

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

KÉSSIA MARÇAL DE LORENA

Avaliação da toxicidade de metais nos traços funcionais e comportamentais da
espécie *Hyalella meinerti* (Crustacea, Amphipoda)

São Carlos

2024

KÉSSIA MARÇAL DE LORENA

Avaliação da toxicidade de metais nos traços funcionais e comportamentais da
espécie *Hyalella meinerti* (Crustacea, Amphipoda)

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Ambiental, da Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Aparecida
Moreira

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE
ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M868 Lorea	Marçal de Lorena, Késsia Avaliação da toxicidade de metais nos traços funcionais e comportamentais da espécie <i>Hyaletella meinerti</i> (Crustacea, Amphipoda) / Késsia Marçal de Lorena; orientadora Raquel Aparecida Moreira; coorientador Thandy Júnio da Silva Pinto . São Carlos, 2024. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2024. 1. análise comportamental. 2. ecotoxicologia. 3. <i>Hyaletella meinerti</i> . 4. metais. 5. taxa de alimentação . I. Título.
---------------	--

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Késsia Marçal de Lorena**

Data da Defesa: 07/06/2024

Comissão Julgadora:

Resultado:

Raquel Aparecida Moreira (Orientador(a))

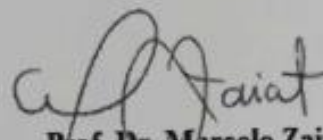
Aprovada

Thandy Júnio da Silva Pinto

Aprovada

Diego Ferreira

Aprovada


Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091 - Trabalho de Graduação

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Raquel Aparecida Moreira, que me apoiou e orientou em todas as etapas de elaboração deste trabalho, e contribuiu para que essa jornada fosse acolhedora e enriquecedora para o meu crescimento científico.

Também agradeço ao Dr. Thandy Júnio da Silva Pinto que, ao lado da Raquel, me instruiu durante todo o desenvolvimento do projeto.

Ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado ao longo de toda a graduação, também à minha família que viabilizou essa conquista em minha vida. E agradeço imensamente à Deus por me proporcionar vida, saúde e sabedoria.

Agradeço ainda à Vanessa Borges da Costa que teve uma contribuição fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente no quesito das atividades laboratoriais.

Por fim, e não menos importante, agradeço ao professor Evaldo Espíndola por disponibilizar seu laboratório para os experimentos, e toda equipe NEEA – Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos. E também ao PUB – Programa Unificado de Bolsas que apoiou financeiramente a condução deste estudo.

RESUMO

A compreensão da intensidade e dimensão dos efeitos das atividades antrópicas sobre comunidades biológicas, principalmente para regiões tropicais, é amplamente discutida na atualidade. Os metais potencialmente tóxicos estão cada vez mais recorrentes nos ecossistemas aquáticos brasileiros e podem constituir alta toxicidade para diferentes indivíduos, populações e comunidades, o que, por conseguinte, afeta o funcionamento ecossistêmico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos na sobrevivência, comportamento de nado, alimentação, excreção e assimilação da espécie neotropical, o anfípode *Hyaella meinerti*, após exposição aos metais cádmio, cromo e chumbo. Para isso, testes de toxicidade com a espécie foram executados com três concentrações ambientalmente relevantes. Além disso, o nado dos organismos expostos foi filmado e analisado no programa Kinovea, sendo avaliada a velocidade máxima atingida e distância percorrida pelos organismos. Usando ainda o mesmo programa, o tamanho corporal dos indivíduos foi mensurado para viabilizar os cálculos das taxas de alimentação e excreção. A atividade natatória, bem como as taxas de alimentação, excreção e assimilação dos indivíduos expostos aos estressores foram comparadas com os padrões observados em organismos mantidos em água não contaminada (controle), por meio do modelo linear generalizado. Como resultados, a análise de sobrevivência identificou que o cádmio possui alto potencial de impacto à espécie, já que causou mortalidade de praticamente todos os indivíduos, inviabilizando o desenvolvimento das demais análises para este metal. Em termos de comportamento, foi possível identificar algumas alterações da velocidade percorrida, sendo reduzida na maior concentração de cromo e concentração intermediária de chumbo, para as fêmeas, e aumentada na maior e menor concentração de chumbo para os machos; ao passo que a distância percorrida sofreu apenas uma redução na maior concentração de chumbo entre os machos. Já com relação à taxa de alimentação, houve reduções nas duas maiores concentrações de chumbo para as fêmeas. Para a taxa de excreção não foi observada nenhuma variação significativa. E a taxa de assimilação apresentou apenas uma redução na concentração intermediária de chumbo. Por fim, a necessidade de fomentar estudos ecotoxicológicos, que compreendam cada vez mais os efeitos de contaminantes no meio aquático, é ressaltada, especialmente sobre efeitos comportamentais como abordado no presente estudo, já que os mesmos ainda são incipientes na literatura.

Palavras-chave: Análise comportamental, Ecotoxicologia, *Hyaella meinerti*, metais, taxa de alimentação.

ABSTRACT

Understanding the intensity and scale of the effects of anthropogenic activities on biological communities, especially in tropical regions, is widely discussed today. Potentially toxic metals are increasingly recurring in Brazilian aquatic ecosystems and can be highly toxic to different individuals, populations and communities, which consequently affects ecosystem functioning. The aim of this study was to investigate the effects on survival, swimming behavior, feeding, excretion and assimilation of the neotropical amphipod *Hyalella meinerti* after exposure to the metals cadmium, chromium and lead. To this end, toxicity tests were carried out on the species using three environmentally relevant concentrations. In addition, the swimming of the exposed organisms was filmed and analyzed using the Kinovea program, evaluating the maximum speed reached and the distance covered by the organisms. Using the same program, the body size of the individuals was measured in order to calculate feeding and excretion rates. The swimming activity, as well as the feeding, excretion and assimilation rates of the individuals exposed to the stressors were compared with the patterns observed in organisms kept in uncontaminated water (control), using the generalized linear model. As a result, the survival analysis identified that cadmium has a high potential impact on the species, since it caused the mortality of practically all the individuals, making it impossible to carry out the other analyses for this metal. In terms of behavior, it was possible to identify some changes in the speed traveled, which was reduced at the highest concentration of chromium and intermediate concentration of lead for females, and increased at the highest and lowest concentrations of lead for males; while the distance traveled was only reduced at the highest concentration of lead among males. With regard to feeding rate, there were reductions in the two highest lead concentrations for females. There was no significant variation in the excretion rate. And the assimilation rate only showed a reduction at intermediate lead concentrations. Finally, the need to promote ecotoxicological studies, which increasingly understand the effects of contaminants in the aquatic environment, is highlighted, especially on behavioral effects as addressed in this study, since they are still incipient in the literature.

Keywords: Ecotoxicology, feeding rate, *Hyalella meinerti*, metals, swimming behavior.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
3. MÉTODOS	11
3.1 <i>Organismos teste</i>	11
3.2 <i>Químicos e preparo de soluções</i>	12
3.3 <i>Sobrevivência</i>	13
3.4 <i>Análise taxas de alimentação e excreção</i>	13
3.4.1 <i>Modelo Matemático</i>	14
3.5 <i>Análise comportamental</i>	15
3.6 <i>Análise de dados</i>	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 <i>Análises Químicas</i>	16
4.2 <i>Sobrevivência</i>	17
4.3 <i>Análise comportamental e taxas de alimentação, excreção e assimilação</i>	18
4.3.1 <i>Machos</i>	18
4.3.2 <i>Fêmeas</i>	25
5. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	36
ANEXO 1	41
ANEXO 2	49

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de toda a história, a espécie que mais impacta o planeta é o ser humano, alterando ecossistemas em diversas escalas. Paisagens naturais dão, cada vez mais, lugar a diferentes usos voltados à geração de lucro e desenvolvimento tecnológico desenfreado (SILVA et al., 2019). A expansão urbana, por exemplo, é acompanhada do aumento da poluição ambiental. E assim, as cidades geram cada vez mais resíduos, principalmente resíduos que levam muito tempo para serem degradados pelo meio ambiente. Dessa forma, esses resíduos se depositam em diferentes ecossistemas, como rios, lagos, solos, afetando tanto a fauna, quanto a flora (VIANNA, 2015).

Ademais, é de conhecimento geral que a água é um recurso indispensável para a vida na terra, sendo requerida em diferentes tipos de uso, como irrigação, abastecimento público, atividades industriais, geração de energia, extração mineral, turismo, lazer, além de garantir a manutenção dos ecossistemas naturais. Sendo assim, é urgente mensurar seus usos de forma racional (SILVA et al., 2019). Vale citar ainda, que as fontes poluidoras da água, podem contribuir com diferentes contaminantes como metais potencialmente tóxicos, que possuem capacidade de gerar distúrbios em um ecossistema estabelecido (FREIRE et al., 2008; VIANNA, 2015). Tratando dos metais pesados, ou metais potencialmente tóxicos, assim classificados dessa forma por possuírem densidade maior que 5 g/cm^3 , são definidos como elementos não biodegradáveis e persistentes, possuindo significativa capacidade tóxica no ecossistema aquático e de bioacumulação nos indivíduos (DE CASTRO, 2006; VIRGA et al., 2007).

Exemplificando fontes poluidoras, as indústrias siderúrgicas, são dispersoras de numerosos contaminantes, como material particulado (MP), gás e vapor. Sendo que, a maioria dos resíduos de MP dessas indústrias contém ferro, pó de carbono e silício (YAN et al., 2010) e elementos menores como chumbo, alumínio, zinco, manganês, cromo, cádmio, cobre, entre outros metais (LIMA et al., 2001). Além disso, é importante destacar, que dentre as diversas substâncias químicas que afetam os organismos de água doce, como os metais têm efeitos particularmente graves sobre a biota aquática, devido as elevadas concentrações que têm ocorrido (VIANNA, 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016; TANG et al., 2021; GOMES et al., 2024).

Há ainda, dentro do contexto da agricultura alguns fatores que merecem atenção, o uso de fertilizantes químicos e lodo de esgoto. Estudos anteriores mostraram efetiva disponibilização dos metais avaliados no presente trabalho, Cd, Cr e Pb, por meio da aplicação

de fertilizantes com micronutrientes (NAVA et al, 2011). Já com relação ao lodo de esgoto, aplicado no solo para manutenção da fertilidade por conter matéria orgânica e nutrientes que exercem importante papel na produção agrícola, registros mostram que sua aplicação eleva os teores de Pb no solo (NASCIMENTO, 2014).

Atualmente, diferentes estudos apontam para prejuízos à atividade alimentar, ao crescimento e reprodução de diferentes espécies, por conta da exposição aos metais, alterando assim, não só comportamento, mas também traços funcionais de organismos aquáticos (DE CASTRO, 2006; SOUZA et al., 2018). Além disso, metais possuem um agravante, a bioacumulação, que ocorre através da ingestão e contato com sedimento e/ou água contaminados, implicando na permanência dos metais, em especial, nos tecidos vivos dos organismos (DUFFUS, 2002).

