In this location, there is also a marina (area 88,540 m<sup>2</sup>) containing a maintenance area and a fuel dock. Thus, P1 can be considered to have a high potential pollution load.

The second point selected for the study is located near the port of São Francisco do Sul (P2). At this site, various sources of pollution, such as the dredging of sediments, navigation, ballast water from ships, oil spills and contact with antifouling paints as well as untreated domestic sewage are present.

Sampling point P3 is located on Capri Beach, an area of bivalve culture. As at P1, there is a marina in the region (area 3000 m<sup>2</sup>) and untreated domestic sewage is released in the area. The site has no significant industrial activity and the vegetation has been preserved. The gradient of salinity at this point is weak (30-32 ppt), undergoing little tidal influence due to the proximity to the ocean (BÖHM, 2010).

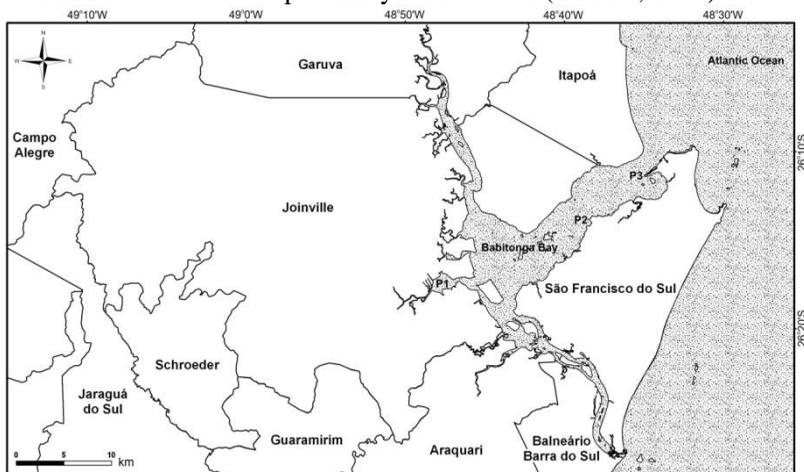


Figure 1: Water sampling sites in BB. P1 = mouth of the Cachoeira River. P2 = region of the port of São Francisco do Sul. P3 = Capri, near the boundary of BB and the Atlantic Ocean.

### 3.3 Water sampling

Water samples were collected at depths ranging from 0.5 to 1 m in clean 5 L polyethylene bottles. The samples were immediately frozen to maintain the initial characteristics of the sampled water. All samples were collected for 5 consecutive days at P1, P2 and P3 according to

fixed schedules (P1: 08:00; P2: 14:00 and P3: 14:00) to obtain water at different tidal conditions with different contributions of fresh water from the drainage basin. Subsequently, a composite sample was prepared for each point for use in the chronic toxicity tests.

### 3.4 Preparation of water samples for toxicity tests

After sampling, all of the water samples from each point were defrosted and combined to obtain one homogeneous composite sample for that particular point. The total amount sampled from each point was mixed in a clean reservoir with a total capacity of 1,000 L. After this procedure, the salinity was measured and adjusted based on the contribution of fresh water. To adjust the salinity, commercial Red Sea Salt (the same salt used for the reconstitution of the cultivation water) was added until the salinity reached  $33 \pm 1$  ppt in accordance with the culture standard for mysids in the laboratory (OLIVEIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). The adjustment of salinity must be performed when samples are above or below the expected seawater value (BADARÓ-PEDROSO *et al.*, 2002).

### 3.5 Cultivation of test organisms

The organisms used for the toxicity test were cultured in the Environmental Toxicology Laboratory at the University of Joinville Region - Univille in cooperation with the LABTOX—Laboratory of Environmental Toxicology at the Federal University of Santa Catarina—UFSC in accordance with the recommendations of the NBR 15308 (ABNT, 2011) standard.

The cultivation conditions were  $33 \pm 1$  ppt salinity, water temperature  $24 \pm 1$  °C and a photoperiod of 12/12 h (dark/light) with gentle and constant aeration. The mysids were fed with *Artemia sp.* The *Artemia* were hatched over 24 hours and thereafter enriched with codfish liver oil and fish oil (omega 3) for 24 hours before being supplied to the mysids.

To prepare water for mysid cultivation, deionized water was used, reconstituted with Red Sea Salt. The water of the culture was fully replaced once per week. This reconstituted water was used to hatch the *Artemia* and also to raise the control mysids for the test.

### 3.6 Chronic toxicity tests

A total of 180 mysids between 1 and 8 days old were used for each chronic toxicity test. Of these organisms, 90 were used as a control and 90 were used to evaluate the exposure to the composite water samples according to the schematic in Figure 2. The water tanks were completely renewed each week for both the control (reconstituted water) and the sample.

When the organisms were old enough to exhibit sexual dimorphism, a population having a 1:4 ratio of males to females was established in each study aquarium.

The parameters measured in each chronic toxicity study were the survival of the first generation, growth and reproduction. For reproduction, the number of neonates was quantified and the days to the first brood release in the first and second generations was established. The testing was halted after the 50th day, a test period that accounts for more than two thirds of the life cycle of this organism.

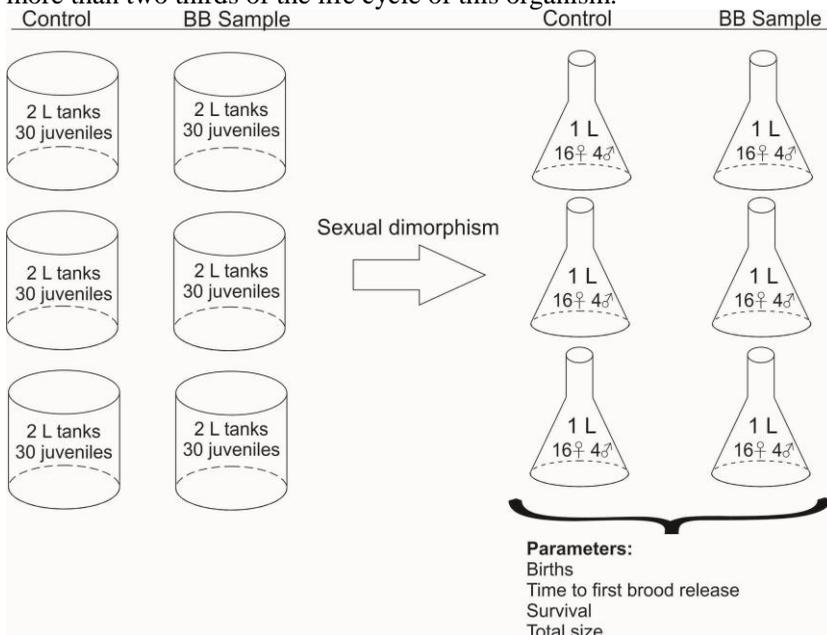


Figure 2: Schematic diagram of the chronic toxicity test, considering the initial test conditions and the populations established following the development of sexual dimorphism.

Total daily births and deaths were monitored, and the date of the birth of first release was also recorded in each treatment. Every ten days, the total population was counted. Two individuals were randomly chosen from each of the tanks to obtain measurements of body length in a stereoscopic microscope with a micrometer scale adapted to the ocular lens.

To ensure the sensitivity of the test organisms, sensitivity assays were performed weekly with the reference substance sodium dodecyl sulfate and a control chart was maintained to monitor the sensitivity of the organisms. To begin testing, the juveniles were required to have levels of sensitivity according to the recommendations of the technical standard NBR 15308 (ABNT, 2011).

