

## Ensaio de toxicidade para avaliação de águas superficiais estuarinas usando *Nitocra* sp. como organismo-teste alternativo

### Toxicity tests for the evaluation of estuarine surface waters using *Nitocra* sp. as an alternative test organism

dos Santos Mendonça, Jaísa Marília<sup>1\*</sup>; Navoni, Julio Alejandro<sup>2</sup>; de Medeiros, Guilherme Fulgêncio<sup>3</sup>; Pinto Mina, Isabel Maria<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Norte — IFRN, Av. Senador Salgado Filho, 1559, Natal, RN 59015-000, Brazil <https://orcid.org/0000-0002-2352-008X>. <sup>2</sup>Postgraduate Program in Development and Environment at the Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil. <https://orcid.org/0000-0001-8715-0527>. <sup>3</sup>Federal University of Rio Grande do Norte — UFRN, Campus Universitário Lagoa Nova, 1524, Natal, RN 59078-970, Brazil. <https://orcid.org/0000-0002-5279-4725>. <sup>4</sup>Biology Department - School of Sciences, University of Minho (DB-ECUM), Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal <https://orcid.org/0000-0001-7365-6156>

\*[jaisa.mendonca@ifrn.edu.br](mailto:jaisa.mendonca@ifrn.edu.br)

Recibido: 04/02/2022

Aceptado: 26/07/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Resumo.** A crescente poluição de ambientes marinhos e estuarinos por descarga de efluentes é um problema mundial. Os ensaios ecotoxicológicos vêm sendo amplamente utilizados para monitorar os efeitos deste tipo de poluição e, atualmente são incorporados na legislação ambiental de diversos países, nomeadamente no Brasil. Contudo, são poucos os estudos realizados em áreas costeiras e a padronização de métodos com organismos nativos, representativos de ecossistemas locais, é insuficiente. *Nitocra* sp. tem sido eficientemente utilizado em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos e águas intersticiais, sendo necessário avaliar a sua adequação na análise de águas superficiais estuarinas. Amostras pontuais de água do baixo estuário Jundiaí-Potengi (EJP) foram coletadas mensalmente durante 18 meses, em áreas com (CE) e sem (SE) recepção de efluentes tratados. *Nitocra* sp. e *Mysidopsis juniae* (espécie padronizada) foram os organismos teste utilizados nos ensaios ecotoxicológicos. Efeitos letais (taxa de mortalidade) e subletais (taxa de reprodução) foram analisados considerando a caracterização microbiológica e físico-química das amostras testadas. Os teores de oxigênio dissolvido, salinidade, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio amoniacal e amoniacal total, nitrogênio total, óleos e graxas, sólidos suspensos e sedimentáveis, potássio total e coliformes termotolerantes determinados nas amostras CE e SE, traduzem diferentes níveis de poluição nos locais amostrados. As cartas-controle de *Nitocra* sp. e *M. juniae* indicaram boa reprodutibilidade laboratorial, e apesar dos organismos teste terem exibido diferentes perfis ecotoxicológicos, o aumento da taxa de mortalidade de ambos esteve associada à emissão de esgoto tratado. O uso de diferentes organismos teste favorece a representatividade dos ensaios ecotoxicológicos. Considerando o perfil de *Nitocra* sp. no monitoramento do EJP, o seu estabelecimento como organismo-teste padronizado necessita de mais estudos, incluindo a utilização de *nauplii* em bioensaios.

**Palavras chaves:** Ecotoxicologia; Copépodes; Efluentes domésticos; Estuário Jundiaí/ Potengi.

**Abstract.** Increasing pollution of marine and estuarine environments from wastewater discharge is a worldwide problem. Ecotoxicological tests are widely used to monitor the effects of this type of pollution and are currently being incorporated into the environmental legislation of several countries, including Brazil. However, few studies have been conducted in coastal areas, and standardization of methods with native organisms representative of local ecosystems is insufficient. *Nitocra* sp. has been efficiently used in ecotoxicological tests with sediments and interstitial waters, and its suitability for estuarine surface water analysis needs to be assessed. Point samples from the lower Jundiaí-Potengi estuary (JPE) in areas with (CE) and without (SE) discharge of treated effluents were collected monthly for 18 months. *Nitocra* sp. and *Mysidopsis juniae* (standardized species) were the test organisms used in the ecotoxicological assays. The lethal (mortality rate) and sublethal (reproduction rate) effects were analyzed considering the microbiological and physicochemical characterization of the tested samples. Dissolved oxygen, salinity, biochemical oxygen demand, ammoniacal and total ammoniacal nitrogen, total nitrogen, oils and greases, suspended and settleable solids, total potassium and thermotolerant coliform bacteria determined in samples from CE and SE, reflect varying levels of pollution at the sampled

sites. The control charts of *Nitocra* sp. and *M. juniae* indicated good reproducibility in the laboratory, and although the test organisms had different ecotoxicological profiles, the mortality rate of both organisms was related to the discharge of treated wastewater. The use of different test organisms increases the representativeness of the ecotoxicological tests. Given the profile of *Nitocra* sp. in JPE monitoring, further studies, including the use of *nauplii* in bioassays, are needed to establish it as standardized test organism.

**Keywords:** Ecotoxicology; Copepods; Domestic effluents; Jundiaí/ Potengi Estuary.

## 1. Introdução

A interpretação dos possíveis efeitos deletérios de efluentes sanitários e industriais na biota de ecossistemas estuarinos ainda recorre a indicadores tradicionais, limitando-se geralmente a parâmetros microbiológicos e físico químicos.

Os testes ecotoxicológicos avaliam o impacto da contaminação/ poluição em organismos teste constituindo uma aproximação realista das consequências da exposição de seres vivos a contaminantes (Kalloul *et al.* 2012). A importância dos testes ecotoxicológicos tem sido reconhecida pelos órgãos ambientais brasileiros, através da sua inserção nas resoluções de monitoramento ambiental exigidas pelo órgão federal regulador – Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 2005, 2011, 2012).

Assim, a implementação de uma abordagem ecotoxicológica para analisar a deterioração da qualidade da água em rios e regiões costeiras do Brasil é atual e vêm sendo incluída em estudos realizados em diferentes ecossistemas aquáticos (Pereira *et al.* 2015; Pimentel *et al.* 2016; Capparelli *et al.* 2021). Contudo, em particular na região nordeste do Brasil, são poucos os estudos realizados em áreas estuarinas (Nilin *et al.* 2013, 2019; Oliveira *et al.* 2014). A padronização das espécies de organismos teste utilizados em ensaios de toxicidade é essencial para, internacionalmente, se compararem resultados. Porém é importante assinalar que o uso de espécies-chave locais, aumenta a representatividade do ecossistema e a extrapolação dos resultados torna-se mais fiável (Martins e Bianchini 2011).

Os organismos a utilizar em testes de toxicidade devem: (i) ser sensíveis a diversos agentes químicos, (ii) ter um ciclo de vida curto, (iii) ser abundantes e com larga distribuição geográfica, (iv) ter estabilidade genética, (v) ser representativos de seu nível trófico e (vi) facilmente cultivados em laboratório (Zagatto e Bertolotti 2008). Invertebrados tais como crustáceos e moluscos vêm sendo muito usados em testes ecotoxicológicos simples ou envolvendo cadeias alimentares (Dahms *et al.* 2016). Porém, poucas espécies brasileiras são utilizadas, sobretudo para avaliar ambientes ma-

rinhos e estuarinos (Artal *et al.* 2019). O crustáceo (Malacostraca) *Misydopsis juniae*, padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011) para análise de águas salobras/ salinas, tem sido usado com sucesso para testar o efeito de diversos compostos químicos ou misturas complexas (Badaró-Pedroso *et al.* 2002), incluindo efluentes sanitários e industriais (Nicomede 2010) e amostras ambientais estuarinas (Nilin *et al.* 2019).