Diferentes estudos de monitoramento no país têm demonstrado a recorrência de diversos de metais na água e sedimento acima dos padrões de base, principalmente o cádmio, cromo e chumbo. O primeiro, cádmio (Cd) tem grande relevância na indústria de baterias tintas, baterias, entre outras, mas, para os seres vivos, mesmo em baixas dosagens, pode gerar complicações, por conta de sua toxicidade (FROIS et al., 2020). O segundo, chumbo (Pb), após o início da industrialização, teve um aumento de sua presença nos ecossistemas, incluindo pela mineração, e uso de agrotóxicos. Por fim, o cromo (Cr), cuja forma metálica não é encontrada livre na natureza, mas obtida após o processamento industrial do minério, é usado na fabricação de ligas metálicas e estruturas da construção civil, enquanto seus compostos podem ser utilizados no tratamento de couro (curtume), fabricação de tintas e pigmentos, entre outros (CETESB, 2017). Porém o Cr também possui efeitos tóxicos, dependendo do seu estado de oxidação e concentração (MATAVELI et al., 2018).

Diante do apresentado, para monitorar os impactos citados, a Ecotoxicologia pode ser utilizada como uma importante ferramenta de avaliação. Por meio do biomonitoramento é possível avaliar o grau de contaminação bem como suas implicações fisiológicas e comportamentais para diferentes organismos, denominados como bioindicadores (EINHEUSER et al., 2012). Isso se deve ao fato de que as comunidades biológicas fornecem resultados que refletem as condições do local, sendo uma ótima ferramenta para compreender a influência desses eventos no ambiente, na biota, e também na tomada de decisões mais adequadas na recuperação e cuidado dessas áreas contaminadas (MONSERRAT et al., 2007).

No Brasil, assim como em outros países da América do Sul, possuem significativa distribuição da espécie *Hyaella meinerti* (Crustacea: Amphipoda) (GIUSTO; FERRARI, 2014). Ela já foi aplicada com êxito como modelo biológico em Ecotoxicologia, permitindo

explorar, dentre outros fatores, a variação de impacto entre machos e fêmeas, por meio de contaminantes variados (PINTO et al., 2021a; Pinto, et al, 2021b). Além disso, a *H. meinerti* possui norma padronizada que especifica os métodos de ensaio para algumas análises de ecotoxicológicas, como a ABNT N.B.R. 15470, 2013. Portanto, o uso desse organismo constitui uma boa orientação para realização de novos testes de toxicidade e melhorar a compreensão dos impactos de contaminantes nos ecossistemas aquáticos.

2. OBJETIVOS

O presente estudo visou avaliar a sobrevivência, o comportamento de natação (velocidade máxima e distância percorrida), alimentação, excreção e também assimilação da espécie de anfípoda *Hyaella meinerti*, sob efeito dos metais cádmio, cromo e chumbo. Objetivou-se também discutir as implicações ecológicas para o ambiente aquático, associadas aos efeitos desses metais.

3. MÉTODOS

De forma geral, os testes foram realizados separadamente para machos e fêmeas. Para isso, os organismos foram colocados individualmente em copos plásticos atóxicos com 50 mL de solução-teste, sendo utilizadas três concentrações por metal além do controle, conforme tabela a seguir. Cada tratamento continha cinco réplicas por concentração para cada macho e fêmea.

Tabela 1: Concentrações das soluções nas réplicas para *Hyalella meinerti*.

Metal	Concentração 1 [mg/L]	Concentração 2 [mg/L]	Concentração 3 [mg/L]
Cádmio	0,01	0,1	0,2
Cromo	0,05	0,15	0,5
Chumbo	0,03	0,2	0,5

Fonte: Autoria própria, 2024.

3.1 Organismos-teste

Hyalella meinerti é uma espécie de anfípoda geralmente encontrada no Brasil e pertencente ao gênero *Hyalella* utilizado com sucesso em estudos toxicológicos (PINTO, 2021). A espécie foi capturada por meio de uma rede manual (tamanho da malha: 210 µm) em tanques de cultivo ao ar livre (500L) contendo areia como sedimento e folhas em decomposição (de vegetação nativa), na sede experimental do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), estado de São Paulo. Os organismos foram transportados para o Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) do Cento de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) (22°01' 22" S, 43°57' 38" W, a 20 km da UFSCar) em sacos plásticos (10 L) e posteriormente aclimatados, em bandejas de plástico contendo água e folhas em decomposição coletadas dos tanques, durante uma semana. Na figura a seguir, pode-se observar a espécie em questão:

Figura 1: *Hyalella meinerti* macho.



Fonte: Pinto, TJS (2024).

Os anfípodos foram mantidos a 25 °C (± 1 °C) e um regime de luz de 12h:12h (claro: escuro), e a água dos tanques de cultura foi gradualmente substituída por água reconstituída preparada de acordo com a ABNT NBR 15470 (2013). Após o período de aclimação, os adultos (tamanho médio $\pm$ DP: $5 \pm 0,5$ mm) foram divididos por sexo de acordo com a presença de um segundo gnatópode direito nos machos (Strong, 1973). Posteriormente, machos e fêmeas foram mantidos separadamente por duas semanas em aquários de vidro contendo 4 L de água reconstituída, folhas em decomposição e as macrófitas aquáticas *Myriophyllum aquaticum* e *Egeria densa*. A água foi substituída semanalmente e os organismos foram alimentados diariamente (0,025 mL/organismo) com alimento composto feito de ração para peixes Tetramin® e levedura biológica (ABNT NBR 15470, 2013).

3.2 Químicos e preparo de soluções

A partir das concentrações ambientais relatadas em ambientes de água doce no Brasil, com resultados chegando a 0,18 mg L⁻¹ para Cd; 0,89 mg L⁻¹ para Cr e 0,83 mg L⁻¹ para Pb, foram escolhidas as maiores concentrações para os testes (DA COSTA, 2023). Tais ambientes são antropizados, logo as maiores concentrações escolhidas representam condições realistas, provenientes da contaminação dos corpos d'água. Já com relação a menor concentração testada, ela tem como base os limites estabelecidos pela resolução CONAMA 357 (2005), levando em conta águas de classe III, no contexto de pior cenário permitido, sendo elas 0,01 mg L⁻¹ para Cd; 0,05 mg L⁻¹ para Cr e 0,033 mg L⁻¹ para Pb.

Assim, foram testadas três diferentes concentrações nominais de Cd (0,01; 0,1 e 0,2 mg L⁻¹), Cr (0,05; 0,15 e 0,5 mg L⁻¹) e Pb (0,03; 0,2 e 0,5 mg L⁻¹). Para isso, o preparo das soluções foi dado a partir da diluição de uma solução-estoque em água de cultivo, seguindo as características mencionadas anteriormente. Os compostos químicos Cloreto de Cádmio

(CdCl₂.5H₂O), Nitrato de Chumbo (Pb(NO₃)₂) e Cloreto de Cromo (CrCl₃.6H₂O) foram empregados para produzir as soluções principais (40,62 mg L⁻¹ para Cd, 31,97 mg L⁻¹ para Cr e 88,82 mg L⁻¹ para Pb), utilizando água ultrapura (Milli-Q®). Desse modo, neste estudo, os cátions Cd II, Pb II e Cr III foram examinados. No início dos testes, amostras das soluções-estoque e suas diluições foram retiradas e acidificadas para análises químicas posteriores.

3.3 Sobrevivência

A avaliação da sobrevivência frente à exposição a metais foi conduzida abrangendo todos os metais testados, onde se observou os efeitos de mortalidade em cada réplica tanto para machos quanto para fêmeas. Nesse contexto, foram identificadas e analisadas as concentrações nas quais os organismos sobreviveram, fornecendo informações relevantes sobre a tolerância desses organismos aos diferentes metais estudados.

3.4 Análise taxas de alimentação e excreção

Para determinar a taxa de alimentação, foi disponibilizado como alimento, folhas da macrófita *Egeria densa*, previamente secas em estufa (40 °C por 48h). A princípio, três folhas foram colocadas em cada recipiente, e o peso do alimento foi registrado antes da disponibilização. Durante o decorrer do experimento, se o alimento fosse completamente consumido, novas folhas eram pesadas e fornecidas.

O primeiro passo, foi fotografar os indivíduos juntamente com um papel milimetrado para determinação do tamanho corporal, a partir daí, prosseguiram-se as atividades deste trabalho, medindo no software Kinovea (<https://www.kinovea.org/>) a partir do contorno da linha dorsal entre a base da primeira antena até a base do último urópode. Essa media, foi usada na obtenção da biomassa seca, conforme cálculo descrito por PINTO et al. (2021b). Repetições adicionais sem *H. meinerti* (brancos) foram utilizadas para avaliar as perdas de massa foliar por decomposição microbiana, manuseio ou interferências abióticas. Ao fim do experimento (7 dias), as sobras de material vegetal (alimento), assim como as folhas nos brancos, foram removidas dos recipientes teste, secos em estufa (40 °C por 48h) e pesadas (0,00001g), para determinação da taxa de alimentação, cujo modelo matemático será descrito posteriormente.

A quantidade de fezes ao longo do estudo também foi monitorada. Para isso, foram utilizados filtros de fibra de celulose previamente desidratados em uma estufa e pesados. Após remover os resíduos das folhas, todo o conteúdo dos recipientes foi passado pelo filtro. Os

filtros foram novamente desidratados e pesados para calcular a massa de excrementos gerada. Os grupos de controle, mencionados anteriormente, consistiram apenas em água de cultivo filtrada e foram examinados simultaneamente com as amostras experimentais. As amostras contendo organismos sem vida foram excluídas das análises.

3.4.1 Modelo Matemático

Para os experimentos com a espécie *H. meinerti*, as taxas de alimentação (TA) foram expressas como a massa de folha consumida por peso seco de *H. meinerti* por dia (mg alimento $\text{mg organismo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), e calculadas de acordo com as equações descritas em MALTBY et al. (2002) e ZUBROD et al. (2010):

$$Ta = (Bmi * P) - Bmf / Borg * t$$

Onde:

Bmi = biomassa seca inicial de folhas (mg);

Bmf = biomassa seca final de folhas (mg);

P = coeficiente de perda de folhas por decomposição microbiana, manuseio ou interferências abióticas;

Borg = biomassa seca de *H. meinerti* (mg);

t = tempo de alimentação (experimento) em dias.

Já a produção absoluta de fezes (Fa) foi expressa em mg de fezes produzidas por organismo por dia (mg fezes $\text{organismo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) descrita em BAUDY et al., (2017):

$$Fa = (F2 - F1 - Fn) / Borg * t$$

Onde:

F2 = peso seco final do filtro;

F1 = peso seco inicial do filtro;

Fn = aumento médio no peso seco dos filtros por manuseio e composição microbiana (branco);

Borg = biomassa seca de *H. meinerti* (mg);

t = tempo em dias.

Por fim, a assimilação (A) foi calculada como a diferença entre a quantidade de alimento ingerida e de fezes produzida, expressa em mg de alimento assimilado por organismo por dia (mg de alimento assimilado $\text{organismo}^{-1} \text{ dia}^{-1}$):

$$A = Ta - Fa$$

3.5 Análise comportamental

O comportamento de nado, velocidade máxima e distância percorrida, da espécie também foi determinado separando machos e fêmeas, ao encerramento do experimento (7 dias). Dessa forma, foi levantada uma amostra de oito réplicas para cada concentração, entretanto, para critérios de comparação de resultados com a análise de assimilação, padronizou-se a quantidade de amostras, reduzindo para cinco.