### 3.7 Physico-chemical and chemical analysis of water samples

Analyses of dissolved oxygen, temperature, salinity, pH and Eh (redox potential) were performed following the recommendations of the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (GREENBERG *et al.*, 1998). The mean value of metals concentrations were used from Babitonga Bay Environmental Diagnostics (OLIVEIRA *et al.*, 2006) and the analyses were performed in the laboratory of Water, Wastewater and Atomic Absorption Spectrometry (CEPPA), Federal University of Paraná (UFPR), and performed as presented in the Official Methods of Analysis of AOAC International (2000). In each sample, 5 mL of nitric acid was added to 100 mL of water. Then, a reading was performed in a Varian Atomic Absorption Spectrometer, model SpectrAA 100-200. For analysis, 100 mL of the sample was measured and 0.5 mL of nitric acid and 5 mL of 1:1 hydrochloric acid were added. The remaining solution was evaporated to approximately 15 mL. Next, 15 mL of deionized water was added and the solution was adjusted to a pH of 4 to 5 with 5 N sodium hydroxide or 1:1 hydrochloric acid. The solution was then placed in a 100 mL volumetric flask and deionized water was added to reach 100 mL. For the analysis of lead, diphenylthiocarbazone reagent (dithizone) was used, whereas for cadmium, dithizone was added. The pH was adjusted KCN was used as a masking agent. For the analysis of nickel, dimethylglyoxime reagent was used to cover sodium diethyldithiocarbamate. To analyze chromium, 1,5-diphenylcarbazide was used; a specific Hach kit was used to analyze zinc.

### 3.8 Data analysis

The chronic toxicity results were examined to identify differences between the exposed and control groups and to compare the intensity of the effect with respect to the quantified amounts of trace metals in the water samples. For this analysis, calculation of correlations, graphs of interactions, parametric Student's t tests and non-parametric chi-squared tests were used. Differences were considered significant at  $\alpha < 0.05$ .

## 4. RESULTS

### 4.1 Physico-chemical analysis

The dissolved oxygen, temperature, salinity, pH and Eh (redox potential) of the water in the control and treatment samples of the mysid study ranged from 4.3–6.3 mg.L<sup>-1</sup> (>60% of saturation), 23–26 °C, 32–35 ppt, 8.1–8.3 and 0.2–0.4 V, respectively.

### 4.2 Metals analysis

The mean value of trace metals were collected from the Babitonga Bay Environmental Diagnostic (OLIVEIRA *et al.*, 2006). The samples were analysed by atomic absorption. The results are presented in Table 2.

Table 2: Results of the analysis of metal concentrations in the water samples collected at studied sites, in  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Sampling site	Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Cr ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Ni ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
P1	16.5	322.0	132.5	32.5	60.0	2.5
P2	3.0	63.0	80.0	17.5	67.5	20.0
P3	1.0	99.0	185.0	22.5	30.0	12.5

Results obtained from Babitonga Bay Environmental Diagnostic (OLIVEIRA *et al.*, 2006)

Considering the pH of samples of between 8.1 and 8.3 and the redox potential of between 0.2 and 0.4 V and using the Eh x pH diagrams (BROOKINS, 1988; TAKENO, 2005) to verify the metal speciation, it can be established that the measured elements were primarily present in the water in the forms of Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>.

### 4.3 Parameters of the chronic toxicity test

The survival rate at 96 hours in the first generation was  $\geq 95\%$  in both the control and exposed mysids. Statistically significant differences were observed in growth parameters, reproduction, the time to first brood release and survival when comparing the exposed and control group samples. The results for these parameters are shown in Table 3.

Table 3: Comparison between exposed and control samples, considering the studied variables in chronic toxicity tests: reproduction, size and survival.

Characteristic	Sample P1	Control P1	Sample P2	Control P2	Sample P3	Control P3
First brood release in first generation (days)	<sup>(1)</sup> 17	<sup>(1)</sup> 34	18	27	23	28
First brood release in second generation (days)	<sup>(1)</sup> 57	<sup>(1)</sup> 36	16	23	24	21
Body size (mean and standard deviation (mm))	3.802 ± 0.8764	3.89 ± 0.6176	* 3.180 ± 0.7423	* 3.513 ± 1.193	* 3.422 ± 0.8977	* 3.731 ± 0.8140
Births in first generation (juveniles)	*142.35% higher than control	*100%	24.71% lower than control	100%	19.51% lower than control	100%
Births in second generation (juveniles)	21.43% higher than control	100%	*45.24% lower than control	* 100%	100% (equal to control)	100%
Total population (survival) after 50 days of testing	* 30%	* 34.4%	* 11.3%	* 40%	** 20.8%	** 27.9%

<sup>(1)</sup> characteristics that showed significant differences between sample and control at a 95% confidence interval using a chi-squared test.

\* characteristics that showed significant differences between sample and control at a 95% confidence interval using Student's t test.

\*\* characteristics that showed a significant difference between sample and control only after 40 days of testing.

### 4.4 Time to first brood release

Points P2 and P3 exhibited no significant differences for this parameter when compared with controls using the chi-squared test with a confidence interval of 95% ( $p > 0.05$ ).

For the sample from point P1, the time to the first brood release for both the first and second generations was significantly different from the control. In the first generation of the P1 sample population, the first brood release was early, 17 days after the beginning of the test. In the

second generation, the first brood release occurred 57 days after the birth of the second generation (a 3.35-fold difference), with a substantial delay in time to the first brood. Using the chi-squared test, P1 showed significant differences between the exposed and control samples ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5 Body size

In the P1 exposed group, the total length of mysids was similar to that found in the control group (Table 3). Statistical analysis using the Student t-test showed no significant differences between the control and sample ( $p > 0.05$ ).

In the exposed groups for samples P2 and P3, the total length was lower than the corresponding values for the control (control measurements were 10.5% and 9.3% higher than samples, respectively). The Student t-test showed that the sizes of the mysids in the exposed group and in the control group differed significantly ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6 Births

For evaluation of this characteristic, we converted the number of births to a percentage, considering the number of births in the control group to be 100% and calculating the relative value of the sample group (higher or lower than the control). The inferential statistical analysis was performed using the Student t-test.

The number of juveniles in the first generation showed no significant differences between control and exposed mysids for points P2 and P3. However, the exposed group for sample point P1 showed a much higher number of neonates than in the control (142.35% increase). In this case, there was a significant difference between the control and sample groups.

The second generation of juveniles showed no significant differences between the control and exposed groups for points P1 or P3. For point P2, the difference was significant, with the number of births 45.24% lower than in the control.

One notable aspect of this parameter is that in the first generation, the number of juveniles was much higher in the exposed than the control group, which would therefore be expected to exert a pronounced effect on the second generation by supplying an increased number of potential parents. However, the number of births in the second generation was very similar in the exposed sample and the control.

#### 4.7 Survival

Survival exhibited significant differences between the control and exposed groups for all sampling points (Student t-test,  $p < 0.05$ ), with the exception that at point P3, the difference was significant only after 40 days of testing.

#### 4.8 Relationships between trace metal concentrations and the toxicity parameters

To evaluate the relationship between the concentrations of the metals found in the water samples used to test toxicity, and the observed toxicity, correlation coefficients were calculated between the toxicity parameters and the metal concentrations. The values of these correlation coefficients are presented in Table 4.