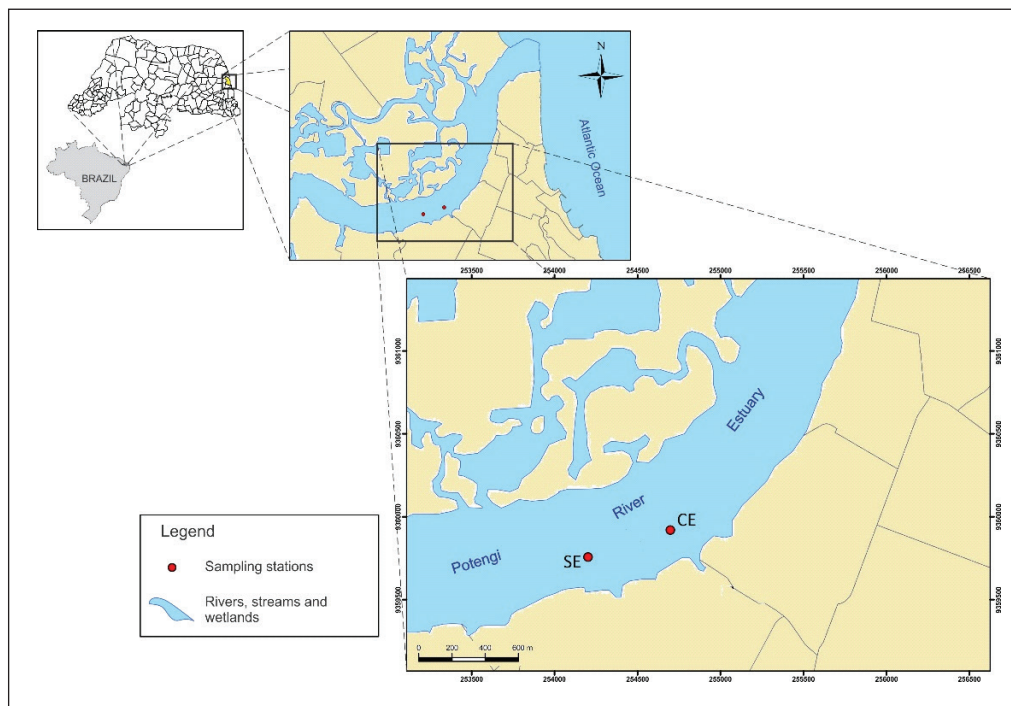
Em ensaios ecotoxicológicos de ambientes marinhos e estuarinos, também são usados certos copépodes que atendem as características supracitadas, além de serem de suma importância na cadeia alimentar, ligando os produtores (fitoplâncton) aos altos predadores, como camarões, peixes e até baleias (Lavorante *et al.* 2013; Kwok *et al.* 2015). Diferentes copépodes vêm sendo frequentemente utilizados como organismos teste em várias partes do mundo: *Acartia tonsa* (Kusk e Petersen 1997; Palma Lopes *et al.* 2018) e *Tisbe battagliai* (Diz *et al.* 2009) em diferentes países europeus; *Acartia sinjiensis* na Austrália (Gissi *et al.* 2013); *Nitocra spinipes* na Austrália e alguns países europeus (Simpson e Sapadaro 2011; Koch e Schamphelaere 2021; Moeris *et al.* 2021); *Quinquelaophonte* sp. na Nova Zelândia (Charry *et al.* 2018); *Tigriopus japonicus* em países orientais (Wong *et al.* 2020, Yu *et al.* 2020); *Tisbe biminiensis* em países da América do Norte e América do Sul (Araújo *et al.* 2013; Costa *et al.* 2014; Souza Santos *et al.* 2015); e *Nitocra* sp., utilizado principalmente com sedimentos no Brasil (Capparelli *et al.* 2021; Ferraz *et al.* 2021, Mendonça *et al.* 2021). Contudo, ainda não foi avaliada a utilização de *Nitocra* sp. no monitoramento ecotoxicológico de águas superficiais. Assim, o objetivo deste estudo incidiu na análise e argumentação do uso de *Nitocra* sp. como organismo teste na avaliação ecotoxicológica da qualidade de águas superficiais estuarinas. Nesse sentido os ensaios realizados com *Nitocra* sp. foram comparados com ensaios realizados com *Misydopsis juniae*, organismo teste padronizado para este tipo de amostras ambientais (ABNT 2011).

## 2. Material e métodos

### 2.1 Área de estudo e amostragem de águas superficiais

Amostras de água superficial do baixo estuário Junadiaí-Potengi (EJP) foram coletadas mensalmente entre junho de 2015 e dezembro de 2016, durante a maré baixa, em dois pon-

tos de amostragem (*Figura 1*): SE, situado a montante da estação de tratamento de esgoto (ETE) do Baldo ( $5^{\circ}47'21.70''S$ ,  $35^{\circ}13'11.18''O$ ) que não recebe esgoto tratado e CE, nas imediações da ETE, onde desagua o canal que recebe os efluentes tratados ( $5^{\circ}47'20.49''S$ ,  $35^{\circ}12'88.93''O$ ).



**Figura 1.** Geolocalização dos pontos de coleta de água superficial no complexo estuarino Junadiaí-Potengi (EJP), Natal/ RN: SE a montante de uma descarga de efluente tratado e, CE na zona de descarga do referido efluente.

### 2.2 Ensaios ecotoxicológicos

O microcrustáceo *Mysidopsis juniae* encontra-se em regiões marinhas costeiras e estuarinas do Brasil (Miyashita e Calliari 2016). De habitat bentônico, estes microcrustáceos medem cerca de 4 a 5 mm de comprimento e em laboratório têm um ciclo de vida de 28 a 30 dias. Testes ecotoxicológicos com *M. juniae* foram realizados seguindo o protocolo padronizado descrito na norma 15.308/2011 – Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT 2011). Em frascos de vidro de 500 mL prepararam-se triplicatas de 400 mL das diferentes concentrações da amostra ambiental: 100, 50, 25, 12,5% e controle negativo (0%). A cada frasco previamente preparado adicionaram-se 10 espécimes jovens de *M. juniae* (de 5 a 7 dias). As amostras de água estuarina foram mantidas nas seguin-

tes condições experimentais: salinidade -  $34 \pm 2$  ‰; temperatura -  $25 \pm 2$  °C; incubação - 96 h com fotoperíodo 12:12 h luz:escuro. Terminado o ensaio, contabilizaram-se os organismos mortos em cada frasco.

*Nitocra* sp. é um pequeno copépode (cerca de 1 mm) bentônico estuarino de fácil cultivo em laboratório com um ciclo de vida de cerca de 20 dias; estes copépodes sobrevivem em salinidades de 5 a 30 ‰ (Lotufo e Abessa 2002; Zaroni *et al.* 2012). Os testes com *Nitocra* sp. foram realizados seguindo o protocolo descrito por Lotufo e Abessa (2002) para águas intersticiais. Em frascos de polietileno com capacidade de 30 mL, colocaram-se em triplicata, 10 mL de cada concentração da amostra ambiental previamente preparadas (diluições de 50, 25, 12,5 e 6,25%, além do controle negativo). Em cada um destes frascos introduziram-se 10 fêmeas ovadas

de *Nitocra* sp. Todo o sistema experimental (15 frascos) foi incubado a  $25 \pm 2$  °C durante 96 h nas seguintes condições: salinidade -  $17 \pm 2$  ‰; fotoperíodo - 12:12h luz:escuro. A manutenção da salinidade das amostras foi ajustada por adição de salmoura ou de água destilada.