Então, os indivíduos que sobreviveram foram inseridos, um a um, em uma placa de Petri (12 cm de diâmetro) contendo água de cultivo, sendo aclimatados por um minuto, para evitar respostas iniciais por estresse. Então, a natação foi registrada por 60 segundos, com objetivo de mensurar a velocidade máxima de natação (cm/s) e a distância percorrida (cm). Para simular o ataque de um predador, os organismos eram tocados com uma pipeta Pasteur, sempre ao iniciar a gravação e após 30 segundos. Por fim, os vídeos foram analisados também pelo software Kinovea, calibrado para o tamanho da placa de Petri ou copo.

Aqui, vale notar que o programa foi originalmente desenvolvido para análise de vídeos de práticas esportivas e permite diversas análises de movimento, tal como acompanhamento da trajetória de pontos, velocidade de deslocamento, distância percorrida por um ponto e angulação dos movimentos. Assim, no programa, os organismos foram marcados como um ponto e a trajetória percorrida por eles ao longo do período determinado.

3.6 Análise de dados

Todas as análises dos quatro parâmetros: comportamento, taxas de alimentação, excreção e assimilação, foram primeiramente tabeladas e tratadas por meio do software R e RStudio, sendo comparadas com as respostas do grupo controle por meio do modelo linear generalizado (ou GLM). O intervalo de confiança utilizado foi de 95% ($p < 0,05$), ou seja, levantou-se os resultados que apontaram diferença com relação ao controle, indicada quando $p < 0,05$, e aqueles que não apresentaram diferença significativa, ou seja, $p > 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Químicas

Os organismos preservados ao fim do experimento foram secos em estufa (40 °C), até peso constante, para determinação da biomassa seca (balança Mettler, modelo AE240, erro 0,01 mg). A extração química dos metais foi feita por digestão ácida, pela adição de 5 mL de uma mistura de HNO₃: H₂O₂ (2:1 - v:v) em tubos de vidro contendo o pool de organismos secos. Os tubos foram mantidos em banho maria (80°C) por 4h, até todo o material ser digerido e a solução se tornar transparente, quando o volume da amostra foi completado para 10 mL com HNO₃ (2 M). Um branco analítico foi processado em conjunto, incluindo a mistura de ácido e peróxido, porém com organismos ausentes (AFRIDI et al., 2006).

As amostras de solução-teste e estoque, separadas e preservadas no início dos experimentos, foram preparadas para análise química por digestão ácida. Para isso, foi adicionado 5 mL de HNO₃ em 100 mL das amostras, que foram aquecidas a 90 °C em um sistema de circulação, consistindo em recipientes de vidro de 250 mL contendo pérolas de vidro cobertos por vidro de relógio, até evaporação de 80% do conteúdo. Um branco analítico foi rodado em condições iguais, entretanto contendo água ultrapura (miliQ). Depois, as amostras digeridas foram novamente completadas para 100 mL com ácido nítrico (2 M). As concentrações dos metais nas amostras digeridas de conteúdo corporal e das soluções teste foram quantificadas utilizando espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas (MP-AES 4200, Agilent 20 Technologies). As curvas de calibração foram feitas utilizando soluções padrão multielementares (Agilent Technologies®). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada elemento foram definidos de acordo com Hage e Carr (2012).

Dessa forma, os valores das concentrações nominais (calculadas) e efetivos, mensuradas nas amostras coletadas no início dos experimentos, são apresentados na Tabela 2. Vale citar que por conta das diferenças entre ambos valores (> 20%), serão apresentados ao longo desse documento as concentrações reais obtidas após análise química das amostras serão apresentadas ao longo deste trabalho, conforme recomendado por OECD (2011), com exceção da concentração do controle, definida como zero.

Tabela 2: Concentrações nominais e reais dos metais nas diluições e controle e percentual de variação entre elas. Sendo o Limite de Quantificação (LQ) para o Cd de 0,008 mg L⁻¹, Cr de 0,00006 mg L⁻¹ e Pb de 0,008 mg L⁻¹

Tratamento	Concentração Nominal (mg L ⁻¹)	Concentração Real (mg L ⁻¹)	Percentual de Variação ¹
Controle	0	<LQ	-
Cádmio 1	0,1	0,01	0
Cádmio 2	0,1	0,08	10
Cádmio 3	0,2	0,18	10
Chumbo 1	0,03	0,05	40
Chumbo 2	0,2	0,12	40
Chumbo 3	0,5	0,38	24
Cromo 1	0,05	0,02	60
Cromo 2	0,15	0,13	13
Cromo 3	0,5	0,45	10

¹Percentual de variação entre as concentrações nominais e reais.

4.2 Sobrevivência

Nesta etapa, os metais chumbo e cromo, não apresentaram taxas de mortalidade significativas. Para as fêmeas, dois indivíduos, segunda e terceira réplicas, não sobreviveram a concentração média de cromo (0,15 mg/L). Enquanto para os machos ocorreram três mortes sob efeito do chumbo, uma na segunda réplica da menor concentração (0,05 mg/L) e outras duas, na segunda e terceira réplicas da maior concentração (0,38 mg/L). Todos os demais indivíduos sobreviveram mesmo na presença de chumbo ou cromo.

Enquanto isso, observou-se uma relação muito clara do metal cádmio com a mortalidade dos organismos da espécie *H. meinerti*. Dentre a amostra de indivíduos, houve apenas sobreviventes entre as fêmeas, três indivíduos de cinco amostras que estavam sob a menor concentração (0,01 mg/L). Todos os demais indivíduos, nas demais concentrações, não sobreviveram. Além disso, entre os machos não houve sobrevivência alguma.

A partir de outros estudos, observa-se que a mortalidade é um indicador de extrema importância para Ecotoxicologia. Pinto et al 2021, aponta, em um estudo sobre a mesma espécie, *H. meinerti*, sob efeito de dois agrotóxicos, que sobrevivência de foi registrada apenas

nos controles e em mesocosmos tratados com 2,4-D. Em um segundo e terceiro períodos de tempo, os tratamentos contendo fipronil e vinhaça (isolados ou combinados) ainda causaram 100% da mortalidade. Sendo assim, é notável a sensibilidade da espécie de anfípode à contaminantes como agrotóxicos, mas também a metais como o cádmio, conforme visto ao longo deste trabalho.

Já em Giroto et al. (2020), levanta-se a discussão sobre a importância de observar todos os efeitos subletais nos organismos aquáticos, mesmo quando a toxicidade letal do é baixa. No estudo desses autores, a velocidade máxima e a distância percorrida pelos girinos foram reduzidas em todos os tratamentos, bem como a taxa de consumo de oxigênio. Em comparativo com o presente trabalho, considerando os casos observados para os metais cromo e chumbo, também não foi identificada letalidade significativa, mas os demais parâmetros analisados sofreram algumas alterações que merecem atenção e possuem potencial de impacto para ecossistema.

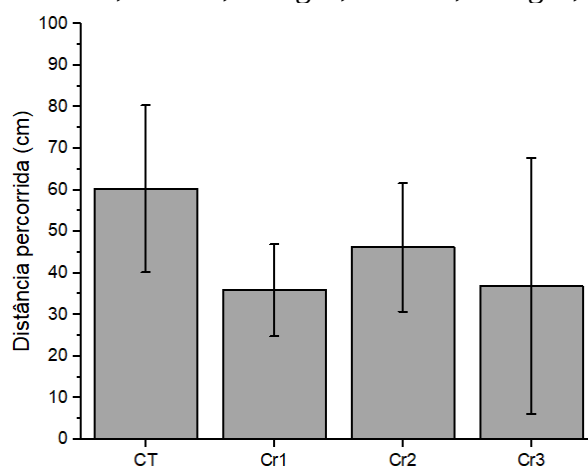
4.3 Análise comportamental, taxas de alimentação, excreção e assimilação

4.3.1 Machos

Vale relembrar aqui que todos os indivíduos que não sobreviveram tiveram entrada desconsiderada na amostra de dados, ou seja, valores vazios nas tabelas. Dessa forma, os dados coletados através do Kinovea, para os machos sob efeito do cromo, estão dispostos na Tabela 9 disponível no Anexo 1.

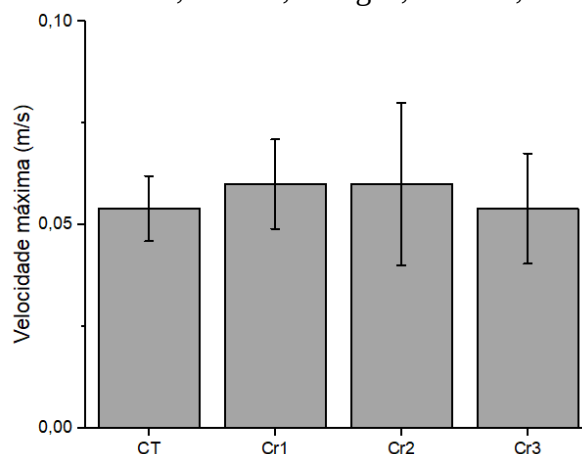
As informações de distância percorrida e velocidade máxima são apresentadas na Figura 2 e 3.

Figura 2: Distância percorrida por machos de *H. meinerti* (média e desvio padrão) sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 3: Velocidade máxima atingida por machos de *H. meinerti* (média e desvio padrão) sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Como apresentado acima, o resultado da análise comportamental dos machos da espécie de anfípode, não apresentou alterações significativas comparadas ao controle, tratando-se do metal em questão. E observando a tabela a seguir, que demonstra a confirmação pelo GLM, esse padrão se mantém para todas as análises realizadas (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados análise GLM para tratamentos com cromo, de machos de *H. meinerti* (Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).

Tratamento	Pr (Distância)	Pr (Vel. Max.)	Pr (Alimentação)	Pr (Excreção)	Pr (Assimilação)
Cr1	0.115	0.549	0.637	0.196	0.656
Cr2	0.348	0.549	0.777	0.262	0.756
Cr3	0.129	1.000	0.061	0.2199	0.208

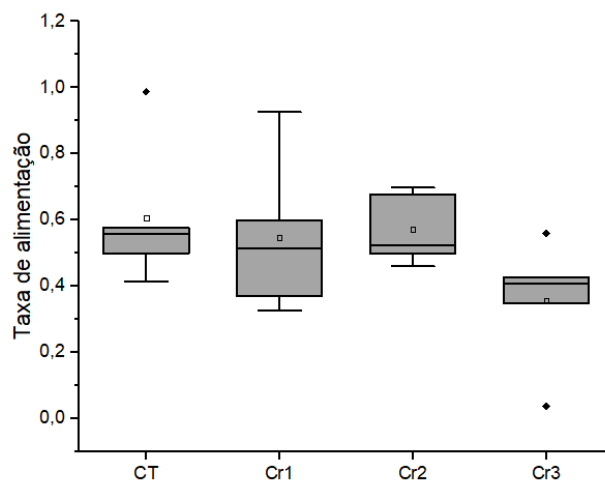
Fonte: Autoria própria, 2024.

É importante destacar que no registro dos dados iniciais, mais precisamente na pesagem antes e depois da filtragem para determinação da produção de fezes, alguns valores registrados após a filtragem foram menores que os valores antes da filtração (vide tópico 3.1 Análise taxas de alimentação e excreção), o que gerou resultados negativos de produção de fezes nas seguintes etapas: controle réplica 2 e cromo três réplica 4. Dessa forma, pela inviabilidade dos dados, ambas amostras foram também desconsideradas, como observa-se na Tabela 10 disponível no Anexo 1.