Table 4: Values of the calculated correlation coefficients between the concentrations of metals and the evaluated parameters of survival, births, body size and days to first brood release.

Metal	Survival	Births	Size	1st Brood release in 1st Generation	1st Brood release in 2nd Generation
Cd	0.795	0.982	0.870	-0.716	0.954
Pb	0.919	0.998	0.964	-0.524	0.998
Cu	0.508	0.069	0.386	0.778	0.184
Cr3	0.980	0.965	0.998	-0.339	0.989
Ni	-0.198	0.261	-0.063	-0.941	0.148
Zn	-0.996	-0.932	-0.999	0.236	-0.967

As indicated in Table 4, there are strong correlations between the evaluated parameters and the concentrations of some metals, but most of the relationships are inverse, suggesting that it is not possible to make inferences about the effects of individual metals, raising the possibility of additive, synergistic and / or antagonistic effects of the combination of the various metals present in the sample.

## 5. DISCUSSION

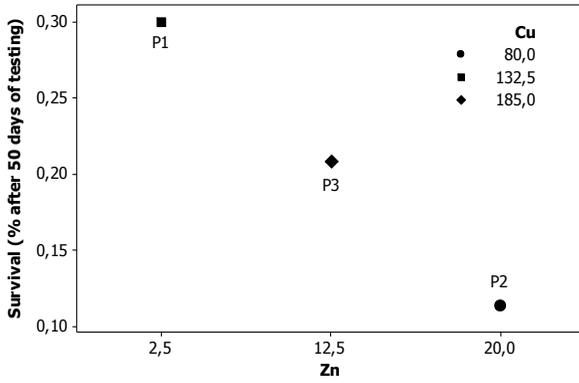
This study evaluated the chronic effects of water samples from BB on mysids based on a transgenerational study in the laboratory and

provides information about the environmental risk due the pollution load in BB. The exposure of juvenile *Mysidopsis juniae* to samples of BB water caused adverse effects on the time to the first brood release, survival, number of births and size of organisms, and the results of the exposed groups differed significantly from those of control groups.

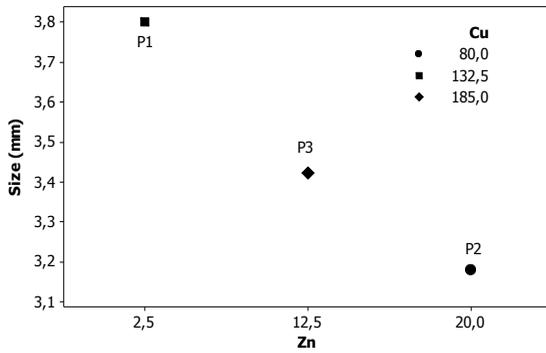
These adverse effects may be related to the presence of mixtures of the metals Cd, Pb, Cu, Cr, Ni and Zn in water samples.

Because of the high power of complexation of the chloride ions present in seawater, it is assumed that cadmium and lead have less of an influence on toxicity because the free metal ion, the most bioavailable form, is less abundant at high salinities and favors the formation of chlorine complexes (VERSLYCKE *et al.*, 2003). Additionally, Cd most likely competes with Zn for binding sites for methallothionein synthesis, generating an antagonistic effect between these two metals (FRÍAS-ESPERICUETA *et al.*, 2009). Chromium also has little influence on toxicity because it is present as  $\text{Cr}^{3+}$ , a less toxic form, due to the redox potential and pH of the medium in which the test was run.

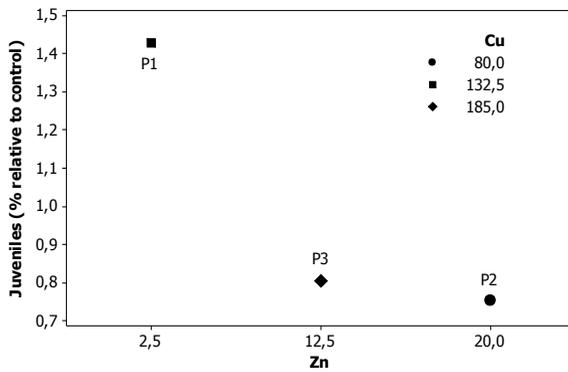
Copper, Nickel and Zinc may have contributed substantially to the toxicity of the water samples. Cu is reported to be a metal of high toxicity, with an LD50 (96 h) for mysids (*Neomysis integer*) of 68 ppm (VERSLYCKE *et al.*, 2003). Zinc toxicity is approximately 17 times greater than that of copper at a salinity of 35 ppt (FRÍAS-ESPERICUETA *et al.*, 2009) and may be considered the master variable for toxicity in this study. Zn concentrations on the order of  $499 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  cause acute effects in mysids (*Mysidopsis bahia*) (LUSSIER *et al.*, 1985). In addition to being highly toxic as individual metals, copper and zinc compounds are reported to exhibit synergistic interactions, greatly increasing their toxic effects when present together in an aquatic environment (UTGIKAR *et al.*, 2004). One of the effects of the presence of Cu and Zn is hyperglycemia (LORENZON *et al.*, 2000), and changes in glucose levels may indicate disruptions in hormonal activity related to molting, vitellogenesis and reproduction (MONTAGNE *et al.*, 2010; VERSLYCKE *et al.*, 2004c) in crustaceans. To assess whether the above statements are confirmed in our study, we plotted survival, the size of organisms and the number of births against the concentrations of Zn and Cu, as shown in Figure 3.



(a)



(b)



(c)

Figure 3: Graphs of the main effects of the metal concentrations present in the tested water samples on (a) survival, (b) body size and (c) births.

As shown in the graphs of Figure 3, our study appears to confirm the synergistic effects of Cu and Zn observed by (VERSLYCKE *et al.*, 2003). Points P2 and P3, by having higher concentrations of both compounds, exhibited the strongest effects on the three parameters presented in the graphs. Because point P1 has a high concentration of Cu but a much lower concentration of Zn, the possibility of synergy was much lower than for the other two points.

Nickel most likely also contributed to toxicity, but according to several authors (LUSSIER *et al.*, 1985; MCLUSKY e HAGERMAN, 1987; VERSLYCKE *et al.*, 2003), this compound has a lower toxic potential than Cu and Zn. In a study to assess the interaction between mixtures of Ni and Zn, the observed toxicity was related primarily to the concentration of Zn (HERKOVITS *et al.*, 2000), thus confirming the theory that copper and zinc are the primary causes of the observed toxicity. Cu (HANDY, 2003; KHANGAROT e DAS, 2010; MEDESANI *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008; RHEE *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007) and Zn (RHEE *et al.*, 2009) are reported to be endocrine disruptors, which is one possible explanation for the effect on the time to reproduction in the first and second generations for P1 as well as the number of births in all of the exposed groups. Thus, we suggest that the observed toxic effects on the survival, birth rate and body size of the mysids is primarily due to the synergism between copper and zinc, but without discarding the contributions of other metals present in the water, which may have influenced the results but at a lower intensity, as Pb (HIRSCH *et al.*, 2010), Cd (KETATA *et al.*, 2007; MEDESANI *et al.*, 2004; RHEE *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ *et al.*, 2007) and Cr (BANU *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008) are also reported endocrine disruptors.