No final dos ensaios com *Nitocra* sp., as fêmeas vivas foram contabilizadas para determinar o efeito letal. Os náuplios que eclodiram em cada réplica foram fixados pela adição, a cada frasco, de formaldeído (10%) e corante rosa-bengala (0,1%), sendo a contagem feita ao estereomicroscópio (Coleman, modelo XTB-2B) para determinação da taxa de reprodução ( $n^\circ$  de náuplios por fêmea). A salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD) foram parâmetros determinados no início dos bioensaios nas diferentes concentrações. A toxicidade aguda expressa-se como sendo a concentração da amostra na qual a mortalidade dos organismos presentes é de 50% ( $CL_{50}$ -96h). Os dados expressos em  $CL_{50}$ -96h foram transformados em Unidades Tóxicas - UT (equação 1) de acordo com Bertolleti e Zagatto (2006).

$$UT = \frac{100}{LC_{50}} \quad (1)$$

O efeito subletal das amostras ambientais na reprodução de *Nitocra* sp. é expresso pela maior concentração na qual não se observa efeito (No *Observed Effect Concentration* - NOEC) e pela menor concentração na qual se observa efeito (*Lowest Observed Effect Concentration* - LOEC). A água do mar utilizada para cultivo e bioensaios foi coletada na praia da Via Costeira (alto mar;  $\pm 3$  km;  $\pm 35$  ‰), na cidade de Natal/RN, filtrada em sistema de carvão ativado e esterilizada por radiação ultravioleta (UV). A água assim tratada foi armazenada em barriletes de PVC (policloreto de vinila), com capacidade de 20 e 40 L, previamente higienizados e sob aeração.

O controle de qualidade dos ensaios e a viabilidade dos organismos teste foram avaliados mensalmente através de bioensaios utilizando como substâncias de referência, dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) para *Nitocra* sp. e sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) para *M. junia*, seguindo as recomendações da normativa 15.308 (ABNT 2011) e do protocolo descrito por Lotufo e Abessa (2002).

### 2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

Diferentes parâmetros físico-químicos para caracterização das amostras de água coletadas no EJP foram determinados de acordo com *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 2012). O pH das amostras

de água foi determinado com um potenciômetro (modelo pH-Tec) e a salinidade (Sal, ‰) com um refratômetro (Vodex, vx100sg). O oxigênio dissolvido (OD,  $mg L^{-1}$ ) foi medido com um oxímetro digital portátil (*instrutherm* MO-900), e os valores determinados foram confirmados por titulação, sempre que possível. A quantificação ( $mg L^{-1}$ ) de Óleos e graxas (OG), sólidos suspensos (SS) e sólidos totais (ST) foi feita por gravimetria. Os sólidos sedimentáveis (SSe) foram determinados por sedimentação no cone *Imhoff*.

Após submeter as amostras a respectivamente, (i) um reagente combinado (ácido ascórbico, molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio), (ii) corante azo púrpura avermelhado, e (iii) solução alcalina de tartarato duplo de sódio e potássio, os teores em fósforo (P), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) foram determinados por colorimetria. Os teores em nitrogênio total (N), nitrogênio amoniacal ( $NH_3-N$ ), nitrogênio orgânico (NO), nitrogênio amoniacal total (NAT), demanda bioquímica de oxigênio ( $DBO_5$ ) foram determinados por titulação e o potássio (K) por fotometria de chama.

A detecção de coliformes totais (CT) e de coliformes termotolerantes (CTe) recorreu à técnica de tubos múltiplos, utilizando como meios de cultura, caldo verde brilhante bile 2% (CVVB) e caldo *Escherichia coli* (EC), que avaliam respectivamente, a presença de coliformes totais e termotolerantes.

### 2.4 Análise de dados

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos determinados foram comparados com os valores de referência para águas salinas classe 2 presentes na resolução brasileira  $n^\circ$  357/2005 (CONAMA 2005).

O cálculo da  $CL_{50}$ -96h recorreu ao método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.* 1977), através do programa TOXTAT 3.5<sup>®</sup>. Os valores de NOEC e LOEC foram obtidos por análise de variância ANOVA *one way* para os resultados paramétricos, e para os não paramétricos foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis on Ranks*. A comparação post hoc entre grupos foi realizada utilizando o teste de *Dunnnett's* para dados paramétricos, e o método de *Dunn's* para os não paramétricos. O programa estatístico utilizado foi o *Statistic 7.0*.

A avaliação de *Nitocra* sp. como bioindicador de toxicidade de efeito letal (teste agudo) e subletal (teste crônico) das amostras de água superficial foram comparados com testes de toxicidade aguda normalizados pela ABNT 15.308/2011, que



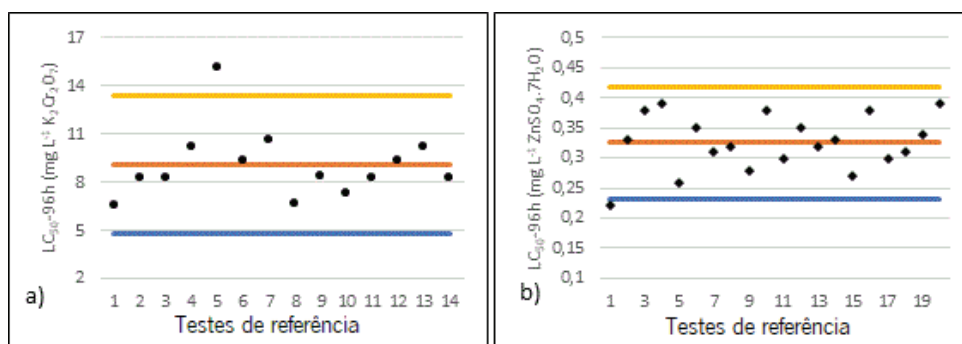
usam *Mysidopsis juniae* como organismo teste. Os resultados ecotoxicológicos analisados foram representados pela taxa de sobrevivência ou reprodução. O efeito observado nos ensaios foi calculado considerando a percentagem de sobrevivente e/ ou *nauplii* em relação ao grupo controle, ou seja, as taxas de sobrevivência e reprodução foram estimadas considerando o número de sobreviventes e de náuplios (respectivamente), contabilizados nas amostras ambientais diluídas de 1:2 em relação aos contabilizados no grupo controle. A análise estatística dos parâmetros ecotoxicológicos e físico-químicos recorreu ao teste U de Mann-Whitney e a amplitude do efeito

calculada mediante o coeficiente *d* de Cohen. O software utilizado foi o SPSS v26.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Cartas - controle

A sensibilidade dos organismos teste utilizados e a reprodutibilidade dos resultados foram avaliadas por testes de referência que permitiram a elaboração de cartas controle (Figura 2a e 2b). De acordo com as respectivas cartas controle, a LC<sub>50</sub>-96h para *Nitocra* sp. em K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> foi de 9,12 ± 2,35 mg L<sup>-1</sup> (n=14) e a LC<sub>50</sub>-96h para *M. juniae* em ZnSO<sub>4</sub> foi de 0,35 ± 0,04 mg L<sup>-1</sup> (n=18).



**Figura 2.** Cartas-controle de *Nitocra* sp. (a) e *M. juniae* (b). Concentração letal (LC<sub>50</sub>-96h) das substâncias de referência, respectivamente, dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O). Valor médio de LC<sub>50</sub>-96h - linha laranja; faixa de sensibilidade entre linhas amarela e azul (± 2 desvios padrão).