Complementarmente, os gráficos abaixo (Figura 4, 5 e 6), apontam uma redução das taxas de alimentação, excreção e assimilação, principalmente observando a mediana da maior concentração, porém como visto, não houve respaldo estatístico pelo GLM, possivelmente pela variabilidade de dados do controle.

Figura 4: Taxa de alimentação de machos de *H. meinerti* sob efeito do cromo.

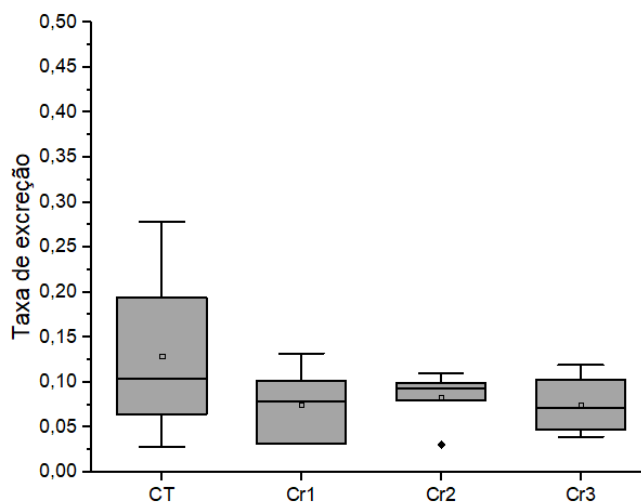
(CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

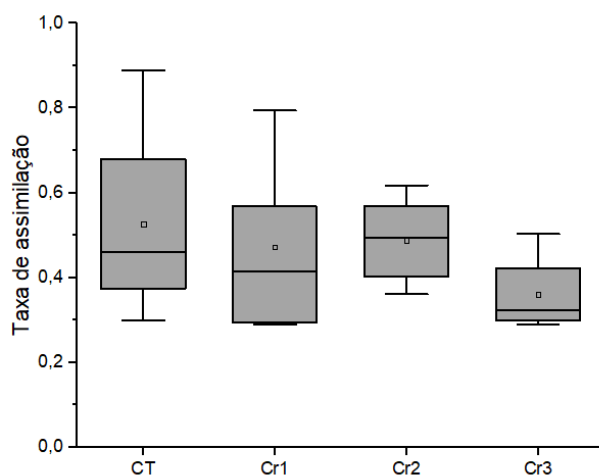
Figura 5: Taxa de excreção de machos de *H. meinerti* sob efeito do cromo.

(CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 6: Taxa de assimilação de machos de *H. meinerti* sob efeito do cromo.
(CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).

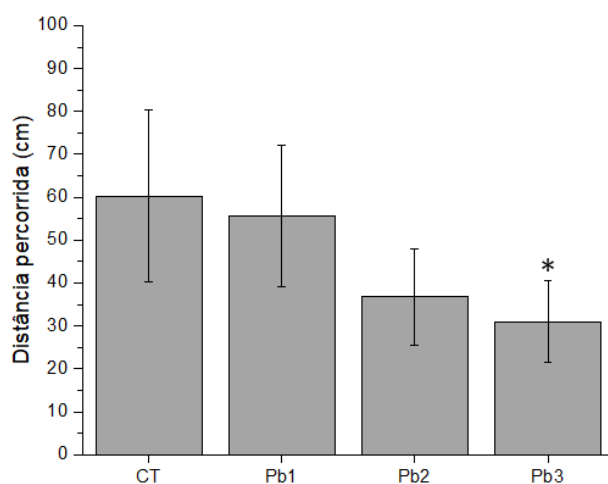


Fonte: Autoria própria, 2024.

Agora, para o metal chumbo, os dados coletados a partir do programa Kinovea, para primeira análise estão distribuídos na Tabela 11 no Anexo 1.

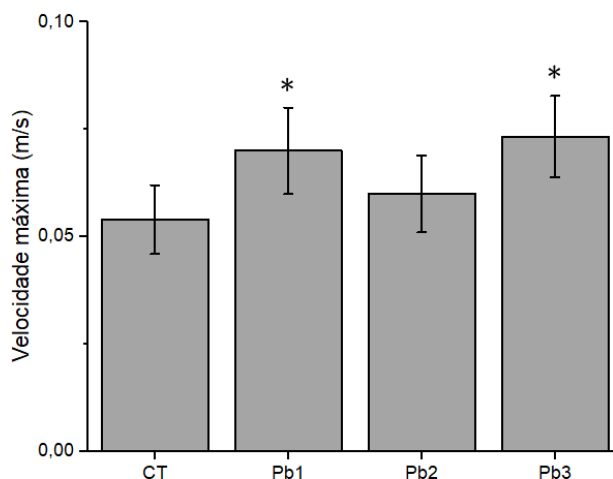
É possível observar, a partir da apresentação dos dados no formato de gráficos de barras, que a distância percorrida (Figura 7) tem clara redução ao longo do aumento da concentração, diferindo do controle na última concentração, enquanto as velocidades máximas (Figura 8) apresentam um aumento de dois valores nas concentrações 1 e 3.

Figura 7: Distância percorrida por machos de *H. meinerti* (média e desvio-padrão) sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).
Asterisco (*) indica diferença do controle estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 8: Velocidade máxima atingida por machos de *H. meinerti* sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L). Asteriscos (*) indicam diferenças do controle estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Pelo GLM, houve duas alterações constatadas na maior concentração, tanto para distância percorrida, quanto para velocidade máxima, e uma alteração ainda com relação a velocidade, na menor concentração, validando as diferenças observadas acima. Todos esses valores citados foram menores que 0,05, ou seja, são estatisticamente diferentes do controle. Entretanto, como citado anteriormente, apenas a distância apresentou uma redução (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados análise GLM para tratamentos com chumbo, de machos de *H. meinerti* (Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).

Tratamento	Pr (Distância)	Pr (Vel. Max.)	Pr (Alimentação)	Pr (Excreção)	Pr (Assimilação)
Pb1	0.6958	0.0380	0.224	0.5205	0.2418
Pb2	0.0539	0.3751	0.155	0.3192	0.2522
Pb3	0.0395	0.0236	0.160	0.4898	0.1904

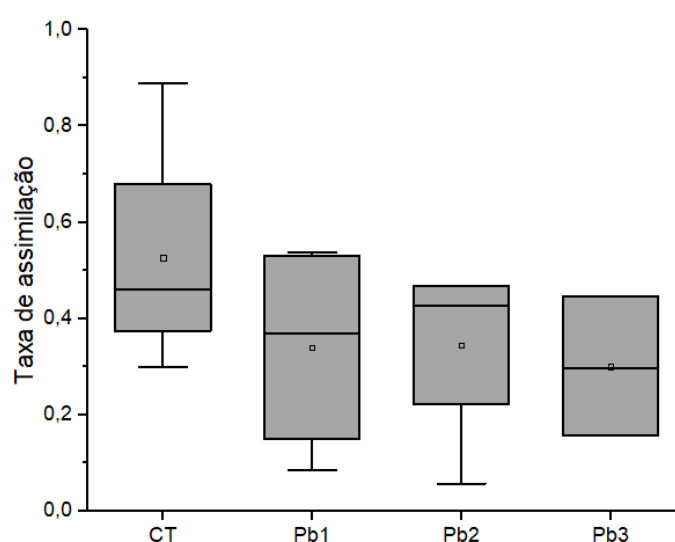
Fonte: Autoria própria, 2024.

No caso do chumbo, vale citar que ocorreu aqui, novamente, no processo de cálculo da excreção, um resultado negativo e consequentemente desconsiderado na amostra do segundo tratamento com chumbo (0,12 mg/L) réplica 4, conforme visto na Tabela 12 disponível no Anexo 1.

Dessa forma, para as taxas de alimentação, excreção e assimilação, não houve mudanças representativas, conforme demonstrado pela análise GLM (Tabela 4), embora uma tendência de redução tenha sido observada.

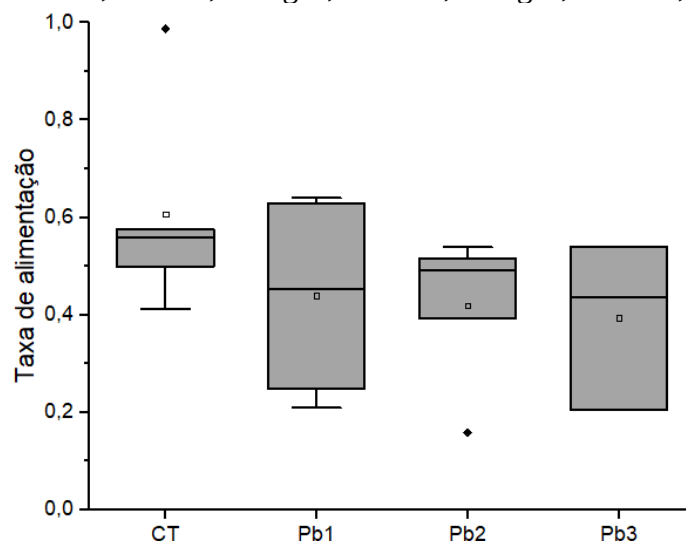
Complementando, como citado, a taxa de assimilação (Figura 9) e alimentação (Figura 10) aparentam uma diferença significativa principalmente para a maior concentração de chumbo, na qual a mediana encontra-se bem abaixo dos dados do controle, mas talvez, novamente, pela variabilidade dos dados observados no controle, a GLM não tenha respaldado esse resultado.

Figura 9: Taxa de assimilação de machos de *H. meinerti* machos sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).



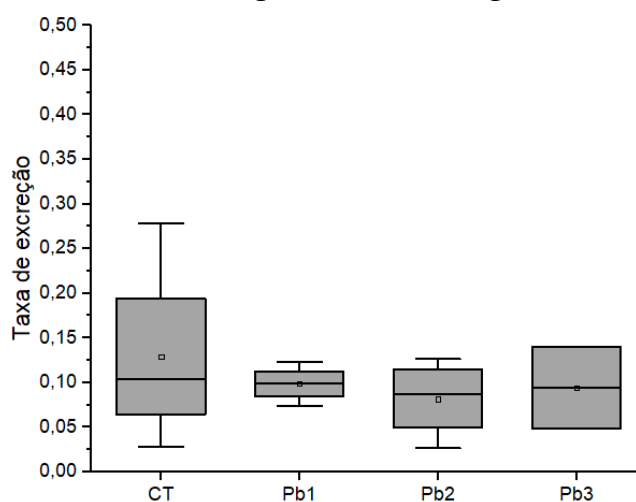
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 10: Taxa de alimentação de machos de *H. meinerti* machos sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 11: Taxa de excreção de machos de *Hyaella meinerti* sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).



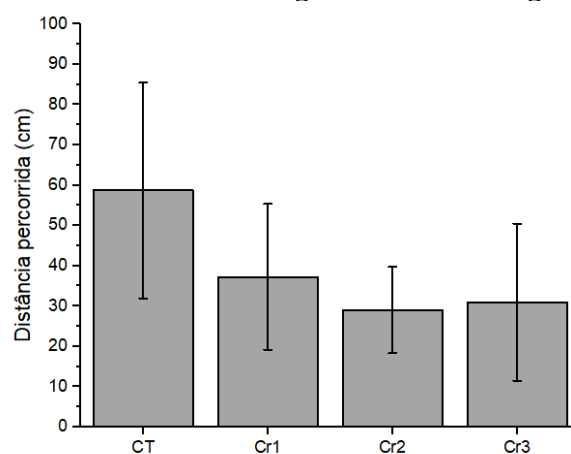
Fonte: Autoria própria, 2024.