The presence of these metals in BB (OLIVEIRA *et al.*, 2006), identified trace amounts of metals in the region in water samples, in sediments and bioaccumulated in marine organisms; measurements included Pb (up to 13.62 mg.kg<sup>-1</sup> in sediment, up to 0.120 mg.L<sup>-1</sup> in water and less than 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> in the muscle of shrimp); Cd (up to 5.02 mg.kg<sup>-1</sup> in sediments, up to 0.062 mg.L<sup>-1</sup> in water and less than 0.05 mg.kg<sup>-1</sup> in the muscle of shrimp); Cr (up to 27.53 mg.kg<sup>-1</sup> in sediment, up to 0.22 mg.L<sup>-1</sup> in water and less than 0.1 mg.kg<sup>-1</sup> in the muscle of shrimp); Cu (up to 16.48 mg.kg<sup>-1</sup> in sediments, up to 0.87 mg.L<sup>-1</sup> in water and up to 6.02 mg.kg<sup>-1</sup> in the muscle of shrimp); Ni (up to 10.43 mg.kg<sup>-1</sup> in sediments, up to 0.27 mg.L<sup>-1</sup> in water and less than 0.40 mg.kg<sup>-1</sup> in the muscle of shrimp) and Zn (up to 233.00 mg.kg<sup>-1</sup> in sediments, up to 0.07 mg.L<sup>-1</sup> in water and up to 15.07 mg.kg<sup>-1</sup> in the

muscle of shrimp), confirming that the metals that accumulate most strongly in organisms similar to mysids are, first, Zn and, second, Cu.

From the comparison of our results with the study of (OLIVEIRA *et al.*, 2006), we suggest that the metals Zn and Cu are the primary cause of toxicity in mysids. In addition to having a larger potential than the other metals for bioaccumulation, they act synergistically when combined to increase toxicity and affect the endocrine system of crustaceans. Zn requires special attention based on its potential for bioaccumulation, distinguished from all other metals studied for samples with a salinity of  $33 \pm 1$  ppt.

Because mysids are generally more sensitive to a wide range of contaminants than other species (NIMMO e HAMAKER, 1982) (VERSLYCKE *et al.*, 2007; VERSLYCKE *et al.*, 2004c), the application of chronic toxicity tests with *Mysidopsis juniae*, a endemic specimen from Brazil, is very useful for detecting pollutants in tropical aquatic environments.

## CONCLUSION

The transgenerational chronic toxicity test based on the variables of survival, number of births and body size of mysids indicated that the waters of different sampling points within BB may cause adverse effects on these variables. The presence of metals in the water samples may be the primary cause of the observed effects because among the measured metals, Cu and Zn are known to act synergistically, and the effects quantified for other metals such as Ni should further contribute to these effects. Pb and Cd most likely contributed little to toxicity because they are less toxic in environments with a high presence of chloride ions due to the ease of complexation from these metals with the ligand. Cd can also be antagonized by the presence of Zn as a function of competition in the synthesis of methallothionein, thereby minimizing toxicity. Under the studied conditions, due to the redox potential and pH of the samples, Cr is primarily in the trivalent form, the less toxic form of this metal, and therefore was likely to have little influence on the overall toxicity results.

The results of this study indicate that the region is undergoing changes resulting from the anthropogenic activities taking place in the six municipalities adjacent to BB. We suggest that the observed effects may be related to the metals found in the water samples, primarily because some of those metals are reported endocrine disruptors.

Because mysids are important members of the food chain and are consumed by several species of small fish, it may be assumed that a decline of the microcrustacean population may cause a decrease in food availability and an imbalance in the BB ecosystem.

Chronic toxicity tests with *Mysidopsis juniae* are a suitable method for similar studies, chronic toxicity tests being easily performed and showing sensitivity and reproducibility for toxicological studies in tropical waters.

## REFERENCES

**Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.** W. Horwitz. Gaithersburg, MD, USA 2000.

ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M.; RACHID, B. R. F.; MASTROTI, R. R. Use of the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* as a tool in marine sediments contamination assessment. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** v.41, p.0-0, 1998.

ABNT. **NBR 15308. Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea).** Brazil: Associação Brasileira de Normas Técnicas 2011.

\_\_\_\_\_. **NBR 15350. Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).** Brazil: Associação Brasileira de Normas Técnicas 2012.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. **Aquatic toxicology test methods.** In: D. J. Hoffmann, B. A. Rattner, *et al* (Ed.). Handbook of ecotoxicology. Florida: CRC Press, 2002. Aquatic toxicology test methods

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings.** Issue 1, v.59, p.2-20, 2007.

AMORIM, J. C. C.; ELFRINK, B.; CARVALHO, J. L. B. D.; CASAROLI, L. F. R. **Diagnóstico dos estudos de circulação de água no canal do linguado e na Baía da Babitonga.** In: M. J. Cremer, P. R. D. Morales, *et al* (Ed.). Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga.

Joinville: Univille, 2006. Diagnóstico dos estudos de circulação de água no canal do linguado e na Baía da Babitonga, p.256

ASTM. **Standard guide for conducting life-cycle toxicity tests with saltwater mysids**. United States: ASTM International. E1191-03a: 17 p. 2008.

BAAS, I. **Six Sigma Statistics with Excel and Minitab**: McGraw-Hill. United States of America, 2007.

BADARÓ-PEDROSO, C. **Toxicidade crônica de amostras ambientais do Canal de São Sebastião, e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA: MYSIDACEA)**. (Dissertação). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993. 170 p.

BADARÓ-PEDROSO, C.; NIPPER, M. Effect of seawater samples from a pollution impacted area in Southeastern Brazil to *Mysidopsis juniae*. In: 14 the Annual Meeting (SETAC) - Ecological Risk Assessment: Lessons Learned?, 1993. **Anais**. Houston: SETAC, 1993.v.p.

BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. **Testes de toxicidade aguda com misidáceos - Ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* E *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea)**. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, *et al* (Ed.). Métodos em Ecotoxicologia Marinha - Aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas, 2002. Testes de toxicidade aguda com misidáceos - Ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* E *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea), p.262

BANU, S. K.; SAMUEL, J. B.; AROSH, J. A.; BURGHARDT, R. C.; ARULDHAS, M. M. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Issue 2, v.232, p.180-189, 2008.

BARROS GRACE, V.; MAS-PLA, J.; OLIVEIRA NOVAIS, T.; SACCHI, E.; ZUPPI, G. M. Hydrological mixing and geochemical processes characterization in an estuarine/mangrove system using

environmental tracers in Babitonga Bay (Santa Catarina, Brazil). **Continental Shelf Research**. Issue 4-5, v.28, p.682-695, 2008.

BERG, C. M. G. V. D.; WONG, P. T. S.; CHAU, Y. K. Measurement of Complexing Materials Excreted from Algae and Their Ability to Ameliorate Copper Toxicity. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**. Issue 8, v.36, p.901-905, 1979.

BILLOIR, E.; PÉRY, A. R. R.; CHARLES, S. Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: A combination of the DEBtox and matrix population models. **Ecological Modelling**. Issue 3-4, v.203, p.204-214, 2007.

BLAISE, C.; CAGNÉ, F.; EULLAFFROY, P.; FÉRARD, J.-F. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Québec, Canada): A review. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. Issue 2, v.10, p.29-51, 2006.

BLINOVA, I.; IVASK, A.; HEINLAAN, M.; MORTIMER, M.; KAHRU, A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environmental Pollution**. Issue 1, v.158, p.41-47, 2010.