Contudo, no quinto teste de referência para *Nitocra* sp. a LC<sub>50</sub>-96h ultrapassou o limite superior estabelecido pela faixa de sensibilidade da carta controle do cultivo (Figura 2a), levando à suspensão dos testes com amostras ambientais até retorno da sobrevivência dos organismos teste, dentro da faixa de sensibilidade estimada (4,89 – 13,36 mg L<sup>-1</sup>), o que ocorreu já no sexto teste. A boa reprodutibilidade sugere que durante o período experimental, os dois organismos teste permaneceram saudáveis.

A LC<sub>50</sub>-96h determinada neste estudo para *Nitocra* sp. em K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (9,12 ± 2,35 mg L<sup>-1</sup>) foi cerca de duas vezes inferior a 15,94 ± 3,46 mg L<sup>-1</sup>, LC<sub>50</sub>-96h determinada por Krull *et al.* (2014). Para o copépode *Tisbe biminiensis*, a LC<sub>50</sub>-96h em K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> foi de 9,45 ± 1,68 mg L<sup>-1</sup> (Araújo-Castro *et al.* 2009) e de 10,5 ± 0,14 mg L<sup>-1</sup> (Régis *et al.* 2018), valores próximos aos determinados neste estudo para *Nitocra* sp.

Em testes de referência para avaliar a resposta de

*M. juniae* a sulfato de Zinco (ZnSO<sub>4</sub>) a LC<sub>50</sub>-96h foi de 0,35 ± 0,04 mg L<sup>-1</sup> (Nilin *et al.* 2019) e 0,33 mg L<sup>-1</sup> (Resgalla *et al.* 2021). Usando dicromato de potássio como substância de referência (de acordo com a norma adotada há mais de 10 anos pelo ECOTOX-Lab), a LC<sub>50</sub>-96h de *M. juniae* foi de 4,12 mg L<sup>-1</sup> (Resgalla *et al.* 2021), cerca de metade da LC<sub>50</sub>-96h determinada no presente estudo para *Nitocra* sp. com K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, o que sugere a maior sensibilidade de *M. juniae* do que *Nitocra* sp. a esta substância de referência.

#### 3.2 Parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de água superficial do baixo EJP coletadas nos pontos CE e SE (Tabela 1) foram determinados e confrontados com a resolução ambiental vigente (resolução n° 357/05, CONAMA 2005) para esse tipo de corpo hídrico.

O monitoramento de OD e DBO<sub>5</sub> em corpos hídricos é de grande importância já que ambos tem sido

relacionado com a mortalidade de organismos aquáticos (Munna *et al.* 2013; Matos *et al.* 2017). Relativamente a OD, em 50% das amostras SE e 80% das amostras CE foram determinados valores inferiores ao limite estabelecido de 5 mg L<sup>-1</sup> (CONAMA 357/ 05). Ao longo do período

monitorado, uma grande variabilidade nos níveis de DBO<sub>5</sub> foi observada (DP = 22,41 mg L<sup>-1</sup>). As concentrações de DBO<sub>5</sub> foram, em média, cerca de 7 vezes superiores em CE em relação a SE, sendo a diferença entre as amostras, significativa ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 1.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de parâmetros físico-químicos e microbiológicos de amostras de água superficial do estuário Jundiáí/ Potengi (n = 18) coletadas a montante da descarga do efluente tratado (SE) e na zona de descarga (CE), ao longo do período experimental (junho de 2015 e dezembro de 2016).

Parâmetro	Unidades	Pontos de amostragem		CONAMA (classe 2)	p -valor	Cohen d
		SE	CE			
OD	mg L <sup>-1</sup>	<b>4,79 <math>\pm</math> 1,48</b>	<b>3,35 <math>\pm</math> 1,85</b>	5,00	0,001	-0,727
pH		7,69 $\pm$ 0,59	7,57 $\pm$ 2,70	6,50 a 8,50	0,194	0,379
Sal(-)	‰	35,47 $\pm$ 3,36	16,69 $\pm$ 8,48	-	0,015	0,252
DBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	2,93 $\pm$ 1,96	20,42 $\pm$ 22,41	-	<0,001	0,272
SS	mg L <sup>-1</sup>	94,48 $\pm$ 75,63	96,35 $\pm$ 79,02	-	<0,001	0,785
SSe	ml L <sup>-1</sup>	0,10 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 1,96	-	<0,001	2,071
OG	mg L <sup>-1</sup>	3,01 $\pm$ 2,58	3,55 $\pm$ 2,52	-	<0,001	1,119
CTe	NMP/ 100 mL	<b>1x10<sup>5</sup> <math>\pm</math> 4 x10<sup>5</sup></b>	<b>16x10<sup>6</sup> <math>\pm</math> 30 x10<sup>6</sup></b>	2500	<0,001	0,947
NAT	mg L <sup>-1</sup>	0,56 $\pm$ 0,34	<b>8,44 <math>\pm</math> 5,39</b>	0,70	<0,001	-2.396
NH <sub>3</sub> -N	mg L <sup>-1</sup>	0,34 $\pm$ 0,26	7,38 $\pm$ 5,05	-	<0,001	0,849
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	<b>0,97 <math>\pm</math> 0,50</b>	<b>1,27 <math>\pm</math> 0,97</b>	0,70	0,685	0,302
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	0,02 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,49	-	0,136	0,287
N	mg L <sup>-1</sup>	1,56 $\pm$ 0,56	10,01 $\pm$ 5,50	-	<,001	1,952
P	mg L <sup>-1</sup>	0,08 $\pm$ 0,09	1,55 $\pm$ 1,39	-	0,122	0,925
K	mg L <sup>-1</sup>	494 $\pm$ 129	283 $\pm$ 208	-	0,014	0,314

<sup>(a)</sup>Não existe limite definido pela legislação.

A negrito, valores que ultrapassam os limites estabelecidos pela resolução CONAMA 357/ 2005 para águas salinas de classe 2.

A salinidade média das amostras SE foi de 35,47  $\pm$  3,36 ‰, correspondendo a valores que caracterizam águas salinas. Nesta região do baixo estuário EJP, Souza *et al.* (2010) e Lopes *et al.* (2018) determinaram valores de salinidade de 32 a 37 ‰ e 22 a 35 ‰, respectivamente. Nas amostras CE a salinidade média foi aproximadamente, metade da determinada em SE ( $p < 0,01$ ). A menor salinidade das amostras CE pode estar relacionada com a influência da variação da vazão da descarga de “água doce” da ETE do Baldo no rio Potengi. Considerados indicadores de poluição urbana devida à emissão de esgoto sanitário (Marins *et al.* 2007; Barletta *et al.* 2019; Nilin *et al.* 2019) os parâmetros SSe, CT, CTe, NA, NAT, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N e K, atingiram valores significativamente superiores em CE, mas apenas NAT e CT excederam os limites impostos pela legislação brasileira (CONAMA 2005). As concentrações de P não diferiram sig-

nificativamente, no entanto, o tamanho de efeito quando comparados os grupos foi considerado grande (cohen d = 0,925). Os nitratos excederam os limites impostos pela legislação em vigor nos dois pontos de amostragem. Apesar de, para os teores de nitrato não terem sido determinadas diferenças estatisticamente significativas entre SE e CE, em CE o teor de nitrato foi, em média, mais elevado.