4.3.2 Fêmeas

Tratando-se então das fêmeas da mesma espécie, seguindo o mesmo padrão, na Tabela 13 disponível no Anexo 1, dispõem-se os dados gerados a partir do Kinovea.

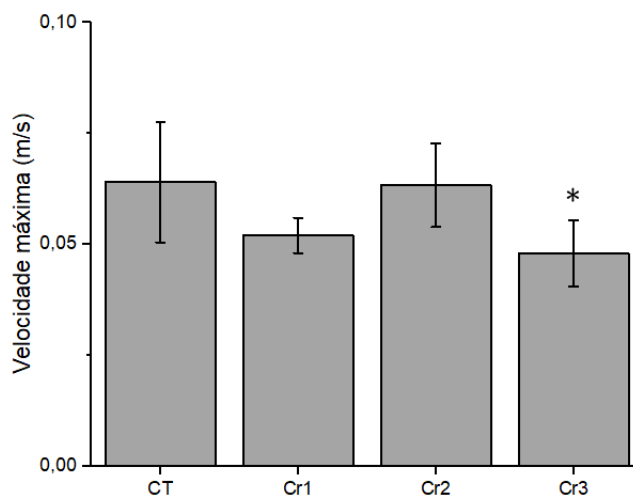
Neste caso, a distância percorrida aparenta uma pequena tendência de redução (Figura 12), mas pelo GLM houve apenas uma alteração na maior concentração de cromo para a variável de velocidade máxima (Figura 13).

Figura 12: Distância percorrida por fêmeas de *H. meinerti* (média e desvio padrão) sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 13: Velocidade máxima atingida por fêmeas de *H. meinerti* (média e desvio padrão) sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L). Asterisco (*) indica diferença do controle estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Abaixo, a tabela 5 demonstra os valores obtidos na análise estatística, e em destaque a única alteração validada pelo GLM.

Tabela 5: Resultados análise GLM para tratamentos com cromo, de fêmeas de *H. meinerti* (Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).

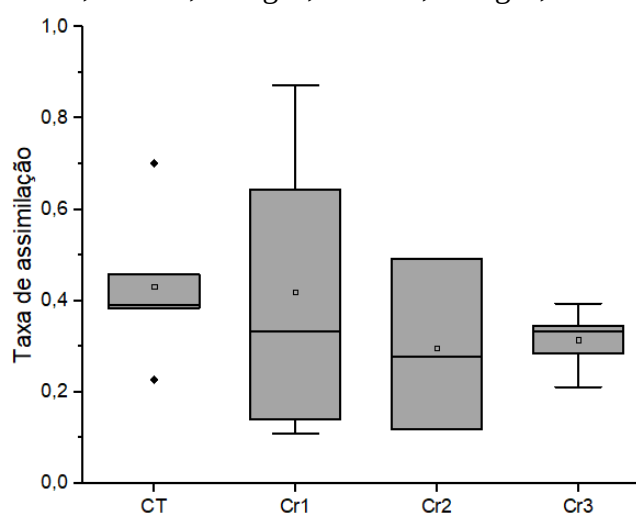
Tratamento	Pr (Distância)	Pr (Vel. Max.)	Pr (Alimentação)	Pr (Excreção)	Pr (Assimilação)
Cr1	0.1636	0.0926	0.9331	0.6335	0.656
Cr2	0.1006	0.9320	0.7193	0.2947	0.756
Cr3	0.0787	0.0305	0.7047	0.3205	0.208

Fonte: Autoria própria, 2024.

No caso acima, não houve inconsistências em nenhum resultado parcial, como para o caso dos machos, mas vale reforçar que dois indivíduos não sobreviveram à concentração intermediária de cromo, sendo então, também retirados do espaço amostral.

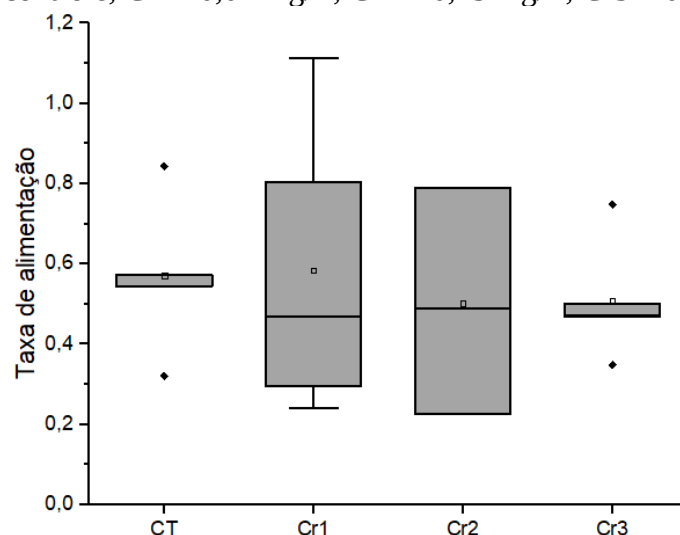
E tratando-se da apresentação dos resultados em boxplot, para a taxa de assimilação (Figura 13) e alimentação (Figura 14), novamente há o comportamento da baixa mediana na maior concentração, porém sem respaldos estatísticos. Enquanto isso, para a taxa de excreção os dados não apresentam significativas diferenças com relação ao controle (Figura 15).

Figura 13: Taxa de assimilação de fêmeas de *H. meinerti* sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



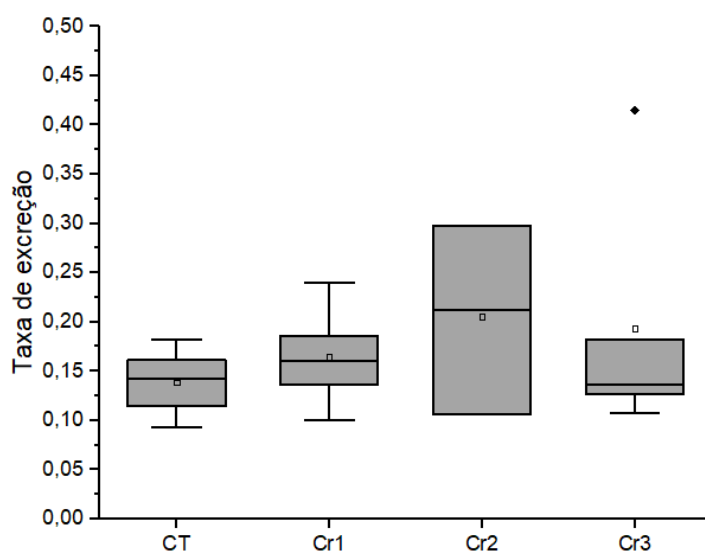
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 14: Taxa de alimentação de fêmeas de *H. meinerti* sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

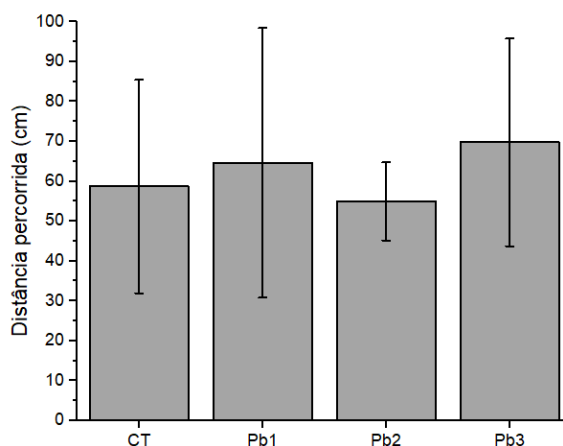
Figura 15: Taxa de excreção de fêmeas de *H. meinerti* sob efeito do cromo (CT = controle; Cr1= 0,02 mg/L; Cr2 = 0,15 mg/L; Cr3 = 0,5 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Já com relação ao metal chumbo, os resultados obtidos para as fêmeas estão dispostos na Tabela 15 disponível no Anexo 1. Observa-se uma leve queda da distância percorrida para o chumbo 2 (Figura 16), e uma redução da velocidade máxima ao longo do aumento da concentração (Figura 17).

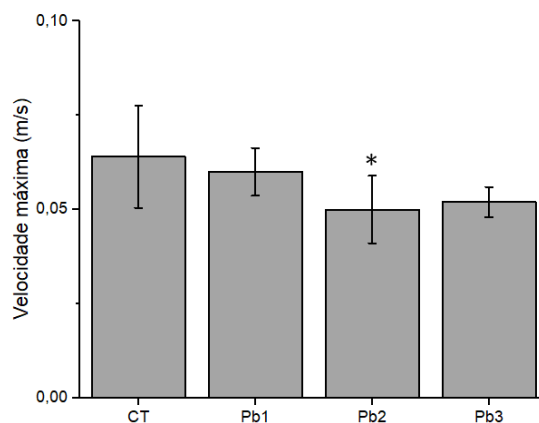
Figura 16: Distância percorrida por fêmeas de *H. meinerti* (média e desvio padrão) sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 17: Velocidade máxima atingida por fêmeas de *H. meinerti* (média e desvio padrão) sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).

Asterisco (*) indica diferença do controle estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Assim, pela tabela 6 a seguir, é possível identificar que o resultado para as variáveis de velocidade máxima e assimilação, tendo em vista a concentração intermediária de chumbo, apresentou diferença do controle, mas não seguiu a tendência observada nos gráficos de dispersão, para a terceira concentração. Já no caso da taxa de alimentação, a segunda e terceira maiores concentrações são estatisticamente diferentes do controle.

Tabela 6: Resultados análise GLM para tratamentos com chumbo, de fêmeas de *H. meinerti* (Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).

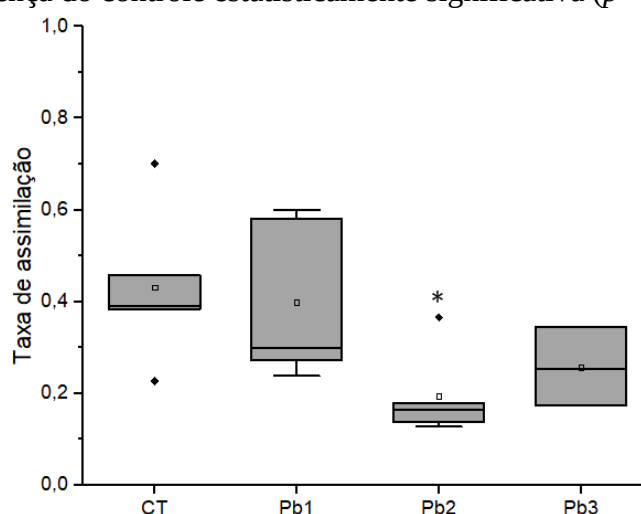
Tratamento	Pr (Distância)	Pr (Vel. Max.)	Pr (Alimentação)	Pr (Excreção)	Pr (Assimilação)
Pb1	0.7488	0.5360	0.4498	0.295	0.7227
Pb2	0.8381	0.0417	0.0125	0.410	0.0224
Pb3	0.5504	0.0760	0.0197	0.194	0.1237

Fonte: Autoria própria, 2024.

Durante os cálculos para obter a taxa de assimilação das fêmeas sob efeito do chumbo, na terceira concentração, réplicas 1 e 2, a taxa de excreção foi maior que a taxa de alimentação, o que geraria um resultado negativo na taxa final, dessa forma, também não se incluiu este dado, entendido como inconsistente, vide Tabela 16, Anexo 1.

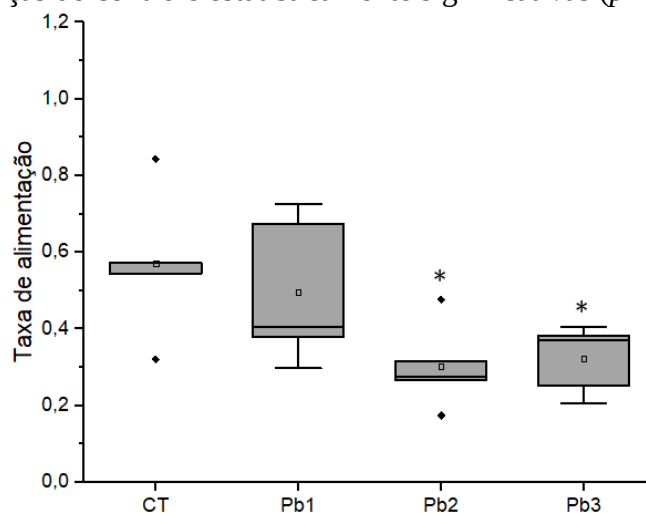
Por fim, a partir das figuras a seguir, fica evidente a discrepância entre controle e a segunda concentração de chumbo para a taxa de assimilação (Figura 17) e também a diferença entre o controle e as duas maiores concentrações na análise da taxa de alimentação (Figura 18). Além disso, a taxa de excreção, não apresentou nenhum resultado significativo (Figura 19).

Figura 17: Taxa de assimilação de fêmeas de *H. meinerti* fêmeas sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L). Asterisco (*) indica diferença do controle estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



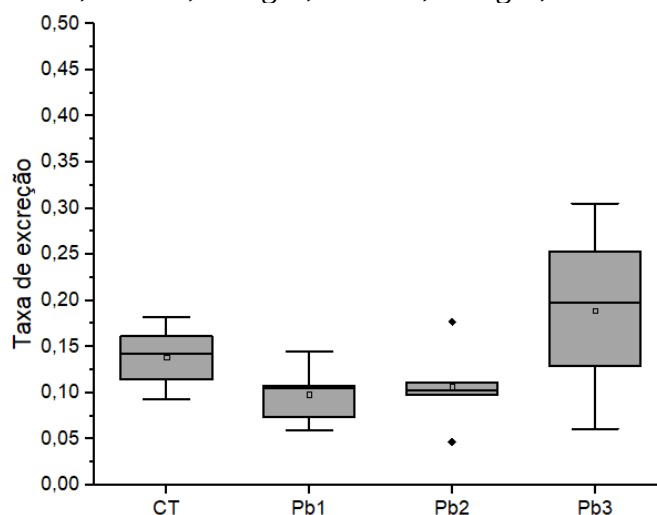
Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 18: Taxa de alimentação de fêmeas de *H. meinerti* fêmeas sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L). Asteriscos (*) indicam diferenças do controle estatisticamente significativas ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Figura 19: Taxa de excreção de fêmeas de *H. meinerti* fêmeas sob efeito do chumbo (CT = controle; Pb1= 0,05 mg/L; Pb2 = 0,12 mg/L; Pb3 = 0,38 mg/L).



Fonte: Autoria própria, 2024.

Para simplificar uma análise geral, a seguir, estão dispostos os resultados de todas os parâmetros, concentrações e metais avaliados:

Tabela 7: Resultados análises GLM para tratamentos com cromo e chumbo, da *Hyalella meinerti* machos e fêmeas.

Gênero	Tratamento	Pr (Distância)	Pr (Vel. Max.)	Pr (Alimentação)	Pr (Excreção)	Pr (Assimilação)
Macho	Cr1	0.115	0.549	0.637	0.196	0.656
Macho	Cr2	0.348	0.549	0.777	0.262	0.756
Macho	Cr3	0.129	1.000	0.061	0.2199	0.208
Macho	Pb1	0.6958	0.0380	0.224	0.5205	0.2418
Macho	Pb2	0.0539	0.3751	0.155	0.3192	0.2522
Macho	Pb3	0.0395	0.0236	0.160	0.4898	0.1904
Fêmea	Cr1	0.1636	0.0926	0.9331	0.6335	0.656
Fêmea	Cr2	0.1006	0.9320	0.7193	0.2947	0.756
Fêmea	Cr3	0.0787	0.0305	0.7047	0.3205	0.208
Fêmea	Pb1	0.7488	0.5360	0.4498	0.295	0.7227
Fêmea	Pb2	0.8381	0.0417	0.0125	0.410	0.0224
Fêmea	Pb3	0.5504	0.0760	0.0197	0.194	0.1237

Fonte: Autoria própria, 2024.

Como é possível observar acima, apenas o tratamento com machos sob efeito do cromo, não apresentou nenhum tipo de impacto. E com relação ao parâmetro avaliado, a taxa de excreção também não apresentou alterações, sob efeito de ambos metais.

Porém todos os demais dados apresentados apontaram algum tipo de evidência de alteração no parâmetro avaliado em pelo menos uma concentração de contaminante de exposição, principalmente tratando-se da velocidade máxima percorrida, variável que apresentou quatro diferentes momentos de discrepância com o resultado do controle.

Tal aspecto, pode gerar impacto para a vida aquática, já que este é um importante organismo que exerce função na cadeia alimentar, como elo alimentar entre peixes e espécies bentônicas. Tendo isso em vista, a redução da velocidade máxima pode reduzir as chances da espécie na fuga de predadores, e consequentemente desequilibrar a cadeia (Pinto et al, 2021).

Castro e Jonsson (2001), compilaram uma série de resultados que indicam o nível de toxicidade de metais para diferentes espécies, apresentados na tabela a seguir:

Tabela 8: Sequência de toxicidade de íons metálicos para a biota aquática.

Espécie	Ordem decrescente de toxicidade
<i>Chlorella vulgaris</i> (alga)	Hg>Cu>Cd>Fe> Cr >Zn>Ni>Mn
<i>Paramecium</i> (protozoário)	Hg> Pb >Ag>Cu>Cd>Ni>Mn>Zn
<i>Daphnia hyalina</i> (crustáceo)	Hg>Cu>Zn> Cr > Pb >Cd>Ni
<i>Cyclops abysserum</i> (crustáceo)	Hg> Pb >Cd>Cu>Zn> Cr >Ni
<i>Lymnae acuminata</i> (molusco)	Hg>Cu>Cd>Ni> Cr >Zn
<i>Salmo gairdneri</i> (peixe)	Cd>Hg>Cu> Pb >As> Cr >Ni
<i>Rana hexadactyla</i> (anfíbio)	Hg>Cu>As> Pb >Fe> Cr

Fonte: Castro e Jonsson (2001).

Como visto acima, o chumbo apresenta-se como o segundo metal mais tóxico para duas das espécies apresentadas. Correlacionando com o presente estudo, este metal foi o que causou maior. Enquanto o cromo, apesar de apresentar menores incidências, e ser colocado entre os menos tóxicos, ainda representa potências danos a biota aquática.

Um estudo publicado em 2021, pelos autores Pinto et al, (2021), observou as respostas funcionais da *H. meinerti*, sob efeito dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, e levantou comprovações de redução da atividade de natação de machos, fêmeas, em organismos sobreviventes expostos a os agrotóxicos isolados, vinhaça e uma mistura dos agrotóxicos ao longo de todos os períodos experimentais. Este fato indica que a espécie em questão, pode ser um importante bioindicador de qualidade da água, já que ela é sensível não só à presença de metais como o presente estudo demonstra, mas também a agrotóxicos, como observado no estudo citado.

Além disso, outro resultado, por Girotto et al., (2020), apresenta padrão similar, com diminuição da velocidade de natação da espécie de anfíbio *Lithobates catesbeianus*, no tratamento mais concentrado contendo rejeitos de mineração (50 g/L). E na composição desse material, oriundo da barragem de Fundão (Mariana, Brasil), foi observada a presença de metais como cádmio (Cd), chumbo (Pb), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e alumínio (Al), sendo

que no presente projeto, foram utilizados como parâmetros dois destes contaminantes. Dessa forma, os resultados observados em ambos trabalhos são condizentes entre si no que diz respeito a efeitos adversos subletais de metais sobre a biota aquática.

Já no quesito taxa de assimilação, os autores Baudy et al., (2017) analisaram as taxas de alimentação e produção de fezes na espécie *Hyalella azteca*, quando exposta a fungicidas. Os resultados apontaram que o consumo de folhas não foi alterado, mas a produção de fezes diminuiu, ou seja, houve um aumento na assimilação de alimento, indicando uma maior demanda energética devido ao estresse que foram expostos.

O estresse causado pela contaminação pode exigir um aumento da demanda de energia do indivíduo para seus processos básicos, como forrageamento, reprodução e defesa contra predação, aumentando o risco de extinção local (BAUDY et al., 2017). Porém essa premissa vai contra uma observação do presente estudo, onde na presença de concentração intermediária de chumbo, as fêmeas da *H. meinerti*, reduziram sua taxa de assimilação, sendo, entretanto, uma única alteração dentre todo o espaço amostral que manteve taxas similares aos controles.

Vale citar ainda que devido à capacidade de bioacumulação dos metais potencialmente tóxicos, aliado à importância da *H. meinerti* na cadeia alimentar, a presença desses metais no ambiente aquático, pode influenciar negativamente a biologia de espécies de organismos maiores, como os peixes e até a saúde humana, através do consumo de animais contaminados pela população (SAVASSI, 2019).

Dessa forma, é possível observar, a partir dos resultados levantados neste estudo, os indícios de comprometimento principalmente da atividade natatória em macroinvertebrados aquáticos, por conta de contaminações contendo metais potencialmente tóxicos.

4. CONCLUSÃO

A análise de comportamento de invertebrados aquáticos sob efeito de contaminantes, dentro do campo da Ecotoxicologia, ainda é escassa. Com isso, apesar dos avanços observados em estudos recentes, pouco se sabe sobre os efeitos de metais, nos padrões comportamentais das espécies de água doce, principalmente em regiões tropicais. Porém, por conta do aumento da ocorrência de diferentes contaminantes, como os metais cádmio, cromo e chumbo, na água e em sedimentos, acima dos limites basais, como exemplificado no presente estudo, é necessário buscar cada vez mais a compreensão desse potencial impacto.

Sendo assim, os resultados obtidos para a espécie *H. meinerti*, indicaram que algumas concentrações de cromo e chumbo, podem afetar principalmente a velocidade máxima percorrida, reduzindo chances de escapatória de predadores e desequilibrando a cadeia alimentar. Houve também, uma tendência, porém não validada pela análise GLM, de redução da mediana da taxa de assimilação nas maiores concentrações desses metais, o que poderia representar uma redução do gasto energético do organismo, e que poderia estar inclusive associado à sua menor mobilidade. Porém, algumas inconsistências como aumento de velocidade percorrida também foram identificadas e valem ser aprofundadas e observadas em futuros experimentos.

Ademais, foi clara a mortalidade causada pelo cádmio no anfípoda, o que inclusive impossibilitou a análise da taxa de assimilação e comportamento. Restaram apenas três indivíduos fêmeas, na menor concentração, e nenhum macho sobreviveu em todas as concentrações e réplicas. Logo, reforça-se aqui uma evidência de que este metal pode causar sérias implicações nos ecossistemas aquáticos e desequilibrar toda a base da cadeia alimentar.

REFERÊNCIAS

AFRIDI, H. I. et al. *Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry*. Toxicology and industrial health, v. 22, n. 9, p. 381-393, 2006.

ABNT N.B.R. 15470, 2013. Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Aguda E Crônica - Método De Ensaio Com *Hyalella* spp (Amphipoda) Em Sedimentos. Andersen, J.M., 1976. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. Water Res. 10, 329–331. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90175-5).

Albuquerque AF, Ribeiro JS, Kummrow F, Nogueira AJA, Montagner CC, Umbuzeiro GA (2016). *Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review*. Environ Sci Processes Impacts 18:779–787

BAUDY, P.; ZUBROD, J.; KONSCHAK, M.; WEIL, M.; SCHULZ, R.; BUNDSCHUH, M. *Does long-term fungicide exposure affect the reproductive performance of leaf-shredders? A partial life-cycle study using Hyalella azteca*. Environmental Pollution, [s. l.], v. 222, 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005.

CASTRO, L. S.; JONSSON, C. *Capítulo 23 Aspectos Toxicológicos em Ambiente Aquático e em Mamíferos*. (2001) [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1108088/1/2001CLCastroAspectos.pdf>>. Acesso em: 01 de maio de 2024.

CETESB. *Crômio e seus compostos*. Ficha de Informação Toxicológica (FIT), 2017. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Cromio.pdf>>. Acesso em: 15 de maio de 2024.

DA COSTA, V. B. *Avaliação da toxicidade dos metais cromo, cádmio e chumbo nos traços comportamentais e funcionais do macroinvertebrado neotropical Allonais inaequalis*. Universidade Estadual Paulista (UNESP) 2023. Disponível em: <

<https://repositorio.unesp.br/items/1b3614cf-4955-4ef5-8534-4b57d18c5225>>. Acesso em: 12 de maio de 2024.

DE CASTRO, S. V. *Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto Rio das Velhas*. [s. l.], 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/ENGD-6RFQPN>>. Acesso em: 13 de agosto de 2023.

DUFFUS, J. H. “*Heavy metals*” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

EINHEUSER, M. D.; NEJADHASHEMI, A. P.; SOWA, S. P.; WANG, L.; HAMAAMIN, Y. A.; WOZNICKI, S. A. *Modeling the effects of conservation practices on stream health*. Science of The Total Environment, [s.l.], v. 435–436, p. 380–391, 2012.

FREIRE, M.; GOMES, V.; GINUINO, I.; ARIAS, A. R. *Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos*. Oecologia Brasiliensis, ISSN 1981-9366, Vol. 12, No. 3, 2008 (Exemplar dedicado a: Monitoramento biológico em ecossistemas aquáticos continentais), [s. l.], v. 12, 2008.

FROIS, A. C. F.; PEREIRA, S. G. *QUALIDADE DA ÁGUA DO RIO PARANAÍBA NA REGIÃO DE PATOS DE MINAS-MG: organoclorados e metais pesados e a sua relação com saúde pública e coletiva*. Scientia Generalis, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 54–99, 2020.

GIROTTI, L.; GAETA, E.; GEBARA, R.; FREITAS, J. *Acute and Chronic Effects on Tadpoles (Lithobates catesbeianus) Exposed to Mining Tailings from the Dam Rupture in Mariana, MG (Brazil)*. and NEEA/CRHEA/SHS, São Carlos Engineering School, University of São Paulo. Springer Nature Switzerland AG 2020.

GIUSTO, A.; FERRARI, L. *Biochemical responses of ecological importance in males of the austral South America amphipod Hyalella curvispina Shoemaker, 1942 exposed to waterborne cadmium and copper*. Ecotoxicology and Environmental Safety, [s. l.], v. 100, p. 193–200, 2014.

GOMES, D.; Pinto, T.; RAYMUNDO, L.; SPERANDEI, V.; DAAM, M.; MOREIRA, R.; ROCHA, O. *Ecological risk assessment for metals in sediment and waters from the Brazilian Amazon region*. Chemosphere, Volume 345, 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653523026838?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 de maio de 2024.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. *Química analítica e análise quantitativa*. 1ª. Ed, Editora Pearson, 2012.

LIMA, I.V., PEDROZO, M.F.M., Brasil Governo do Estado da Bahia, 2001. *Ecotoxicologia do ferro e seus compostos*. Volume 4 de Cadernos de Referencia Ambiental. CRA 112p.

LIMA, J.; NETO, A.; ANDRADE, D.; FREITAS, E.; MOREIRA, R.; MIGUEL, M.; DAAM, M.; ROCHA, O. *Acute toxicity of four metals to three tropical aquatic invertebrates: The dragonfly *Tramea cophysa* and the ostracods *Chlamydotheca* sp. and *Strandesia trispinosa**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 180, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319305470>>. Acesso em: 11 de agosto de 2023.

LIMA, J.C.S., NETO, A.J.G., ANDRADE, D.P., FREITAS, E.C., MOREIRA, R.A., MIGUEL, M., DAAM, M.A., ROCHA, O. 2019. *Acute toxicity of four metals to three tropical aquatic invertebrates: The dragonfly *Tramea cophysa* and the ostracods *Chlamydotheca* sp. and *Strandesia trispinosa**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180:535-541.

MALTBY, L.; CLAYTON, S. A.; WOOD, R. M.; MCLOUGHLIN, N. *Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness, and relevance*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 361–368, 2002.

MATAVELI, L. R. V.; BUZZO, M. L.; CARVALHO, M. de F. H.; ARAUZ, L. J. De; MATAVELI, G. A. V. *Avaliação dos níveis de cromo total em águas para consumo humano*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, [s. l.], p. 1–11, 2018.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; LUND AMADO, L.; MARTINEZ GASPAR MARTINS, C.; LOPES LEÃES PINHO, G.; SOARES CHAVES, I.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. *Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, Fourth Special Issue of CBP dedicated to “The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology”*. [s. l.], v. 146, n. 1, Fourth Special Issue of CBP dedicated to “The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology”, p. 221–234, 2007.

NASCIMENTO, A. L.; SAMPAIO, R. A.; CRUZ, S. F.; JUNIO, G. R.; BARBOSA, C. F.; FERNANDES, L. A. *Metais pesados em girassol adubado com lodo de esgoto submetido a diferentes processos de estabilização*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbeaa/a/vhJknwgStV3sYkJTHM3VMxj/?lang=pt>>. Acesso em: 11 de maio de 2024.

NAVA, I. A.; GONÇALVES JUNIOR, A. C.I; NACKE, H.; GUERINI, V. L.; SCHWANTES, D. *Disponibilidade dos metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo no solo e tecido foliar da soja adubada com diferentes fontes de NPK+Zn*. Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/FYLbRKRmG4dk6Zv4bpN4Hfm/?lang=pt>>. Acesso em: 11 de maio de 2024.

OECD, 2011. Test No. 235: *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test. <https://doi.org/10.1787/9789264122383-en>

PINTO, T. J. da S.; FREITAS, J. S.; MOREIRA, R. A.; SILVA, L. C. M. Da; YOSHII, M. P. C.; LOPES, L. F. de P.; GOULART, B. V.; VANDERLEI, M. R.; ATHAYDE, D. B.; FRAGA, P. D.; OGURA, A. P.; SCHIESARI, L.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. *Functional responses of Hyalella meinerti after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture)*. Aquatic Toxicology, [s. l.], v. 231, p. 105712, 2021 a.

PINTO, T. J. da S.; MOREIRA, R. A.; DA SILVA, L. C. M.; YOSHII, M. P. C.; GOULART, B. V.; FRAGA, P. D.; DA SILVA ROLIM, V. L.; MONTAGNER, C. C.; DAAM, M. A.; ESPINDOLA, E. L. G. *Toxicity of fipronil and 2,4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod Hyalella meinerti*. Environmental Science and Pollution Research, [s. l.], v. 28, n. 28, 2021 b.

PRODANOFF, J. H. A. *Avaliação da Poluição Difusa Gerada por Enxurradas em Meio Urbano*. 2005. 276 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <<http://www.coc.ufrj.br/index.php/teses-de-doutorado/149-2005/1030-jorge-henrique-alves-prodanoff>>. Acesso em: 13 de agosto de 2023.

SAVASSI, L. *EFEITOS DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS E BIOMARCADORES DE IMPACTO AMBIENTAL EM PEIXES DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG*. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia. 2019 Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/32082/1/Tese%20DOUTORADO%20-%20Lourenco%20Almeida%20Savassi%20-%2028-11-2019%20-%20PDF.pdf>>. Acesso em: 1 de maio de 2024.

SILVA, A.; PARDO-ENRIQUEZ, D.; FILGUEIRAS, L.; TAVARES, R. *OS RECURSOS NATURAIS NA ERA DO ANTROPOCENO À LUZ DA ECONOMIA ECOLÓGICA*. Revista de Administração e Negócios da Amazônia, [s. l.], v. 11, p. 138, 2019.

SOUZA, A. K. R.; MORASSUTI, C. Y.; DEUS, W. B. De. *POLUIÇÃO DO AMBIENTE POR METAIS PESADOS E UTILIZAÇÃO DE VEGETAIS COMO BIOINDICADORES*. Acta Biomedica Brasiliensia, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 95–106, 2018.

TANG, H.M.F., MANFRED, L., MCBRATNEY, A., MAGG, F. 2021. *Risk of pesticide pollution at the global scale*. Nature Geosc. 14:206-210.

VIANNA, A. M. *Poluição ambiental, um problema de urbanização e crescimento desordenado das cidades*. Revista Sustinere, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 22–42, 2015.

VIRGA, R. H. P.; GERALDO, L. P.; SANTOS, F. H. Dos. *Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis*. Food Science and Technology, [s. l.], v. 27, p. 779–785, 2007.

YAN, S., SUBRAMANIAN, S.B., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, R.Y., ZHANG, T.C. 2010. *Emerging contaminants of environmental concern: source, transport, fate, and treatment*. Pract. Period. Hazard Toxic Radioact. Waste Manag. 14(1):2-20.

ZUBROD, J. P.; BUNDSCHUH, M.; SCHULZ, R. *Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of Gammarus fossarum (Crustacea; Amphipoda)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 1674–1680, 2010.

ANEXO 1

Tabela 9: Dados da análise comportamental, de machos da espécie *Hyalella meinerti* sob efeito do cromo (Cromo 1 = 0,02 mg/L; Cromo 2 = 0,15 mg/L; Cromo 3 = 0,5 mg/L).

Tratamento	Distância Percorrida [cm]	Velocidade máxima [m/s]
Controle 1	89,33	0,07
Controle 2	68,57	0,05
Controle 3	32,53	0,05
Controle 4	67,46	0,05
Controle 5	43,63	0,05
Cromo 1.1	28,01	0,06
Cromo 1.2	52,66	0,05
Cromo 1.3	27,43	0,08
Cromo 1.4	25,81	0,06
Cromo 1.5	45,68	0,05
Cromo 2.1	24,85	0,03
Cromo 2.2	72,62	0,07
Cromo 2.3	44,08	0,06
Cromo 2.4	48,58	0,05
Cromo 2.5	40,72	0,09
Cromo 3.1	7,73	0,06
Cromo 3.2	34,94	0,07
Cromo 3.3	92,84	0,06
Cromo 3.4	9,42	0,03
Cromo 3.5	39,54	0,05

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 10: Dados da análise para taxa de assimilação, de machos da espécie *Hyaella meinerti* sob efeito do cromo (Cromo 1= 0,02 mg/L; Cromo 2 = 0,15 mg/L; Cromo 3 = 0,5 mg/L).

Tratamento	Taxa de Alimentação	Taxa de excreção	Taxa de assimilação
Controle 1	0,4995	0,0285	0,4710
Controle 2	0,4134	-0,2327	
Controle 3	0,5769	0,2781	0,2989
Controle 4	0,9879	0,0994	0,8885
Controle 5	0,5583	0,1094	0,4489
Cromo 1.1	0,3692	0,0788	0,2904
Cromo 1.2	0,3267	0,0314	0,2952
Cromo 1.3	0,9258	0,1322	0,7937
Cromo 1.4	0,5990	0,0315	0,5675
Cromo 1.5	0,5154	0,1011	0,4142
Cromo 2.1	0,5238	0,0305	0,4933
Cromo 2.2	0,6975	0,0796	0,6179
Cromo 2.3	0,4604	0,0988	0,3616
Cromo 2.4	0,6775	0,1099	0,5676
Cromo 2.5	0,4973	0,0936	0,4036
Cromo 3.1	0,4092	0,1191	0,2900
Cromo 3.2	0,4257	0,0864	0,3394
Cromo 3.3	0,5592	0,0559	0,5033
Cromo 3.4	0,0381	-0,0157	
Cromo 3.5	0,3472	0,0393	0,3079

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 11: Dados da análise comportamental, de machos da espécie *Hyaella meinerti* sob efeito do chumbo (Chumbo 1 = 0,05 mg/L; Chumbo 2 = 0,12 mg/L; Chumbo 3 = 0,38 mg/L).

Tratamento	Distância Percorrida [cm]	Velocidade máxima [m/s]
Controle 1	89,33	0,07
Controle 2	68,57	0,05
Controle 3	32,53	0,05
Controle 4	67,46	0,05
Controle 5	43,63	0,05
Chumbo 1.1	34,16	0,06
Chumbo 1.2		
Chumbo 1.3	76,79	0,08
Chumbo 1.4	65,43	0,06
Chumbo 1.5	46,00	0,08
Chumbo 2.1	47,92	0,06
Chumbo 2.2	22,36	0,05
Chumbo 2.3	30,13	0,07
Chumbo 2.4	31,64	0,07
Chumbo 2.5	51,78	0,05
Chumbo 3.1	40,16	0,06
Chumbo 3.2		
Chumbo 3.3		
Chumbo 3.4	17,84	0,08
Chumbo 3.5	34,86	0,08

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 12: Dados da análise para taxa de assimilação, de machos da espécie *Hyaella meinerti* sob efeito do chumbo (Chumbo 1 = 0,05 mg/L; Chumbo 2 = 0,12 mg/L; Chumbo 3 = 0,38 mg/L).

Tratamento	Taxa de Alimentação	Taxa de excreção	Taxa de assimilação
Controle 1	0,4995	0,0285	0,4710
Controle 2	0,4134	-0,2327	
Controle 3	0,5769	0,2781	0,2989
Controle 4	0,9879	0,0994	0,8885
Controle 5	0,5583	0,1094	0,4489
Chumbo 1.1	0,2910	0,0742	0,2168
Chumbo 1.2			
Chumbo 1.3	0,6173	0,0957	0,5216
Chumbo 1.4	0,6399	0,1024	0,5375
Chumbo 1.5	0,2090	0,1235	0,0855
Chumbo 2.1	0,5152	0,1268	0,3884
Chumbo 2.2	0,1591	0,1020	0,0572
Chumbo 2.3	0,4930	0,0266	0,4664
Chumbo 2.4	0,3920	-0,0349	
Chumbo 2.5	0,5388	0,0720	0,4668
Chumbo 3.1	0,2043	0,0481	0,1562
Chumbo 3.2			
Chumbo 3.3			
Chumbo 3.4	0,4375	0,1398	0,2977
Chumbo 3.5	0,5393	0,0944	0,4449

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 13: Dados da análise comportamental, de fêmeas da espécie *Hyalella meinerti* sob efeito do cromo (Cromo 1= 0,02 mg/L; Cromo 2 = 0,15 mg/L; Cromo 3 = 0,5 mg/L).

Tratamento	Distância Percorrida [cm]	Velocidade máxima [m/s]
Controle 1	92,97	0,07
Controle 2	38,20	0,08
Controle 3	79,18	0,07
Controle 4	63,81	0,04
Controle 5	19,37	0,06
Cromo 1.1	22,41	0,06
Cromo 1.2	13,05	0,05
Cromo 1.3	56,40	0,05
Cromo 1.4	35,47	0,05
Cromo 1.5	58,78	0,05
Cromo 2.1	43,52	0,07
Cromo 2.2		
Cromo 2.3		
Cromo 2.4	17,91	0,07
Cromo 2.5	25,72	0,05
Cromo 3.1	11,01	0,05
Cromo 3.2	16,96	0,04
Cromo 3.3	57,09	0,06
Cromo 3.4	52,16	0,05
Cromo 3.5	17,76	0,04

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 14: Dados da análise para taxa de assimilação, de fêmeas da espécie *Hyalella meinerti* sob efeito do cromo (Cromo 1= 0,02 mg/L; Cromo 2 = 0,15 mg/L; Cromo 3 = 0,5 mg/L).

Tratamento	Taxa de Alimentação	Taxa de excreção	Taxa de assimilação
Controle 1	0,3205	0,0934	0,2271
Controle 2	0,5719	0,1142	0,4577
Controle 3	0,8434	0,1422	0,7012
Controle 4	0,5440	0,1611	0,3829
Controle 5	0,5720	0,1824	0,3896
Cromo 1.1	0,4692	0,1362	0,3330
Cromo 1.2	0,8032	0,1609	0,6422
Cromo 1.3	0,2961	0,1858	0,1102
Cromo 1.4	0,2407	0,1004	0,1404
Cromo 1.5	1,1121	0,2395	0,8726
Cromo 2.1	0,2262	0,1066	0,1197
Cromo 2.2			
Cromo 2.3			
Cromo 2.4	0,4894	0,2120	0,2774
Cromo 2.5	0,7891	0,2979	0,4913
Cromo 3.1	0,5016	0,1074	0,3942
Cromo 3.2	0,7485	0,4151	0,3334
Cromo 3.3	0,4720	0,1263	0,3458
Cromo 3.4	0,4676	0,1818	0,2858
Cromo 3.5	0,3480	0,1365	0,2115

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 15: Dados da análise comportamental, de fêmeas da espécie *Hyalella meinerti* sob efeito do chumbo (Chumbo 1 = 0,05 mg/L; Chumbo 2 = 0,12 mg/L; Chumbo 3 = 0,38 mg/L).

Tratamento	Distância Percorrida [cm]	Velocidade máxima [m/s]
Controle 1	92,97	0,07
Controle 2	38,20	0,08
Controle 3	79,18	0,07
Controle 4	63,81	0,04
Controle 5	19,37	0,06
Chumbo 1.1	55,73	0,07
Chumbo 1.2	107,89	0,06
Chumbo 1.3	10,71	0,06
Chumbo 1.4	56,27	0,05
Chumbo 1.5	92,46	0,06
Chumbo 2.1	60,37	0,04
Chumbo 2.2	61,32	0,04
Chumbo 2.3	60,74	0,05
Chumbo 2.4	56,63	0,06
Chumbo 2.5	35,65	0,06
Chumbo 3.1	43,89	0,05
Chumbo 3.2	92,10	0,05
Chumbo 3.3	108,72	0,05
Chumbo 3.4	58,13	0,05
Chumbo 3.5	46,00	0,06

Fonte: Autoria própria, 2024.

Tabela 16: Dados da análise para taxa de assimilação, de fêmeas da espécie *Hyalella meinerti* sob efeito do chumbo (Chumbo 1 = 0,05 mg/L; Chumbo 2 = 0,12 mg/L; Chumbo 3 = 0,38 mg/L).

Tratamento	Taxa de Alimentação	Taxa de excreção	Taxa de assimilação
Controle 1	0,3205	0,0934	0,2271
Controle 2	0,5719	0,1142	0,4577
Controle 3	0,8434	0,1422	0,7012
Controle 4	0,5440	0,1611	0,3829
Controle 5	0,5720	0,1824	0,3896
Chumbo 1.1	0,6748	0,0739	0,6008
Chumbo 1.2	0,7258	0,1444	0,5813
Chumbo 1.3	0,4044	0,1057	0,2987
Chumbo 1.4	0,2975	0,0595	0,2380
Chumbo 1.5	0,3799	0,1073	0,2726
Chumbo 2.1	0,3143	0,1771	0,1372
Chumbo 2.2	0,2680	0,1032	0,1648
Chumbo 2.3	0,2761	0,0973	0,1788
Chumbo 2.4	0,1741	0,0468	0,1274
Chumbo 2.5	0,4771	0,1109	0,3661
Chumbo 3.1	0,2058	0,2536	
Chumbo 3.2	0,2514	0,3053	
Chumbo 3.3	0,3716	0,1976	0,1741
Chumbo 3.4	0,3817	0,1292	0,2525
Chumbo 3.5	0,4057	0,0609	0,3448

Fonte: Autoria própria, 2024.

ANEXO 2

Strandesia trispinosa

No caso do organismo *Strandesia trispinosa*, buscava-se apenas a análise comportamental de distância percorrida e velocidade máxima, sob efeito dos agrotóxicos fipronil e 2,4 - D. Porém, devido ao método utilizado na estimulação, de todas as réplicas, aliado ao recipiente manipulado nas gravações, o emprego do programa foi intensamente comprometido. Tratando-se de um organismo extremamente pequeno, ao movimentar o recipiente, copo descartável, o movimento do líquido prejudicou a identificação da espécie, por um certo período de tempo não há visualização nenhuma da posição do organismo, o que implicaria em uma suposição do local onde se encontra, e um erro associado cada vez maior, a cada estímulo e a cada nova pequena suposição.

Nesse sentido, não foi possível prosseguir com as análises dessa espécie. Mas, como parte da avaliação do programa, elencou-se algumas recomendações para viabilizar sua utilização e facilitar experimentos futuros:

- Realizar estímulo apenas com uso de pipeta, não movimentar o recipiente;
- Ao inserir a pipeta no recipiente, reduzir possíveis movimentações no líquido e não sobrepor pipeta e organismo, sempre posicioná-la ao lado do organismo, não em cima;
- Centralizar o recipiente na câmera, evitando possíveis distorções de imagem;
- Quando possível, realizar o empréstimo de uma câmera profissional, otimizará o tempo e qualidade da análise.