BÖHM, R. F. S. **Teste de toxicidade crônica com *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979): avaliação de amostra ambiental da área de aquicultura do Capri - Baía da Babitonga/SC. Joinville, SC., Univille, Joinville, 2010.**

Ministério do Meio Ambiente do Brasil. **Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNCGII)**. 1997.

Ministério do Meio Ambiente. **LEI Nº 7.661, DE 16 DE MAIO DE 1988.**, 1998.

BROOKINS, D. G. **Eh-pH diagrams for geochemistry**: Springer-Verlag, New York, 1988.

BUFFET, P.-E.; TANKOUA, O. F.; PAN, J.-F.; BERHANU, D.; HERRENKNECHT, C.; POIRIER, L.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; BÉRARD, J.-B.; RISSO, C.; GUIBBOLINI, M.; ROMÉO, M.; REIP, P.; VALSAMI-JONES, E.; MOUNEYRAC, C.

Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. **Chemosphere**. Issue 1, v.84, p.166-174, 2011.

BURGESS, R. M.; TERLETSKAYA, A. V.; MILYUKIN, M. V.; POVOLOTSKII, M.; DEMCHENKO, V. Y.; BOGOSLAVSKAYA, T. A.; TOPKIN, Y. V.; VOROBYOVA, T. V.; PETROV, A. N.; LYASHENKO, A.; HO, K. T. Concentration and distribution of hydrophobic organic contaminants and metals in the estuaries of Ukraine. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 8, v.58, p.1103-1115, 2009.

CASTRO, Í. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova**. v.34, p.1021-1031, 2011.

CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; SANTOS, A. R.; ABESSA, D. M. D. S.; FERNÁNDEZ, N.; CHOUERI, R. B.; DELVALLS, T. A. Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system- Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v.54, p.55-63, 2006.

CETESB. **Água do mar teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* SILVA, 1979 (crustacea mysidacea)**. São Paulo: Companhia ambiental do estado de São Paulo 1992.

CHAKRAVORTY, S. S. Six Sigma programs: An implementation model. **International Journal of Production Economics**. Issue 1, v.119, p.1-16, 2009.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **Intoxicação e avaliação da toxicidade**. In: A. a. M. Chasin e F. A. Azevedo (Ed.). *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Paulo: Rima, 2003. Intoxicação e avaliação da toxicidade, p.340

CHÈVRE, N.; BRAZZALE, A. R.; BECKER-VAN SLOOTEN, K.; BEHRA, R.; TARRADELLAS, J.; GUETTINGER, H. Modeling the concentration–response function of the herbicide dinoseb on *Daphnia magna* (survival time, reproduction) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (growth rate). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.62, p.17-25, 2005.

CIOFFI, N.; DITARANTO, N.; TORSI, L.; PICCA, R. A.; SABBATINI, L.; VALENTINI, A.; NOVELLO, L.; TANTILLO, G.; BLEVE-ZACHEO, T.; ZAMBONIN, P. G. Analytical characterization of bioactive fluoropolymer ultra-thin coatings modified by copper nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Issue 3, v.381, p.607-616, 2005.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. v.31, p.1820-1830, 2008.

CREMER, M. J.; MORALES, P. R. D.; OLIVEIRA, T. M. N. **Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga** UNIVILLE. JOINVILLE, 2006.

DAUVIN, J.-C.; ALIZIER, S.; VALLET, C.; RUELLET, T. Does the Port 2000 harbour construction have an effect on the Seine estuary suprabenthic community? **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. Issue 1, v.86, p.42-50, 2010.

DÍAZ-ASENCIO, M.; ALONSO-HERNÁNDEZ, C. M.; BOLANOS-ÁLVAREZ, Y.; GÓMEZ-BATISTA, M.; PINTO, V.; MORABITO, R.; HERNÁNDEZ-ALBERNAS, J. I.; ERIKSSON, M.; SANCHEZ-CABEZA, J. A. One century sedimentary record of Hg and Pb pollution in the Sagua estuary (Cuba) derived from <sup>210</sup>Pb and <sup>137</sup>Cs chronology. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 4-7, v.59, p.108-115, 2009.

ERK, M.; MUYSSSEN, B. T. A.; GHEKIERE, A.; JANSSEN, C. R. Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.357, p.172-180, 2008.

ESSIEN, J. P.; ESSIEN, V.; OLAJIRE, A. A. Heavy metal burdens in patches of asphyxiated swamp areas within the Qua Iboe estuary mangrove ecosystem. **Environmental Research**. Issue 6, v.109, p.690-696, 2009.

FERNANDES, J. M. R.; REBELATO, M. G. Proposta de um método para integração entre QFD e FMEA. **Gestão & Produção**. v.13, p.245-259, 2006.

FILSER, J. Ecotoxicology and ecosystems: Relevance, restrictions, research needs. **Basic and Applied Ecology**. Issue 4, v.9, p.333-336, 2008.

FOCKEDEY, N.; GHEKIERE, A.; BRUWIERE, S.; JANSSEN, C.; VINCX, M. Effect of salinity and temperature on the intra-marsupial development of the brackish water mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Marine Biology**. Issue 6, v.148, p.1339-1356, 2006.

FOCKEDEY, N.; MEES, J.; VANGHELUWE, M.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. R.; VINCX, M. Temperature and salinity effects on post-marsupial growth of *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 1, v.326, p.27-47, 2005.

FREITAS, C. M. D.; PORTO, M. F. S.; MOREIRA, J. C.; PIVETTA, F.; MACHADO, J. M. H.; FREITAS, N. B. B. D.; ARCURI, A. S. Segurança química, saúde e ambiente: perspectivas para a governança no contexto brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**. v.18, p.249-256, 2002.

FRÍAS-ESPERICUETA, M. G.; VOLTOLINA, D.; OSUNA-LÓPEZ, I.; IZAGUIRRE-FIERRO, G. Toxicity of metal mixtures to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Marine Environmental Research**. Issue 5, v.68, p.223-226, 2009.

GAMA, A. M. D. S.; MONTÚ, M. A.; D'INCAO, F. Ciclo de mudas e taxas de crescimento de *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea, Mysidacea) cultivado em diferentes temperaturas e salinidades. **Iheringia. Série Zoologia**. v.96, p.67-70, 2006.

GAO, J.; YOUN, S.; HOVSEPYAN, A.; LLANEZA, V. N. L.; WANG, Y.; BITTON, G.; BONZONGO, J.-C. J. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. **Environmental Science & Technology**. Issue 9, v.43, p.3322-3328, 2009.

GARCÍA-BARCINA, J. M.; GONZÁLEZ-OREJA, J. A.; DE LA SOTA, A. Assessing the improvement of the Bilbao estuary water

quality in response to pollution abatement measures. **Water Research**. Issue 5, v.40, p.951-960, 2006.

GARNACHO, E.; PECK, L. S.; TYLER, P. A. Effects of copper exposure on the metabolism of the mysid *Praunus flexuosus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.265, p.181-201, 2001.

GHEKIERE, A.; FENSKE, M.; VERSLYCKE, T.; TYLER, C.; JANSSEN, C. Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 1, v.142, p.43-49, 2005.

GHEKIERE, A.; FOCKEDEY, N.; VERSLYCKE, T.; VINCX, M.; JANSSEN, C. R. Marsupial development in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) to evaluate the effects of endocrine-disrupting chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.66, p.9-15, 2007.

GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; DE SMET, L.; VAN BEEUMEN, J.; JANSSEN, C. R. Purification and characterization of vitellin from the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 4, v.138, p.427-433, 2004.

GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; FOCKEDEY, N.; JANSSEN, C. R. Non-target effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.332, p.226-234, 2006a.

GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; JANSSEN, C. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. **General and Comparative Endocrinology**. Issue 2, v.147, p.190-195, 2006b.

GOMES, L. F. A. M.; DUARTE JR, A. M. A avaliação de projetos com múltiplos critérios. **Produção**. v.2, p.5-19, 1992.

GOROKHOVA, E. Exploring and modeling the growth dynamics of *Mysis mixta*. **Ecological Modelling**. Issue 1, v.110, p.45-54, 1998.

GOROKHOVA, E. Moulting cycle and its chronology in *Mysis mixta* and *Neomysis integer* (Crustacea, Mysidacea): implications for growth assessment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2, v.278, p.179-194, 2002.

GREENBERG, A. E.; EATON, A. D.; CLESCERI, L. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: American Public Health Association. Washington, 1998.

GRIFFITT, R. J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.-C.; BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Issue 9, v.27, p.1972-1978, 2008.

HALPERN, B. S.; WALBRIDGE, S.; SELKOE, K. A.; KAPPEL, C. V.; MICHELI, F.; D'AGROSA, C.; BRUNO, J. F.; CASEY, K. S.; EBERT, C.; FOX, H. E.; FUJITA, R.; HEINEMANN, D.; LENIHAN, H. S.; MADIN, E. M. P.; PERRY, M. T.; SELIG, E. R.; SPALDING, M.; STENECK, R.; WATSON, R. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. **Science**. Issue 5865, v.319, p.948-952, 2008.

HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 1, v.135, p.25-38, 2003.

HEINLAAN, M.; KAHRU, A.; KASEMETS, K.; ARBEILLE, B.; PRENSIER, G.; DUBOURGUIER, H.-C. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. **Water Research**. Issue 1, v.45, p.179-190, 2011.

HELLING, B.; REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Effects of the Fungicide Copper Oxochloride on the Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.46, p.108-116, 2000.

HERKOVITS, J.; PÉREZ-COLL, C. S.; HERKOVITS, F. D. Evaluation of Nickel–Zinc Interactions by Means of Bioassays with Amphibian

Embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 3, v.45, p.266-273, 2000.

HIRSCH, H. V. B.; POSSIDENTE, D.; POSSIDENTE, B. Pb2+: An endocrine disruptor in *Drosophila*? **Physiology & Behavior**. Issue 2, v.99, p.254-259, 2010.

HOFFMANN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR., G. A.; CAIRNS JR., J. **Handbook of Ecotoxicology**: Lewis Publications. Boca Raton, 2003.

IBAMA. **Proteção e controle de ecossistemas costeiros: manguezal da baía da Babitonga**. 1998.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2010**. 2010.

JACOBS, F. R.; CHASE, R. B. **Administração da produção e de operações: o essencial**: Artmed. Porto Alegre, 2009.

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. **General Principles of Toxicology**. In: P. L. Williams, R. C. James, *et al* (Ed.). Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications. United States of America: John Wiley & Sons, 2000. General Principles of Toxicology

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H.-C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**. Issue 2–3, v.269, p.105-119, 2010.

KARLSSON, H. L.; GUSTAFSSON, J.; CRONHOLM, P.; MÖLLER, L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology Letters**. Issue 2, v.188, p.112-118, 2009.

KETATA, I.; SMAOUI-DAMAK, W.; GUERMAZI, F.; REBAI, T.; HAMZA-CHAFFAI, A. In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of *Ruditapes decussatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. Issue 3, v.146, p.415-430, 2007.

KHANGAROT, B. S.; DAS, S. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea*

luteola L. **Journal of Hazardous Materials**. Issue 1-3, v.179, p.665-675, 2010.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Toxicologia: A ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**: McGraw-Hill de Portugal. Lisboa, 2001.

KNIE, J. L. **Atlas Ambiental da Região de Joinville: Complexo hídrico da baía da Babitonga**: Fatma/GTZ. Joinville, 2002.

KNIE, J. L.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**: FATMA/GTZ. Florianópolis, 2004.

KUMAR, V.; MAJUMDAR, C.; ROY, P. Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. Issue 3-5, v.111, p.208-216, 2008.

KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; BAO, V. W. W.; LEE, J.-S. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 6–12, v.57, p.632-636, 2008.

LARSON, A. **Desmystifying Six Sigma**: AMACOM. New York, 2003.

LEDUC, F.; WHALEN, J. K.; SUNAHARA, G. I. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to leachate from wood preservatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 2, v.69, p.219-226, 2008.

LEIDY, R. B. **Toxicant Analysis and Quality Assurance Principles**. In: E. Hodgson (Ed.). A textbook of modern toxicology. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2004. Toxicant Analysis and Quality Assurance Principles

LESUTIENĖ, J.; GOROKHOVA, E.; GASIŪNAITĖ, Z. R.; RAZINKOVAS, A. Role of mysid seasonal migrations in the organic matter transfer in the Curonian Lagoon, south-eastern Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. Issue 2, v.80, p.225-234, 2008.

LOPES, C.; PÉRY, A. R. R.; CHAUMOT, A.; CHARLES, S. Ecotoxicology and population dynamics: Using DEBtox models in a

Leslie modeling approach. **Ecological Modelling**. Issue 1, v.188, p.30-40, 2005.

LOPES, C. F.; MILANELLI, J. C. C.; PROSPERI, V. A.; ZANARDI, E.; TRUZZI, A. C. Coastal monitoring program of São Sebastião channel: Assessing the effects of 'Tebar V' oil spill on rocky shore populations. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 11, v.34, p.923-927, 1997.

LORENZON, S.; FRANCESE, M.; FERRERO, E. A. Heavy Metal Toxicity and Differential Effects on the Hyperglycemic Stress Response in the Shrimp & Palaemon elegans. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. Issue 2, v.39, p.167-176, 2000.

LOWE, C. N.; BUTT, K. R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. **European Journal of Soil Biology**. Issue 0, v.43, Supplement 1, p.S281-S288, 2007.

LUSSIER, S. M.; GENTILE, J. H.; WALKER, J. Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (crustacea:mysidacea). **Aquatic Toxicology**. Issue 1-2, v.7, p.25-35, 1985.

MARTINEZ, C. B. R.; SUIADICANI, S. O.; FERRONI, E. N.; MOREIRA, G. S. Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Issue 5, v.25, p.487-490, 1992.

MARTINS, P. G.; LAUGENI, F. P. **Administração da produção**: Editora Saraiva. São Paulo, 2006.

MAUCLINE, J. The predation of mysids by fish of the Rockall Trough, northeastern Atlantic Ocean. **Hydrobiologia**. Issue 1, v.93, p.85-99, 1982.

MCDERMOTT, R. E.; MIKULAK, R. J.; BEAUREGARD, M. R. **The basics of FMEA**: CRC Press. New York, 2009.

MCKENNEY, C. L. The Influence of Insect Juvenile Hormone Agonists on Metamorphosis and Reproduction in Estuarine Crustaceans. **Integrative and Comparative Biology**. Issue 1, v.45, p.97-105, 2005.