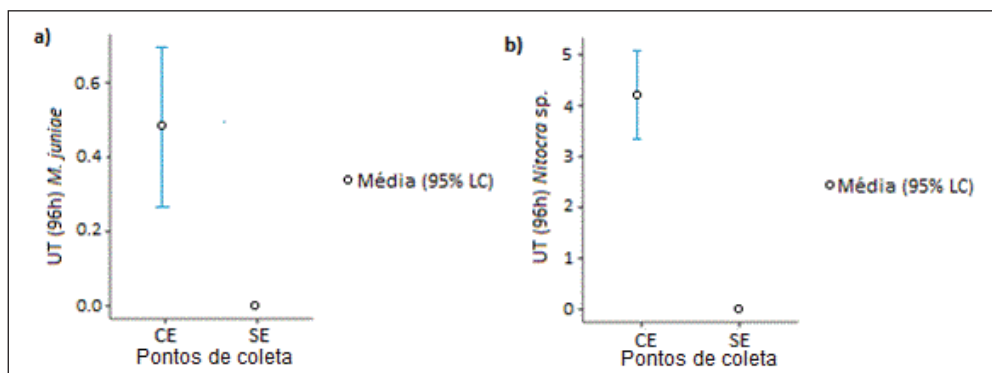
Os teores de óleos e graxas (OG) não apresentaram diferença significativa entre os pontos SE e CE, e a análise visual, recomendada pela resolução nº357 (CONAMA 2005), não indicou a presença de OG. Na região portuária do EJP, a cerca de 1,6 km a jusante do ponto CE, Souza e Neto (2019) determinaram em 2016, teores médios (n = 30) de OG de 1,81 e 0,98 mg L<sup>-1</sup>, cerca de 2 a 3 vezes inferiores aos determinados nos pontos de amostragem analisados neste trabalho.

### 3.3 Bioensaios ecotoxicológicos

Entre os pontos CE e SE foram determinadas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) para a toxicidade aguda expressa em unidades tóxicas (UT) para os dois organismos teste (Figura 3a e 3b). O efeito, expresso como coeficiente de Cohen d, foi de 1,82 UT para *M. juniae* e de 0,85

UT para *Nitocra sp.*

As amostras CE (ponto receptor de efluente sanitário tratado), causaram efeito letal (mortalidade) em ambos os organismos teste, com um padrão de resposta diferenciado: *Nitocra sp.* evidenciou menor sensibilidade do que *M. juniae* (Tabela 2).



**Figura 3.** Médias de Unidades tóxicas (UT) para *M. juniae* (a) e *Nitocra sp.* (b), considerando as amostras de água superficial do baixo estuário do Jundiá/ Potengi ( $n=18$ ), coletadas a montante da ETE (SE) e na zona de descarga do efluente tratado (CE) entre junho de 2015 e dezembro de 2016. Limite de confiança (LC) = 95 %.

**Tabela 2.** Efeito letal ( $CL_{50}$ -96h, %) de amostras de água superficial do baixo estuário Jundiá/ Potengi, coletadas na zona de descarga do efluente tratado (CE) em *Mysidopsis juniae* e *Nitocra sp.* e subletal (NOEC/ LOEC, %) em *Nitocra sp.*, durante o período amostral.

Ano	Mês	$CL_{50}$ -96h (%)		NOEC/ LOEC (%)
		<i>Mysidopsis juniae</i>	<i>Nitocra sp.</i>	<i>Nitocra sp.</i>
2015	jun	<12,50 <sup>(1)</sup>	50	25/50
	jul	NT	NT	NT
	ago	<12,50 <sup>(1)</sup>	85	06/12,5
	set	34,67	56	-
	out	NT	-	-
	nov	31,93	48	
2016	dez	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	25/50
	jan	82,92	NT	50/100
	fev	12,5	NT	NT
	mar	28,65	NT	NT
	mai	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	50/100
	jun	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	NT
	jul	NT	NT	NT
	ago	29,1	61	50/100
	set	39,08	NT	NT
	out	14,18	NT	NT
	nov	32,42	NT	NT
	dez	<12,50 <sup>(1)</sup>	NT	25/50

NT: Não tóxico

- Teste não realizado

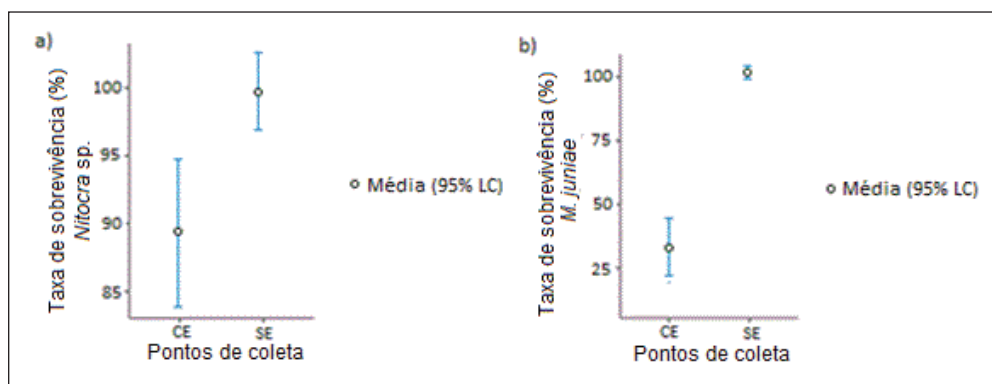
<sup>(1)</sup>  $CL_{50}$ -96h = < 12,5%, inferior à menor concentração testada

As amostras SE não causaram efeito letal nos organismos teste, exceto na amostra de janeiro de 2016; nesta amostra o número de *nauplii* de *Nitocra* sp. reduziu significativamente a partir da concentração 50% (LOEC = 50%), traduzindo-se em efeito subletal.

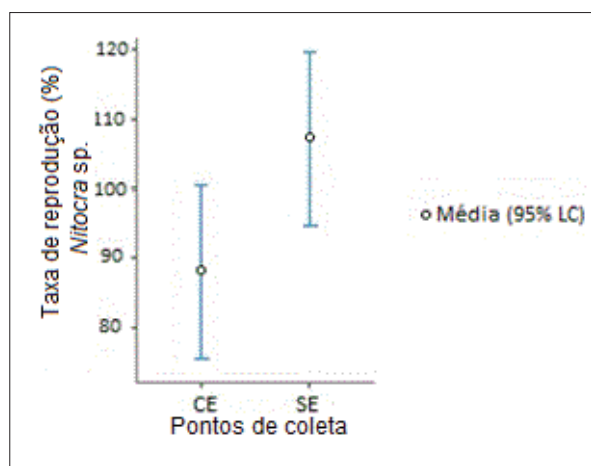
As taxas de sobrevivência de *M. juniae* e o *Nitocra* sp., também apresentaram diferenças significativas (Figura 4a e 4b); a taxa de sobrevivência média

de *Nitocra* sp. nas amostras CE foi de 89,4% e nas amostras SE de 99,5%. Para *M. juniae* a taxa de sobrevivência média foi de 33,5% e 102,3%, respectivamente nas amostras CE e SE.

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,03$ ) das médias da taxa de reprodução de *Nitocra* sp. (87,3% em CE e de 107,3% em SE) apontam para a influência negativa do efluente descartado em CE (Figura 5).



**Figura 4.** Taxas de sobrevivência média (%) de *Nitocra* sp. (a) e *M. juniae* (b) em amostras de água superficial do baixo estuário do Jundiá/ Potengi (n=18), coletadas a montante da ETE (SE) e na zona de descarga do efluente tratado (CE) entre junho de 2015 e dezembro de 2016. Limite de confiança (LC) = 95 %.



**Figura 5.** Taxa de reprodução média (%) de *Nitocra* sp. em amostras de água superficial do baixo estuário do Jundiá/ Potengi (n=17), coletadas a montante da ETE (SE) e na zona de descarga do efluente tratado (CE) entre junho de 2015 e dezembro de 2016. Limite de confiança (LC) = 95 %.

Não são muitos os estudos sobre a avaliação ecotoxicológica de águas superficiais de regiões estuarinas do Brasil (Araújo e Souza-Santos 2013; Nilin *et al.* 2019) e são ainda menos os realizados com águas superficiais do baixo EJP. Contudo

esta região é de extrema importância ambiental global e de subsistência para as populações ribeirinhas. Já se sabe que regiões que recebem efluentes sanitários e escoamentos da drenagem urbana convivem com o risco de ocorrência de



distúrbios bioquímicos e fisiológicos em sua biota (Silva e Abessa 2019). Gurgel *et al.* 2016 determinaram taxas de mortalidade de *M. juniae* seis vezes superiores às do grupo controle quando exposto a águas superficiais do rio Jundiaí, um afluente do EJP receptor de efluentes industriais. Ensaio ecotoxicológico com o sedimento do EJP, em pontos próximos da área estudada neste trabalho, relatam toxicidade aguda para *Tiburionella viscana* e *Leptocheirus plumulosus*, e crônica para *Nitocra* sp. e *Lytechinus variegatus* (Buruaem *et al.* 2013; Souza *et al.* 2016; Lopes *et al.* 2018). Mendonça *et al.* 2021 realizaram ensaios ecotoxicológicos com *Nitocra* sp. para avaliar a qualidade do sedimento do baixo EJP, e nenhuma das amostras coletadas nas quatro campanhas de amostragem foi tóxica para os organismos teste, apesar das amostras terem apresentado elevada contaminação por metais e matéria orgânica. Ainda no EJP há registro de contaminação de ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* por metais Cd, Cr, Zn, Cu, Pb e Ni (Senez-Mello *et al.* 2020).

Estudos próximos a áreas de descarga de efluentes domésticos realizados em sedimentos ou em águas intersticiais (Araujo *et al.* 2013; Camargo *et al.* 2015; Campos *et al.* 2016; Ferraz *et al.* 2017), identificaram através do método de avaliação da identificação da toxicidade (AIT) metais, compostos voláteis, compostos orgânicos, surfactantes e amônia, como responsáveis pelos efeitos causados nos organismos. As elevadas concentrações de amônia determinadas no ponto CE do baixo EJP podem ter contribuído para a toxicidade destas amostras manifestada pela menor taxa de reprodução dos organismos teste. O uso de espécies nativas é de suma importância em bioensaios para monitoramento ambiental, uma vez que como representantes da biota local geram dados mais realistas, permitindo uma melhor avaliação da qualidade ambiental (Stringer *et al.* 2014). Assim é possível estabelecer valores limite para poluentes individuais utilizando espécies teste brasileiras (Artal *et al.* 2019).

No Brasil, o copépode estuarino *Nitocra* sp. está bem estabelecido como organismo teste em bioensaios ecotoxicológicos com sedimentos, por ser de fácil manuseio; contudo ainda não está padronizado para testes de toxicidade pelas normas brasileiras (Silva *et al.* 2018; Artal *et al.* 2019) e a referida espécie ainda não foi determinada. As duas espécies presentes no Brasil usadas nestes ensaios ecotoxicológicos responderam de modo diferente às amostras ambientais (águas superficiais do baixo EJP). A menor sensibilidade

de *Nitocra* sp. avaliando a letalidade pode estar associada a uma maior tolerância deste organismo à amônia não ionizada, considerada por Ferraz *et al.* 2021, um parâmetro adequado para avaliar a toxicidade das fases líquida ou sólida de uma matriz sedimentar. A presença de amônia em ambientes estuarinos não degradados é natural, e resulta do processo de decomposição da vegetação de manguezal e da excreção dos animais, sendo estimada em 0,2 mg L<sup>-1</sup> (Braga *et al.* 2000). O efeito tóxico da N-NH<sub>3</sub> naturalmente presente no estuário é menor do que a quantidade presente em efluentes sanitários.

Maior resistência de copépodes bentônicos ao anti-incrustante tributilestano em relação à menor resistência de copépodes planctônicos foi relatada por Costa *et al.* (2014). Estes autores relacionaram a maior resistência de copépodes bentônicos a um sistema de desintoxicação mais eficiente, eventualmente devido ao distanciamento filogenético entre estas taxa de diferentes nichos ecológicos.

Entretanto, em ensaios com corantes orgânicos dispersos, *Nitocra* sp. se mostrou mais sensível que o anfípodo *Parhyale hawaiiensis*, o que não ocorreu quando exposto ao metal zinco, apesar do resultado ter sido considerado similarmente responsivo (Artal *et al.* 2019). Os bioensaios que analisam efeitos subletais são muito mais sensíveis do que os que analisam efeitos letais, indicados para ambientes em que é necessária a proteção ambiental máxima (Stringer *et al.* 2014). É por isso necessário cuidado ao utilizar apenas *Nitocra* sp. para avaliar ambientes estuarinos.

O uso de náuplios do copépode *Tisbe biminiensis* em testes letais em vez de fêmeas ovadas e/ ou a observação da taxa de reprodução se mostrou mais sensível do que organismos adultos (Lavorante *et al.* 2013; Souza-Santos *et al.* 2015; Régis *et al.* 2018). Assim em futuros trabalhos o uso de náuplios de *Nitocra* sp. em área estuarina deverá ser considerado. Ferraz *et al.* (2021) utilizaram náuplios de *Nitocra* sp. com o objetivo de avaliar a toxicidade da água dos poros de sedimentos estuarinos próximos a um sistema portuário, porém como não utilizaram fêmeas ovadas não é possível comparar a sensibilidade dos náuplios com a de organismos adultos.

Na mesma linha, vêm sendo publicados estudos (Nicodemo 2010; Vaz *et al.* 2013) relatando o sucesso e propondo métodos que utilizam *M. juniae* em testes crônicos. Este organismo é ideal para águas estuarinas com salinidade próxima a 35 ± 2 ‰, como é o caso do baixo EJP, pois as amostras não precisam de ser diluídas.

Já *Nitocra* sp. pode ser utilizado para analisar amostras entre 5 e 30 ‰, faixa de sobrevivência da espécie determinada por Lotufo e Abessa (2002). Dada a gama de concentração de sais em que *Nitocra* sp. sobrevive, é possível a análise de um maior número de amostras ao longo do corpo hídrico em direção à nascente sem haver necessidade de aumentar a salinidade das amostras. No entanto, o cultivo experimental de *Nitocra* sp. no ECOTOXLab-UFRN em salinidade de 22 e 30 ‰ não apresentou o mesmo sucesso reprodutivo quando comparados a 17 ‰, salinidade final adotada para manutenção do cultivo e realização dos testes.

#### 4. CONCLUSÕES

Os copépodes do gênero *Nitocra* encontrados no Brasil têm sido cultivados com sucesso para ensaios ecotoxicológicos de sedimentos e águas intersticiais. A sobrevivência destes organismos em águas de salinidade inferior à da água do mar (salinidade ótima 17‰; salinidade máxima 30), torna-os bons candidatos a bioensaios para avaliação de ambientes estuarinos. Neste trabalho, *Nitocra* sp. foi usado como organismo teste na análise ecotoxicológica de amostras de águas superficiais do EJP. A boa reprodutibilidade dos ensaios realizados com a substância de referência (dicromato de potássio) também salienta o seu potencial como organismo teste. Nos ensaios com água superficial estuarina *Nitocra* sp. foi menos sensível às amostras receptoras de efluente tratado (CE) do que *M. juniae*, ou seja, apresentou maior taxa de sobrevivência. Mas considerando a diminuição da taxa de eclosão de náuplios de *Nitocra* sp., estes organismos teste foram consideravelmente sensíveis, sugerindo a importância da sua utilização juntamente com outras espécies de organismos. O uso simultâneo de diferentes organismos teste corroborará a representatividade dos efeitos da poluição e seus potenciais impactos na biota da área em estudo. O estabelecimento desta espécie brasileira como organismo teste padronizado para ensaios ecotoxicológicos de amostras de águas estuarinas superficiais, necessita de mais estudos, incluindo o uso de náuplios de *Nitocra* sp. na avaliação de toxicidade aguda e a determinação da espécie que tem vindo a ser utilizada no Brasil.

#### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao professor Denis Abessa, da UNESP (Universidade de São Paulo) e colaborador pesquisador do Instituto de Pesquisa Oceanográfica (Universidade de São Paulo), pela doação dos organismos de *Nitocra* sp. Ao

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio ao projeto [430383/2018-5].

#### REFERÊNCIAS

[ABNT] Brazilian Association of Technical Standardization. 2011. NBR 15308: Aquatic Ecotoxicology: Acute Toxicity - Test Method with Mysids (Crustacea). Rio de Janeiro, Brasil.

[APHA] American Public Health Association. 2012. Standard methods for the examination of water . 21th Washington D.C. American Public Health Associations.

Araújo-Castro CMV, Souza-Santos LP, Torreiro AGG, Garcia KS. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. Braz. J. Oceanogr. 57(1):33-41.

Araújo GS, Moreira LB, Morais RD, Davanzo MB, Garcia TF, Cruz ACF, Abessa DMS. 2013. Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixová-Japuí State Park, SP, Brazil). Marine Pollution Bulletin. 75(1-2):62-68.

Araújo CFC, Souza-Santos LP. 2013. Use of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* to assess water toxicity in the Suape industrial-port complex of Pernambuco, Brazil. Ecotoxicology and Environmental Safety. (89):212-221.

Artal MC, Santos A, Dornelas LL, Vannuci-Silva M, Vacchi FI, Albuquerque AF, Lotufo GR, Umbuzeiro GDA. 2019. Toxicity responses for marine invertebrate species of Brazilian occurrence. Ecotoxicology and Environmental Contamination. 14(1):15-25.

Badaró-Pedroso CMV, Reynier, VA Prósperi. 2002. Testes de toxicidade aguda em misidáceos-ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea). In: Nascimento IA, Sousa ECPM, Nipper M, editores. Métodos de ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria Ltda. pp. 123-139.

Barletta M, Lima ARA, Costa MF. 2019. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. Science of the Total Environment. (651):1199-1218.

Bertoletti E, Zagatto P. 2006. Aplicações dos En-

saios Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In: Zaggato P, Bertolotti E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. Ed. Rima: São Paulo.

Braga ES, Bonetti CV, Burone L, Bonetti Filho J. 2000. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System–Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 40(2):165-173.

Buruaem LM, Araujo GS, Rosa PA, Nicodemo SC, Porto VF, Fonseca JR, Cruz JV, Medeiros GF, Abessa DMS. 2013. Assessment of sediment toxicity from the Areia Branca off-shore harbor and the Potengi river estuary (RN), northeastern Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 8(4):312-326.

Camargo JBDA, Cruz ACF, Campos BG, Araújo GS, Fonseca TG, Abessa DMS. 2015. Use, development and improvements in the protocol of whole-sediment toxicity identification evaluation using benthic copepods. *Mar Pollut Bull*. 91(2):511-517.

Campos BG, Cruz ACF, Buruaem LM, Rodrigues APC, Machado WTV, Abessa DMS. 2016. Using a tiered approach based on ecotoxicological techniques to assess the ecological risks of contamination in a subtropical estuarine protected area. *Sci Total Environ*. 544:564-573.

Capparelli MV., McNamara JC, Araujo GS, Cruz ACF, Abessa DMS. 2021. Use of an Integrated Geochemical and Ecotoxicological Approach to Evaluate Sediment Metal Contamination in Three Protected Estuarine Areas Along the Coast of São Paulo State, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*. 106(2):355-362.

Charry MP, Keesing V, Costello M, Tremblay LA. 2018. Assessment of the ecotoxicity of urban estuarine sediment using benthic and pelagic copepod bioassays. *PeerJ*. 6:e4936.

[CONAMA] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília: 2005 [Acessado em: 13 de agosto de 2021] Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>

[CONAMA] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Brasília: 2011 [Acessado em: 20 de agosto de 2021] Disponível em: [http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=627](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=627)

[CONAMA] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 454, de 01 de novembro de 2012. Brasília: 2012 [Acessado em: 20 de agosto de 2021] Disponível em: [http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=667](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=667)

Costa BVMD, Yogui GT, Souza-Santos LP. 2014. Acute toxicity of tributyltin on the marine copepod *Tisbe biminiensis*. *Brazilian Journal of Oceanography*. 62:65-69.

Dahms HU, Won EJ, Kim HS, Han J, Park HG, Souissi S, Raisuddin S, Lee JS. 2016. Potential of the small cyclopoid copepod *Paracyclopina nana* as an invertebrate model for ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*. 180:282-294.

Diz FR, Araújo CV, Moreno-Garrido I, Hampel M, Blasco J. 2009. Short-term toxicity tests on the harpacticoid copepod *Tisbe battagliai*: lethal and reproductive endpoints. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(7):1881-1886.

Ferraz MA, Alves AV, Cássia MC, Pusceddu FH, Gusso-Choueri PK, Santos AR, Choueri RB. 2017. Sediment toxicity identification evaluation (TIE phases I and II) based on microscale bioassays for diagnosing causes of toxicity in coastal areas affected by domestic sewage. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36(7):1820-1832.

Ferraz MA, Alves AV, Choueri RB. 2021. A TIE Approach to Identify Substances Causing Sediment Pore Water Toxicity After a Major Fire at Fuel Storage Tanks in the Port of Santos (SE, Brazil). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 107(1):62-68.

Gissi F, Binet MT, Adams MS. 2013. Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis*: Optimisation and application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 97:86-93.

Gurgel MP, Navoni JA, Ferreira DM, Amaral VS. 2016. Ecotoxicological water assessment of an estuarine river from the Brazilian Northeast, potentially affected by industrial wastewater discharge. *Sci Total Environ*. 572:324-332.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*. 11(7):714-719.