MCKENNEY JR, C. L.; CELESTIAL, D. M. Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a juvenile hormone analogue through a complete life cycle. **Aquatic Toxicology**. Issue 1, v.35, p.11-20, 1996.

MCLUSKY, D. S.; HAGERMAN, L. The toxicity of chromium, nickel and zinc: effects of salinity and temperature, and the osmoregulatory consequences in the mysid *Praunus flexuosus*. **Aquatic Toxicology**. Issue 4, v.10, p.225-238, 1987.

MEDESANI, D. A.; GRECO, L. S. L.; RODRÍGUEZ, E. M. Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Aquatic Toxicology**. Issue 2, v.69, p.165-174, 2004.

MEN, B.; HE, M.; TAN, L.; LIN, C.; QUAN, X. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Daliao River Estuary of Liaodong Bay, Bohai Sea (China). **Marine Pollution Bulletin**. Issue 6, v.58, p.818-826, 2009.

MENG, H.; CHEN, Z.; XING, G.; YUAN, H.; CHEN, C.; ZHAO, F.; ZHANG, C.; ZHAO, Y. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. **Toxicology Letters**. Issue 1-3, v.175, p.102-110, 2007.

MESS, J. ***Mysidopsis juniae***. World Register of Marine Species 2012.

MONTAGNE, N.; DESDEVISES, Y.; SOYEZ, D.; TOULLEC, J.-Y. Molecular evolution of the crustacean hyperglycemic hormone family in ecdysozoans. **BMC Evolutionary Biology**. Issue 1, v.10, p.62, 2010.

MOURA, J. F. D.; CARDOZO, M.; BELO, M. S. D. S. P.; HACON, S.; SICILIANO, S. A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças, impactos socioeconômicos e relações benéficas. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.16, p.3469-3480, 2011.

NATIONAL WETLAND VALUES ASSESSMENT, W. **Proceedings of the National Wetland Values Assessment Workshop [microform]**

: May 23-26, 1983, Alexandria, Virginia / sponsoring agencies, Federal Highway Administration ... [et al.] ; cooperating agencies, Federal Energy Regulatory Commission ... [et al.] ; performed for Western Energy and Land Use Team, Division of Biological Services, Research and Development, Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior: The Team. Washington, DC :, 1984.

NICODEMO, S. C. T. E. S. **Diagnóstico ecotoxicológico dos efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiaí/Potengi, Natal-RN.** (Dissertação). Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

NIETO, J. M.; SARMIENTO, A. M.; OLÍAS, M.; CANOVAS, C. R.; RIBA, I.; KALMAN, J.; DELVALLS, T. A. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. **Environment International**. Issue 4, v.33, p.445-455, 2007.

NIMMO, D. R.; HAMAKER, T. L. Mysids in toxicity testing — a review. **Hydrobiologia**. Issue 1, v.93, p.171-178, 1982.

NIPPER, M. G.; BADARÓ-PEDROSO, C.; JOSÉ, V. F.; MELO, S. L. R. Toxicity testing with coastal species of Southeastern Brazil. Mysids and copepods. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. Issue 1, v.51, p.99-106, 1993.

NOONAN, M. Mind maps: Enhancing midwifery education. **Nurse Education Today**. Issue 0, 2012.

NOPPE, H.; GHEKIERE, A.; VERSLYCKE, T.; WULF, E. D.; VERHEYDEN, K.; MONTEYNE, E.; POLFLIET, K.; CAETER, P. V.; JANSSEN, C. R.; DE BRABANDER, H. F. Distribution and ecotoxicity of chlorotriazines in the Scheldt Estuary (B-NI). **Environmental Pollution**. Issue 3, v.147, p.668-676, 2007.

ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia**:. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2001.

Environment Directorate, Organisation of Economic Corporation and Development. **Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle toxicity tests with an emphasis on developmental, reproductive and endocrine disruptive effects**. 55, 2006.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**: Atheneu. São Paulo, 2003.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; GRISOLIA, C. K.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Trans-generation study of the effects of nonylphenol ethoxylate on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 2, v.72, p.458-465, 2009.

OLIVEIRA, M.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. J.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.70, p.20-26, 2008.

OLIVEIRA, T. M. N.; TURECK, C. R.; BASSFELD, J. C.; TORRENS, B. M. D. O.; FARIA, J. M.; BRASIL, K. **Integridade Ambiental da baía da Babitonga: Características físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicidade**. In: M. J. Cremer, P. R. D. Morales, *et al* (Ed.). Diagnóstico ambiental da baía da Babitonga. Joinville: Univille, 2006. *Integridade Ambiental da baía da Babitonga: Características físico-químicas, microbiológicas e ecotoxicidade*, p.256

OLIVEIRA, T. M. N.; VAZ, C.; KLEINE, T.; BÖHM, R. F. S.; MATIAS, W. G. Effect of temperature and salinity in *Mysidopsis juniae* reproduction. **Toxicology Letters**. Issue 0, v.196, Supplement, p.S121, 2010.

OLIVEIRA, T. M. N. D.; VAZ, C.; KLEINE, T.; MATIAS, W. G.; BÖHM, R. F. S.; GONÇALVES, R. A.; TORTELLI, T. S.; BARROS, V. G. Influence of abiotic factors in the cultivation of *Mysidopsis juniae*. **Toxicology Letters**. Issue 0, v.205, Supplement, p.S133, 2011.

ORTEGA-SALAS, A. A.; NÚÑEZ-PASTÉN, A.; CAMACHO M, H. A. Fecundity of the crustacean *Mysidopsis californica* (Mysida, Mysidae) under semi-controlled conditions. **Revista de Biología Tropical**. v.56, p.535-539, 2008.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H. M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; STARK, L. M. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. **Marine Pollution Bulletin**. Issue 9, v.58, p.1374-1381, 2009.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**. v.33, p.421-430, 2010.

PASSARELLI, M. M. **Toxicologia Ambiental**. In: S. Oga (Ed.). Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 2003. Toxicologia Ambiental, p.474

PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, M. L.; DE LA ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. **Journal of Hazardous Materials**. Issue 1, v.186, p.1-15, 2011.

PEREIRA, E. S.; MARTINELLI, A. R.; SPECK, M. **Relatório final do projeto de pesquisa de mercado interno para o APL metalmecânico de Joinville**. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Joinville: Agosto de 2007, p.57, 2007.

PERIN, G. **Ecotoxicologia integrada quantitativa**: Editora Univille. Joinville, 2005.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G.; POPOVIC, R. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chemosphere**. Issue 11, v.87, p.1388-1394, 2012.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; PIRASTRU, L.; SIROIS, L.; GERSON MATIAS, W.; POPOVIC, R. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll a Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. **Journal of Botany**. v.2010, 2010.

PRÓSPERI, V. A. **Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas**. (Dissertação). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992. 120 p.

QUAYLE, D. B.; NEWKIRK, G. F.; WORLD AQUACULTURE, S.; INTERNATIONAL DEVELOPMENT RESEARCH, C. **Farming bivalve molluscs : methods for study and development**: World

Aquaculture Society in association with the International Development Research Centre. Baton Rouge, LA, 1989.

RAUSINA, G. A.; WONG, D. C. L.; RAYMOND ARNOLD, W.; MANCINI, E. R.; STEEN, A. E. Toxicity of methyl tert-butyl ether to marine organisms: ambient water quality criteria calculation. **Chemosphere**. Issue 5, v.47, p.525-534, 2002.

RESGALLA JR., C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. v.6, p.153-163, 2002.

RESGALLA JR., C.; NOLDIN, J.; TAMANAHA, M.; DESCHAMPS, F.; EBERHARDT, D.; RÖRIG, L. Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. **Ecotoxicology**. Issue 8, v.16, p.565-571, 2007.

RHEE, J.-S.; RAISUDDIN, S.; HWANG, D.-S.; LEE, K.-W.; KIM, I.-C.; LEE, J.-S. Differential expression of metallothionein (MT) gene by trace metals and endocrine-disrupting chemicals in the hermaphroditic mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Issue 1, v.72, p.206-212, 2009.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. The position maintenance behaviour of *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) in response to current velocity, substratum and salinity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 1, v.220, p.25-45, 1998.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**. Issue 3-4, v.47, p.227-241, 2000a.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. **Marine Environmental Research**. Issue 1-5, v.50, p.107-112, 2000b.

ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Behavioural responses of estuarine mysids to hypoxia and disruption by cadmium. **Marine Environmental Research**. Issue 3-5, v.54, p.319-323, 2002.

RODRÍGUEZ, E. M.; MEDESANI, D. A.; FINGERMAN, M. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Issue 4, v.146, p.661-671, 2007.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**. Issue 7, v.46, p.1117-1140, 2002.

ROSA, R. O. **Geomorfologia: domínios morfoestruturais e unidades geomorfológicas**. In: J. L. Knie (Ed.). Atlas ambiental da região de Joinville: Complexo hídrico da baía da Babitonga. Joinville: FATMA/GTZ, 2002. Geomorfologia: domínios morfoestruturais e unidades geomorfológicas, p.144

ROZENFELD, H.; FORCELLINI, F. A.; AMARAL, D. C.; TOLEDO, J. C. D.; SILVA, S. L. D.; ALLIPRANDINI, D. H.; SALICE, R. K. **Gestão de desenvolvimento de produtos: uma referência para a melhoria do processo**: Editora Saraiva. São Paulo, 2006.

SAYES, C. M.; FORTNER, J. D.; GUO, W.; LYON, D.; BOYD, A. M.; AUSMAN, K. D.; TAO, Y. J.; SITHARAMAN, B.; WILSON, L. J.; HUGHES, J. B.; WEST, J. L.; COLVIN, V. L. The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes. **Nano Letters**. Issue 10, v.4, p.1881-1887, 2004.

SLACK, N.; CHAMBERS, S.; JOHNSTON, R. **Administração da Produção**: Atlas. São Paulo, 2009.

SNIS. **Sistema nacional de informações sobre saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgotos**. Brasília, 2007.

SOUSA, E. C. P. M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, *et al* (Ed.). Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil, p.262

SOUZA, K. G. D.; MARTINS, L. R. S.; CAVALCANTI, V. M. M.; PEREIRA, C. V.; BORGES, L. Recursos minerais marinhos: fatos

portadores de futuro, prioridades de estudo no Brasil e projetos estruturantes. **Parcerias estratégicas**. Issue 24, v.12, p.247-261, 2007.

STIMAMIGLIO, A. **Hidrografia**. In: J. L. Knie (Ed.). Atlas Ambiental da Região de Joinville: Complexo hídrico da baía da Babitonga. Joinville: Fatma/GTZ, 2002. Hidrografia, p.144

STUDER, A. M.; LIMBACH, L. K.; VAN DUC, L.; KRUMEICH, F.; ATHANASSIOU, E. K.; GERBER, L. C.; MOCH, H.; STARK, W. J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. **Toxicology Letters**. Issue 3, v.197, p.169-174, 2010.

SUBRAMONIAM, T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. Issue 2, v.125, p.135-156, 2000.

TAGHIZADEGAN, S. **Essentials of lean six sigma**: Elsevier Inc. Oxford, 2006.

TAKENO, N. **Atlas of Eh-pH diagrams Intercomparison of thermodynamic databases**.: Geological Survey of Japan, (419), 285. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Research Center for Deep Geological Environments. Tokyo, 2005.

THORPE, K. L.; BENSTEAD, R.; HUTCHINSON, T. H.; TYLER, C. R. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. **Aquatic Toxicology**. Issue 1, v.81, p.90-98, 2007.

TOMA, H. E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século**.: Editora Oficina de Textos. 2004.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia**: Artmed Editora S/A. Porto Alegre, 2006.

TRUHAUT, R. Eco-toxicology - objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.1, p.151-173, 1977.

U.S. Environmental Protection Agency. **Draft detailed review paper on mysid life cycle toxicity test.** 2002a.

U.S. Environmental Protection Agency. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms.** 2002b.

UTGIKAR, V. P.; CHAUDHARY, N.; KOENIGER, A.; TABAK, H. H.; HAINES, J. R.; GOVIND, R. Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. **Water Research.** Issue 17, v.38, p.3651-3658, 2004.

VAN BRESSEM, M. F.; SANTOS, M. C. D. O.; OSHIMA, J. E. D. F. Skin diseases in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Paranaguá estuary, Brazil: A possible indicator of a compromised marine environment. **Marine Environmental Research.** Issue 2, v.67, p.63-68, 2009.

VERSLYCKE, T.; GHEKIERE, A.; JANSSEN, C. R. Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** Issue 2, v.306, p.245-267, 2004a.

VERSLYCKE, T.; GHEKIERE, A.; RAIMONDO, S.; JANSSEN, C. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. **Ecotoxicology.** Issue 1, v.16, p.205-219, 2007.

VERSLYCKE, T.; ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B.; JANSSEN, C. R. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** Issue 1, v.306, p.1-16, 2004b.

VERSLYCKE, T.; VANGHELUWE, M.; HEIJERICK, D.; DE SCHAMPHELAERE, K.; VAN SPRANG, P.; JANSSEN, C. R. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. **Aquatic Toxicology.** Issue 3, v.64, p.307-315, 2003.

VERSLYCKE, T. A.; FOCKEDEY, N.; MCKENNEY, C. L.; ROAST, S. D.; JONES, M. B.; MEES, J.; JANSSEN, C. R. Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: A review. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Issue 5, v.23, p.1219-1234, 2004c.

WALSH, S.; BALBUS, J. M.; DENISON, R.; FLORINI, K. Nanotechnology: getting it right the first time. **Journal of Cleaner Production**. Issue 8–9, v.16, p.1018-1020, 2008.

WEILHOFER, C. L. A review of indicators of estuarine tidal wetland condition. **Ecological Indicators**. Issue 2, v.11, p.514-525, 2011.

WITTMANN, K. J. Comparative biology and morphology of marsupial development in *Leptomysis* and other mediterranean mysidacea (Crustacea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Issue 2–3, v.52, p.243-270, 1981.

WOODWARD, R. T.; WUI, Y.-S. The economic value of wetland services: a meta-analysis. **Ecological Economics**. Issue 2, v.37, p.257-270, 2001.

WORTHAM-NEAL, J. L.; PRICE, W. W. Marsupial Developmental Stages in *Americamysis bahia* (Mysida: Mysidae). **J Crustacean Biol**. Issue 1, v.22, p.98-112, 2002.

YU, M.-H. **Environmental toxicology : biological and health effects of pollutants**: CRC Press. Boca Raton, 2005.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**. v.30, p.1469-1479, 2007.