- Kalloul S, Hamid W, Maanan M, Robin M, Sayouty EH, Zourarah B. 2012. Source contributions to heavy metal fluxes into the Loukous Estuary (Moroccan Atlantic Coast). *Journal of Coastal Research*. 28(1):174-183.
- Koch J, De Schamphelaere KA. 2021. Making Sense of Life-History Effects of the Antidepressant Citalopram in the Copepod *Nitocra spinipes* Using a Bioenergetics Model. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 40(7):1926-1937.
- Krull M, Abessa DM, Hatje V, Barros F. 2014. Integrated assessment of metal contamination in sediments from two tropical estuaries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106:195-203.
- Kusk KO, Petersen S. 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 16(8):1629-1633.
- Kwok KW, Souissi S, Dur G, Won EJ, Lee JS. 2015. Copepods as reference species in estuarine and marine waters. In *Aquatic Ecotoxicology*. Academic Press. 281-308.
- Lavorante BR, Oliveira DD, Costa BV, Souza-Santos LP. 2013. A new protocol for ecotoxicological assessment of seawater using nauplii of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 95:52-59.
- Lopes RB, Souza RF, Silva-Nicodemo SCT, Cruz JVF, Medeiros GF. 2018. Ecotoxicology of sediment in the estuary of the Jundiaí and Potengi Rivers in Natal-RN, Brazil, by using *Leptocheirus plumulosus* as test-organism. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 13(2):77-84.
- Lotufo GR, Abessa DMS. 2002. Testes de toxicidade com sedimentos total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento IA, Sousa ECPM, Nipper MG. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Artes Gráficas e Indústria Ltda: São Paulo. 151-162.
- Marins RV, Paula Filho FJD, Rocha CAS. 2007. Geoquímica de fósforo como indicadora da qualidade ambiental e dos processos estuarinos do Rio Jaguaribe-costa nordeste oriental brasileira. *Química Nova*. 30(5):1208-1214.
- Martins SE, Bianchini A. 2011. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *Journal of Environmental Monitoring*. 13(7):1866-1875.
- Matos MPD, Borges AC, Matos ATD, Silva EFD, Martinez MA. 2017. Modelagem da progressão da DBO obtida na incubação de esgoto doméstico sob diferentes temperaturas. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 22:821-828.
- Mendonça JMS, Souza IS, de Medeiros GF, Mina IMCAP. 2021. Geochemical and ecotoxicological evaluation of sediments of a semiarid estuary on the northeast of Brazil (Natal / RN). *Reg Stud Mar Sci*. 43.
- Miyashita LK, Calliari D. 2016. Distribution and salinity tolerance of marine mysids from a subtropical estuary, Brazil. *Marine Biology Research*. 12(2):133-145.
- Moeris S, Vanryckeghem F, Demeestere K, Schamphelaere KA. 2021. A margin of safety approach for the assessment of environmentally realistic chemical mixtures in the marine environment based on combined passive sampling and ecotoxicity testing. *Science of The Total Environment*. 765:142748.
- Munna GM, Chowdhury MMI, Ahmed AM, Chowdhury S, Alom MM. 2013. A Canadian water quality guideline-water quality index (CCME-WQI) based assessment study of water quality in Surma River. *Journal of Civil Engineering and Construction Technology*. 4(3):81-89.
- Nicodemo SCT. 2010. Diagnóstico ecotoxicológico dos efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiaí/Potengi, Natal/RN [Master's thesis] Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Nilin J, Moreira LB, Aguiar JE, Marins R, Abessa DMS, Lotufo TMC, Costa-Lotufo LV. 2013. Sediment quality assessment in a tropical estuary: the case of Ceará River, Northeastern Brazil. *Marine Environmental Research*. 91:89-96.
- Nilin J, Santos AAO, Nascimento MKS. 2019. Ecotoxicology assay for the evaluation of environmental water quality in a tropical urban estuary. *An Acad Bras Cienc*. 91(1): e20180232.
- Oliveira DD, Souza-Santos LP, Silva HKP, Macedo SJ. 2014. Toxicity of sediments from a mangro-



ve forest patch in an urban area in Pernambuco (Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104:373-378.

Palma Lopes LF, Agostini VO, Guimarães SS, Muxagata E. 2018. Evaluation of the effect of antimicrobials in marine cultures, using the copepod *Acartia tonsa* as a bioindicator. *Chemistry and Ecology*. 34(8):747-761.

Pereira TDS, Moreira IT, Oliveira OM, Rios MC, Filho ACSW, Almeida M, Carvalho GC. 2015. Distribution and ecotoxicology of bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. *Mar Pollut Bull*. 99(1-2):166-177.

Pimentel MF, Damasceno ÉP, Jimenez PC, Araújo PFR, Bezerra MF, Morais PCV, Cavalcante RM, Loureiro S, Lotufo LVC. 2016. Endocrine disruption in *Sphoeroides testudineus* tissues and sediments highlights contamination in a northeastern Brazilian estuary. *Environ Monit Assess*. 188(5):298.

Régis CG, Souza-Santos LP, Yogui GT, Moraes AS, Schettini CAF. 2018. Use of *Tisbe biminiensis* nauplii in ecotoxicological tests and geochemical analyses to assess the sediment quality of a tropical urban estuary in northeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 137:45-55.

Resgalla C, Silveira R, Vieira D, 2021. Acute Toxicity Assay Using Mysid as an Alternative Test Organism in the Assessment of the Aqueous Fraction of Sediment. *Ecotoxicology*. 30:2036-2042.

Senez-Mello TM, Crapez MAC, Ramos e Silva CA, Silva ET, Fonseca EM. 2020. Heavy metals bioconcentration in *Crassostrea rhizophorae*: A site-to-site transplant experiment at the Potengi estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Sci Rep*. 10246. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57152-w>

Silva ACM, Guimarães SS, Oliveira OMCD, Moreira ITA, Trigüis JA, Cruz MJM. 2018. Sensibilidade do copépode *Nitokra* sp. à exposição ao agregado óleo-material particulado em suspensão (OSA). *Geochimica Brasiliensis*. 32(1):47-61.

Silva AQ, Souza Abessa DM. 2019. Toxicity of three emerging contaminants to non-target marine organisms. *Environ Sci Pollut Res*. 26(18):18354-18364.

Simpson SL, Spadaro DA. 2011. Performance and sensitivity of rapid sublethal sediment toxicity tests

with the amphipod *Melita plumulosa* and copepod *Nitokra spinipes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(10):2326-2334.

Souza VM, Lazaro LM, Silva FS, Figueiredo Jr AG, Vital H, Frazão E. 2010. Benthic foraminifera and bacterial activity as a proxy for environmental characterization in Potengi Estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Anuário do Instituto de Geociências*. 33(1):20-34.

Souza JR, Neto MTC. 2019. Espacialização das manchas de óleo e graxa na zona portuária de Natal-RN através de técnicas de interpolação IDW e Krigagem. *Holos*. 8:1-14.

Souza IS, Araujo GS, Cruz ACF, Fonseca TGG, Camargo JBDA, Medeiros GF, Abessa DMS. 2016. Using an integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar Pollut Bull*. 104(1-2):70-82.

Souza-Santos LP, Oliveira DD, Lima ES. 2015. The use of epibenthic copepod *Tisbe biminiensis* nauplii to assess the toxicity of seawater samples in Suape Bay (state of Pernambuco; Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 10(1):61-69.

Stringer TJ, Glover CN, Keesing V, Northcott GL, Gaw S, Tremblay LA. 2014. Development of acute and chronic sediment bioassays with the harpacticoid copepod *Quinquelaophonte* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 99:82-91.

Vaz C, Kleine T, Tortelli TS, Böhm RFS, Spitzner EC, Gonçalves RA, Barros VG, Simm M, Oliveira TMN, Matias WG. 2013. Assessment of chronic toxicity in water samples from the Babitonga bay-south of Brazil-using transgenerational testing with *Mysidopsis juniae*. *Fresen Environ Bull*. 22(7):1967-1976.

Wong SW, Zhou GJ, Leung PT, Han J, Lee JS, Kwok KW, Leung KM. 2020. Sunscreens containing zinc oxide nanoparticles can trigger oxidative stress and toxicity to the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Pollution Bulletin*. 154:111078.

Yu J, Tian JY, Xu R, Zhang ZY, Yang GP, Wang XD, Lai JG, Chen R. 2020. Effects of microplastics exposure on ingestion, fecundity, development, and dimethylsulfide production in *Tigriopus japonicus* (Harpacticoida, copepod). *Environmental Pollution*. 267:115429.

Zagatto PA, Bertoletti E. 2008. Aquatic Ecotoxicology: Principles and Applications. RiMa: São Carlos-Brasil.

Zaroni LP, Lotufo G, Gasparro MR, Souza ECPM. 2012. O copépodo *Nitocra* sp. como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos marinhos e estuarinos. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia.