



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA

GUILHERME LESSA FERREIRA

Estratégia reprodutiva e dinâmica populacional de *Hyalella azteca*
(Crustacea: Amphipoda). Integração de parâmetros populacionais
em testes de ecotoxicidade

Limeira

2016



GUILHERME LESSA FERREIRA

Estratégia reprodutiva e dinâmica populacional de *Hyalella azteca*
(Crustacea: Amphipoda). Integração de parâmetros populacionais
em testes de ecotoxicidade

Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia na área de Ambiente.

Área de concentração: Tecnologia para o Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maurea Nicoletti Flynn

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Gisela de Aragão Umbuzeiro

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO GUILHERME LESSA FERREIRA E
ORIENTADO PELA PROFA. DRA. MAUREA
NICOLETTI FLYNN

Limeira

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia
Felipe de Souza Bueno - CRB 8/8577

F413e Ferreira, Guilherme Lessa, 1988-
Estratégia reprodutiva e dinâmica populacional de *Hyaella azteca* (Crustacea: Amphipoda). Integração de parâmetros populacionais em testes de ecotoxicidade / Guilherme Lessa Ferreira. – Limeira, SP.: [s.n.], 2016.

Orientador: Maurea Nicoletti Flynn.
Coorientador: Gisela de Aragão Umbuzeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Toxicologia ambiental. 2. Amphipoda. 3. Tábua de mortalidade. 4. Demografia. I. Flynn, Maurea Nicoletti. II. Umbuzeiro, Gisela de Aragão, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Reproductive strategy and population dynamics of *Hyaella azteca* (Crustacea: Amphipod). Integration of population parameters in ecotoxicity tests

Palavras-chave em inglês:

Environmental toxicology

Amphipoda

Mortality - Tables

Demography

Área de concentração: Ambiente

Titulação: Mestre em Tecnologia

Banca examinadora:

Maurea Nicoletti Flynn [Orientador]

Maria Teresa Valério Berardo

Franci Mary Fantinato

Data de defesa: 15-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia



FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado em Tecnologia **Área de Concentração: Tecnologia e Inovação**

“Estratégia reprodutiva e dinâmica populacional de *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda). Integração de parâmetros populacionais em testes de ecotoxicidade.

Guilherme Lessa Ferreira

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Profa. Dra. Maurea Nicoletti Flynn
Unicamp
Presidente

Profa. Dra. Maria Teresa Valério Berardo
Universidade São Judas Tadeu

Profa. Dra. Franci Mary Fantinato
Universidade Presbiteriana Mackenzie

* A Ata da defesa, com as respectivas assinaturas dos membros, encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Agradecimentos

À Prof.^a Dr.^a Maurea Nicoletti Flynn, minha orientadora desde os tempos da graduação, pela sua paciência e vocação em ensinar, compartilhando bondosamente seu amplo conhecimento comigo.

À Prof.^a Dr.^a Gisela de Aragão Umbuzeiro pela oportunidade me dada e por todo apoio e ensinamentos.

À Ádria, Anjaína e Josiane, pela amizade e por todo o auxílio e suporte nas tarefas do LEAL.

À Karen e Fátima, funcionárias da secretaria de pós-graduação, por toda a assistência nos processos acadêmicos.

Aos amigos Lucas Alegretti e Bruno Burstin, pelo companheirismo. Sem eles teria sido tudo mais difícil.

À minha namorada Thaís, que esteve ao meu lado ao longo de todo o processo e aos meus pais pelo constante apoio e incentivo.

À Prof.^a Dr.^a Franci Mary Fantinato e Prof.^a Dr.^a Maria Teresa Berardo pelas sugestões dadas ao longo do desenvolvimento do trabalho e por fazerem parte da banca examinadora.

RESUMO

Hyalella azteca tem sido amplamente utilizada em testes de ecotoxicologia. Algumas características, como facilidade de cultivo, ciclo de vida curto e sensibilidade a diversas classes de contaminantes, a tornam adequada para experimentos com abordagem populacional, os LTRE (*Life Table Response Experiment*). Entretanto, estudos recentes com marcadores moleculares revelam que a espécie representa na verdade um complexo de espécies, fator complicador na interpretação dos resultados de testes pela comprovada dependência genética das respostas obtidas. O objetivo geral do trabalho foi descrever a estratégia reprodutiva e a dinâmica populacional do morfotipo de *H. azteca* cultivada no LEAL (Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP) e obter os parâmetros populacionais adequados como *endpoints* em testes de ecotoxicidade por meio de construção de tabela de vida idade específica. Pelos resultados obtidos, o morfotipo cultivado pertence ao fenótipo corpo pequeno do complexo de espécies, sendo *r* estrategista e atingindo pequeno tamanho corporal e, conseqüentemente, produzindo, por ninhada, menor número de ovos. O pequeno número de ovos é compensado por uma reprodução contínua e idade precoce de maturidade sexual, o que acarreta no aumento do número de ninhadas por fêmea ao longo da vida ($R_0=4,70$ fêmeas per fêmea) e na diminuição do tempo de geração ($T=6,94$ quinzenas) com o conseqüente aumento da taxa de crescimento intrínseco ($r=0,26$ per capita per quinzena). Os resultados obtidos para os parâmetros demográficos apontam para uma cultura bem estabelecida nas condições laboratoriais empregadas sem condicionantes de estresse. Diante do alto nível de divergência genética para o complexo *H. azteca*, e considerando que as comprovadas diferenças genéticas a nível de subespécie podem afetar o resultado de testes de toxicidade com diversos contaminantes, é importante que os parâmetros populacionais característicos de estratégia de vida sejam levantados para a cultura teste no estabelecimento e na seleção dos *endpoints* em nível populacional. Indica-se como *endpoint* preferencial a taxa instantânea de crescimento (r_i), obtida em experimento de 18 dias. Período de tempo adequado para a obtenção de taxa instantânea de crescimento (r_i) equivalente a taxa intrínseca de crescimento (r) calculada por tabela de vida idade específica.

Palavras-chaves: Tabela de Vida, Amphipoda, *Endpoints* Demográficos, Estratégia de Vida, Ecotoxicologia

ABSTRACT

Hyalella azteca has been widely used in tests of ecotoxicology. Some characteristics, such as easy of cultivation, short life cycle and sensitivity to various classes of contaminants, make the species suitable for ecotoxicological experiments with population approach, the LTRE (*Life Table Response Experiment*). However, recent studies with molecular markers show that the species actually represents a complex of species, a complicating factor in the interpretation of test results by the proven genetic dependence of the responses obtained. The aim of this study was to describe the reproductive strategy and the population dynamics of *H. azteca* cultivated in LEAL (laboratory of Ecotoxicology and Environmental Microbiology Prof. Dr. Abílio Lopes) of the School of Technology UNICAMP, and propose suitable *endpoints* for ecotoxicity tests base on the construction of age specific life tables. From the results, it was established that the morphological type cultivated belongs to the smaller body phenotype, being representative of life strategy *r*, reaching small body size and producing a smaller number of eggs per clutch. The small number of eggs is offset by the continuous reproduction and sexual maturity at an early age, increasing, in this manner, the number of clutches per female produced in lifetime ($R_0=4,70$ female per female) and decreasing generation time ($T=6,94$ fortnight) with the consequent increase of the intrinsic rate of increase ($r=0,26$ per capita per fortnight). Resulting demographic parameters point to a well-established culture under the adopted laboratory conditions. Considering the high level of genetic divergence of *H. azteca* complex, and also that genetic differences, even at subspecies level, can affect the results of toxicity tests, it is important that test population demographic parameters are established for the selection of population approach endpoints. It is indicated here, as applicable *endpoint*, the instant growth rate obtained through an 18 days long experiment. Period required to obtain an instantaneous growth rate (r_i) equivalent to the intrinsic growth rate (r) calculated with an age specific life table.

Key Words: Life Table, Amphipoda, Demographic Endpoints, Ecotoxicology, Life Strategy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de jovens eclodidos no início do experimento por cada fêmea parental e média de jovens por fêmea.....	30
Tabela 2. Número de indivíduos vivos na coorte nas datas estabelecidas para manipulação e contagem dos indivíduos.	31
Tabela 3. Número de ovos por fêmea e respectivo tamanho de cefalotórax em milímetros. N: número; CT: cefalotórax; DesvPad: desvio padrão.	34
Tabela 4. Medidas médias do tamanho do cefalotórax, da cabeça e do número de ovos para as fêmeas da coorte acompanhada.....	35
Tabela 5. Tabela de vida e de fecundidade da coorte monitorada. Nx: número de indivíduos em cada classe etária; Sx: proporção de sobreviventes entre a respectiva classe etária e a classe anterior; lx: proporção de sobrevivente da classe etária em relação ao N inicial; Dx: número de mortes entre a respectiva classe etária e a classe anterior; qx: probabilidade de morte entre a classe etária correspondente e a anterior; mx: número médio de ovos produzidos por fêmea para a classe etária correspondente.	37
Tabela 6. Valores do potencial reprodutivo (R_0), tempo de geração (T) e taxa de crescimento intrínseco (r) da geração de <i>Hyaella azteca</i> monitorada.	37
Tabela 7. Experimento de crescimento populacional. Número de indivíduos por tempo transcorrido do experimento marcado em semanas.....	38
Tabela 8. Taxas Instantâneas de Crescimento de uma população de <i>H. azteca</i> em diferentes intervalos de tempo	40

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	10
OBJETIVO	17
MATERIAL e MÉTODOS	18
Metodologia Padrão de Cultivo	18
Estabelecimento da Coorte	21
Classificação do Morfotipo	26
Construção da Tabela de Vida	26
Acompanhamento do Crescimento Populacional	28
RESULTADOS	30
Acompanhamento da Coorte	30
Fecundidade e Classificação do Morfotipo	33
Tabela de Vida e Parâmetros de Referência	36
Acompanhamento do Crescimento Populacional e Taxa Instantânea de Crescimento (ri) ...	38
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUÇÃO

A Ecotoxicologia, termo cunhado pelo francês René Truhaut em 1969, concentra seu foco nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos na dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos. A preocupação acadêmica, iniciada na década de 60, relativa às consequências para a biota e para a saúde humana que a contaminação química do meio ambiente possa causar, fomentou a concepção da Ecotoxicologia como uma área especializada da Toxicologia. Nas décadas de 70 e 80, a pressão da opinião pública sobre as indústrias potencialmente poluidoras impulsionou as agências ambientais dos Estados Unidos e da Europa a desenvolverem protocolos padronizados de testes de toxicidade com organismos aquáticos. A pesquisa na área foi levada então à uma abordagem mais pragmática com a constatação de que o conhecimento dos resultados de análises físico-químicas apenas não é suficiente para retratar a real dimensão dos impactos ambientais (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Desde então, a utilização de ensaios, tanto em efluentes líquidos quanto em corpos de água receptor, para a obtenção de informações relativas ao efeito tóxico de contaminantes tornou-se cada vez mais importante nas avaliações de impacto e de qualidade dos ambientes hídricos (FREIRE et al., 2008; KWAN; DUTKA, 1992; USEPA, 1985).

Basicamente, a análise ecotoxicológica compreende uma sequência de eventos referida como cadeia de causalidade que envolve a fonte de emissão dos contaminantes, o destino e comportamento destes no ambiente, e os efeitos produzidos na biosfera (Figura 1). As informações assim obtidas são essenciais na determinação dos níveis de contaminantes no ambiente e de seus destinos; na estimativa do grau de periculosidade dos contaminantes e de seus metabólitos para os organismos vivos; na indicação dos níveis máximos permitidos para contaminantes específicos nos diversos meios, ou seja, os padrões a serem mantidos; na diagnose e no prognóstico do efeito do contaminante no ambiente e do efeito das medidas mitigadoras tomadas; no controle da emissão de efluentes; e na avaliação dos riscos ecológicos associados ao contaminante (COSTA et al., 2008).

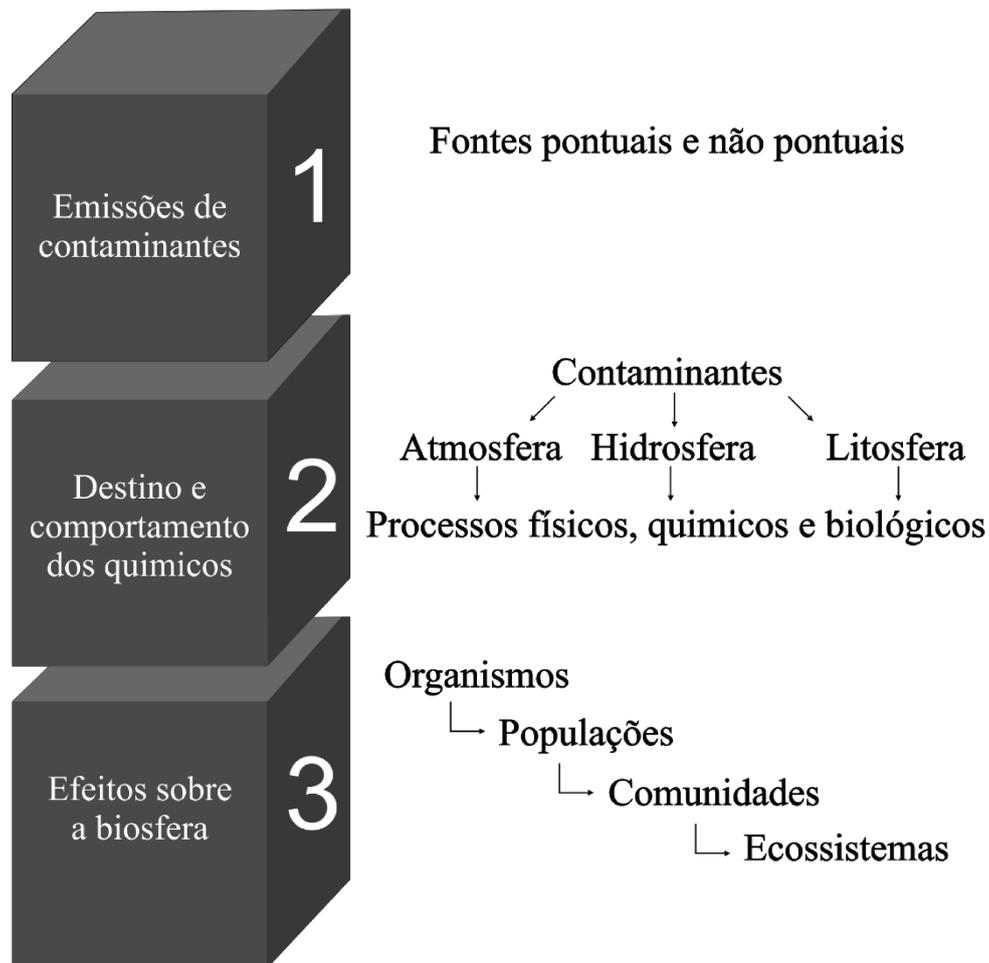


Figura 1 - Sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia e denominada cadeia da causalidade. Fonte: (COSTA et al., 2008).

O efeito de um contaminante no ambiente pode ser testado em diferentes níveis de organização ecológica, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades. Historicamente, foram primeiramente privilegiadas as pesquisas sobre efeitos da exposição através de parâmetros de referência ou *endpoints* individuais como mortalidade ou imobilidade, posteriormente foram adotados parâmetros de referência ou *endpoints* populacionais como alterações na expectativa de vida e na reprodução. Estes são exemplos de *endpoints* de interesse em testes com exposição aguda ou crônica, facilmente realizáveis em

laboratório, e que possuem a vantagem de permitir um maior controle das variáveis testadas, se comparados aos testes realizados *in situ*, ou seja, em campo (STARK; BANKS, 2003).

A integração de parâmetros populacionais como referência em avaliação ecotoxicológica é considerada de maior relevância ecológica do que o uso exclusivo de *endpoints* a nível individual, já que incorpora um maior realismo aos testes (WALTHALL; STARK, 1997). A atual necessidade de prever os principais efeitos de agentes tóxicos em populações naturais e sistemas ecológicos tem propiciado o aparecimento de um grande número de modelos preditivos, incrementando o conjunto de modelos convencionalmente usados nas derivações mais reducionistas da ecotoxicologia que consideram os efeitos tóxicos a níveis moleculares, bioquímicos, celulares, teciduais e em organismos (FLYNN; PEREIRA, 2011).

Argumenta-se que muitos fenômenos ecológicos são contingenciados pelos organismos envolvidos e seus ambientes e, que muitos experimentos ecológicos só são válidos para o período, lugar e condições em que ocorrerem. Entretanto, a contingencia e a não reprodutibilidade experimental não são fato em todos os campos da ecologia. Há, na ecologia populacional, muitos princípios que podem ser consideradas gerais, com padrões e regras replicáveis, e várias linhas de evidência sugerem que o efeito de estressores em populações naturais possa ser adequadamente avaliado por modelagem populacional (FLYNN; PEREIRA, 2013b). O entendimento da dinâmica das populações deriva-se de conceitos estritamente biológicos e ecológicos que podem ser transformados em parâmetros matemáticos regentes do comportamento de determinadas equações ao longo do tempo (FUJIWARA; CASWELL, 2002; JAGER; KLOK, 2010; KRAMER et al., 2011; NOËL et al., 2006).

Simulações em computador revelam que concentrações subletais de um contaminante em nível individual podem facilmente conduzir a extinção local da população, já que parâmetros isolados de bioensaios não são adequados para prever efeitos em nível populacional (HALLAM; CANZIANI; LASSITER, 1993). Estudos experimentais têm encontrado efeitos significativos em populações

expostas a concentrações menores do que o valor de CL_{50} agudo em até duas ordens de magnitude (STARK; VARGAS; BANKS, 2015).

Endpoints populacionais são gerados através da construção de tabelas de vida que representam um sumário conciso das estatísticas demográficas de uma população (ALEGRETTI, 2015). As tabelas de vida são ferramentas utilizadas no estabelecimento da dinâmica de determinada população e podem ser: tempo-específico ou idade-específica. É mais relevante a construção da tabela de vida idade específica, obtida através da sobrevivência de uma coorte (indivíduos nascidos em um mesmo momento) através do acompanhamento de sua existência. Este acompanhamento é feito mais frequentemente em laboratório (FORBES; CALOW, 1999; WALTHALL; STARK, 1997) mas também pode ser realizado *in situ* (FLYNN; PEREIRA, 2013a; FORBES; CALOW, 1999; WALTHALL; STARK, 1997).

Através da confecção de tabelas de vida, vários parâmetros vitais de determinada população, como o período reprodutivo, a taxa líquida de reprodução, o risco de extinção, a taxa per capita de crescimento populacional, a fecundidade, a sobrevivência e o crescimento de jovens até a maturidade, são obtidos e podem ser utilizados como sinalizadores de alterações relativas ao ambiente em que as populações estão inseridas. Deste modo é possível estudar com maior precisão os efeitos de substâncias naturais ou sintéticas sobre uma população, sendo que os *endpoints* em estágios propícios a modelagem populacional como, por exemplo, tempo de eclosão ou taxa de crescimento juvenil, vêm sendo privilegiados (DEVAUX et al., 2011; LAWRENCE; POULTER, 2001).

Os testes baseados em respostas oriundas de tabela de vida, os chamados LTRE (Life Table Response Experiments), são capazes de avaliar as consequências da exposição aos contaminantes pela integração de uma grande quantidade de parâmetros demográficos. Sendo a tabela de vida completa a variável resposta, os efeitos da exposição são então medidos diretamente por meio de modelo demográfico aplicado ao cálculo dos índices demográficos (LEVIN et al., 1996). Nos LTRE são avaliados diversos parâmetros biológicos,

destacando-se o potencial reprodutivo (R_0), a taxa intrínseca de crescimento populacional (r), o tempo de geração (T) (CHEN et al., 2007).

O crescimento populacional e, em particular a taxa intrínseca de crescimento r , tem sido recomendado como endpoint preferencial, pois sua aplicação integra a idade específica de sobrevivência e a fecundidade em um único parâmetro, representado por um único valor ou número, o que torna a resposta populacional mais relevante e factível de ser integrada a modelos matemáticos (VAN LEEUWEN; LUTTMER; GRIFFIOEN, 1985).

A taxa instantânea de crescimento (r_i), medida direta do crescimento populacional em determinado intervalo de tempo, tem sido utilizada particularmente na avaliação da toxicidade de inseticidas (STARK; SUGAYAMA; KOVALESKI, 2007), já que, como a taxa intrínseca de crescimento (r), também integra os parâmetros demográficos sobrevivência e a fecundidade. O uso de r_i se mostra muito adequado pela sua eficiência e rapidez na obtenção dos resultados, dispensando a confecção da tabela de vida propriamente dita (KIM et al., 2006; KRAMARZ; BANKS; STARK, 2007; MOURÃO et al., 2004; POLETTI; COLLETTE; OMOTO, 2009; TSOLAKIS; RAGUSA, 2008; VENZON et al., 2007). Além do mais, os testes de toxicidade comparando ambos os endpoints (r e r_i) têm conduzido a resultados semelhantes (WALTHALL; STARK, 1997).

Desenvolvimentos recentes nas análises populacionais têm refinado o entendimento em relação aos determinantes das taxas de crescimento populacional e estabelecido uma conexão entre a teoria e os resultados obtidos em testes tanto de laboratório como de campo. Com isso, se desenvolve a percepção de efeitos subletais nas avaliações do risco ecológico, que de outra maneira são facilmente mascaráveis por resultados de ensaios conduzidos unicamente com parâmetros individuais. Como consequência, tem havido um crescente interesse na aplicação da teoria de populações em ensaios ecotoxicológicos (SIBLY; HONE, 2002), já que de uma perspectiva ecológica, os sistemas de maior preocupação são os grupos coletivos de organismos, ou seja, as populações.

Aspectos do processo reprodutivo estão diretamente relacionados com o futuro de uma população, ou seja, as próximas gerações. Machos gamarideos podem usar duas estratégias para o pareamento sexual: a) carregam seus pares até que elas estejam prontas para a muda; ou b) apenas saem a procura de fêmeas na época da muda. A primeira estratégia é a usada pela *Hyalella azteca*, comportamento característico de espécies onde a fecundação se dá em período de tempo restrito (HUME et al., 2005). Aparentemente para o gênero *Hyalella* não existe sinal químico, ambiental ou endócrino, que indique o início da pré-copula (THIEL, 2011). Embora os machos estejam prontos para o amplexo em qualquer período de seu ciclo, os custos energéticos para as fêmeas são maiores e, portanto, a menor duração deste comportamento é evolutivamente mais efetiva para elas (COTHRAN; JEYASINGH, 2010). O período de copula propriamente dito é curto e o casal se separa logo após a fecundação dos ovos. Uma vez fecundados, os ovos se desenvolvem no marsúpio, em desenvolvimento direto, eclodindo jovens com morfologia básica semelhante a do adulto, embora sem as características secundárias (STEELE; STEELE, 1991).

O gênero *Hyalella* Smith (1874) compreende espécies exclusivamente de água doce, endêmicas do continente americano. Pertence à família Hyalellidae, segundo a classificação taxonômica mais recente (LOWRY; MYERS, 2013). As espécies deste gênero podem ser encontradas em grande variedade de ambientes, como rios, lagos, áreas úmidas e córregos. São os únicos anfípodos límnicos epígeos da região Neotropical (TORRES, 2012). Alimentam-se de algas e bactérias associadas ao sedimento e às macrófitas aquáticas, além de detritos animais e vegetais em decomposição, facilitando o fluxo de energia no ambiente aquático e atuando diretamente na conversão de energia de detritos em matéria orgânica fina particulada (PEREIRA, 2014).

Hyalella azteca tem sido amplamente utilizada em testes de ecotoxicologia (NELSON; BRUNSON, 1995). Algumas características a torna adequada para experimentos LTRE: apresenta populações abundantes, os indivíduos são facilmente cultivados em laboratório, tem ciclo de vida curto e tempo curto de geração, responde de forma rápida às mudanças no meio

ambiente, e é sensível a diversas classes de contaminantes (WANG; GOULET; CHAPMAN, 2004).

Tradicionalmente, os anfípodas denominados como *H. azteca* foram considerados, com base em semelhança morfológica, como uma única espécie distribuída por toda a América do Norte e América Central, e na porção norte da América do Sul. Variações em tamanho de corpo e estratégia de vida têm sido reportadas para diferentes populações de *H. azteca* (FRANCE, 1992; MAJOR, 2012; STRONG, 1972). Diversos autores pesquisando estas variações (WELLBORN; BROUGHTON, 2008; WELLBORN; COTHRAN; BARTHOLF, 2005; WELLBORN, 1995a, 1994a, 1994b, 1995b) reportaram a evolução de espécies provisórias com os fenótipos - corpo pequeno e corpo grande - como o resultado de pressão seletiva associada ao risco de predação. Estudos recentes com diferentes marcadores moleculares revelam que na verdade *H. azteca* representa um complexo de espécies crípticas composto de pelo menos 33 espécies provisórias (DIONNE et al., 2011), o que se coloca como um fator complicador na interpretação dos resultados de testes, já que comprovadamente respostas a um contaminante apresentam forte dependência genética (DUAN et al., 1995; GUTTMAN, 1994).

OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi descrever a estratégia reprodutiva e a dinâmica populacional de *Hyalella azteca* sob condições de cultivo em laboratório, e obter parâmetros populacionais adequados como *endpoints* em testes de ecotoxicidade. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Obtenção da tabela de vida idade específica pelo acompanhamento de uma coorte de *H. azteca*;
- Estabelecimento da estrutura por classe de idade, da fecundidade (número médio de ovos produzidos), da razão sexual, da taxa líquida de reprodução, da taxa de sobrevivência, do potencial reprodutivo, da taxa intrínseca de crescimento da coorte e das taxas instantâneas de crescimento da coorte;
- Estabelecimento da relação comprimento de cefalotórax e número de ovos ou juvenis no marsúpio;
- Identificação do morfotipo de *H. azteca* cultivada no LEAL;
- Estabelecimento de critérios de aceitabilidade do ensaio com *H. azteca* a partir de parâmetros populacionais gerados para a população teste, de forma a eliminar a divergência genética; e
- Formulação de recomendações para o design de teste de toxicidade crônico com *H. azteca* em abordagem populacional.

MATERIAL e MÉTODOS

Metodologia Padrão de Cultivo

O cultivo de *Hyalella azteca* realizado no LEAL (Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes) da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, Limeira, vem sendo feito rotineiramente em condições estabelecidas pela ABNT (2013), pela norma da Agencia Ambiental do Canada (ENVIRONMENT CANADA, 2013) e seguindo alguns métodos utilizados por ARAÚJO (2005). As populações de cultivo se desenvolvem em recipientes de vidro contendo 2 litros de água de cultivo (Meio MS) com as características previstas nas normas já mencionadas. Os recipientes de vidro são mantidos em incubadoras com temperatura controlada de aproximadamente 23°C e aeração branda, individual para cada recipiente, com mangueiras ligadas a um compressor de ar (Figura 2). O foto-período da incubadora é controlado, com 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com intensidade luminosa de 500 a 1000 lux. Em alguns recipientes é utilizado como substrato a macrófita Elódea (*Egeria densa*) e em outros se utiliza uma rede de nylon (10 cm por 10 cm). O meio de cultivo é trocado semanalmente e os recipientes são lavados utilizando-se apenas água destilada e uma esponja.



Figura 2. Incubadora para as culturas de *H. azteca*

São administrados dois tipos de alimentos compostos, um sólido e outro líquido. O alimento sólido, fornecido três vezes por semana, é preparado com rações de peixe, de derivação animal e vegetal, e ração de coelho, maceradas em um cadinho com auxílio de um pistilo. O alimento líquido, fornecido diariamente, é feito com a mistura de ração de peixe fermentada, fermento seco, óleo de prímula e água destilada.

Os registros fotográficos dos indivíduos foram realizados com o auxílio de uma câmera fotográfica digital acoplada a um microscópio estereoscópico

(Figura 3 a). O software “Image Tool” (Figura 3 b) foi utilizado para a medição do tamanho corpóreo dos indivíduos.



Figura 3. a) Microscópio estereoscópico com câmera fotográfica acoplada, utilizada para a realização de todas as fotografias; b) Imagem apresentando a medição do comprimento do cefalotórax de um indivíduo macho de *H. azteca* através do software Image Tool

Estabelecimento da Coorte

A partir das culturas do laboratório, foram separados 10 casais de *H. azteca* em comportamento de amplexo copulatório (Figura 4b), denominados Geração Parental ou P1. Os casais foram colocados em béqueres, um casal por béquer (Figura 4f), contendo 150 ml do mesmo meio de cultivo utilizado nas culturas do laboratório, com aeração branda. Foi adicionado também, um ramo de Elódea (de aproximadamente 5 cm) em cada béquer, como substrato e suporte alimentar, além da administração diária das rações preparadas no laboratório. O meio de cultivo foi trocado diariamente, assim como feita a lavagem de cada béquer com água destilada.

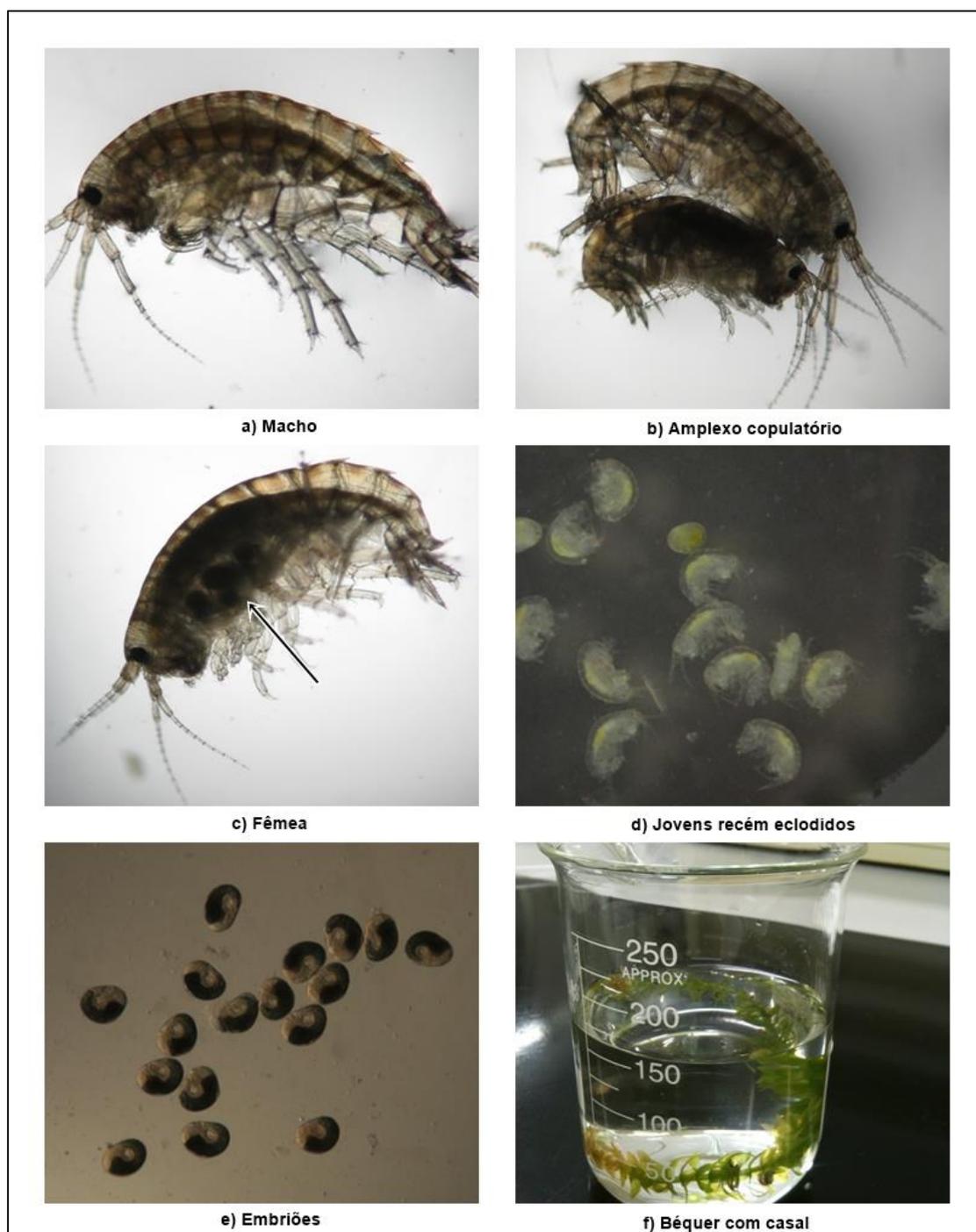


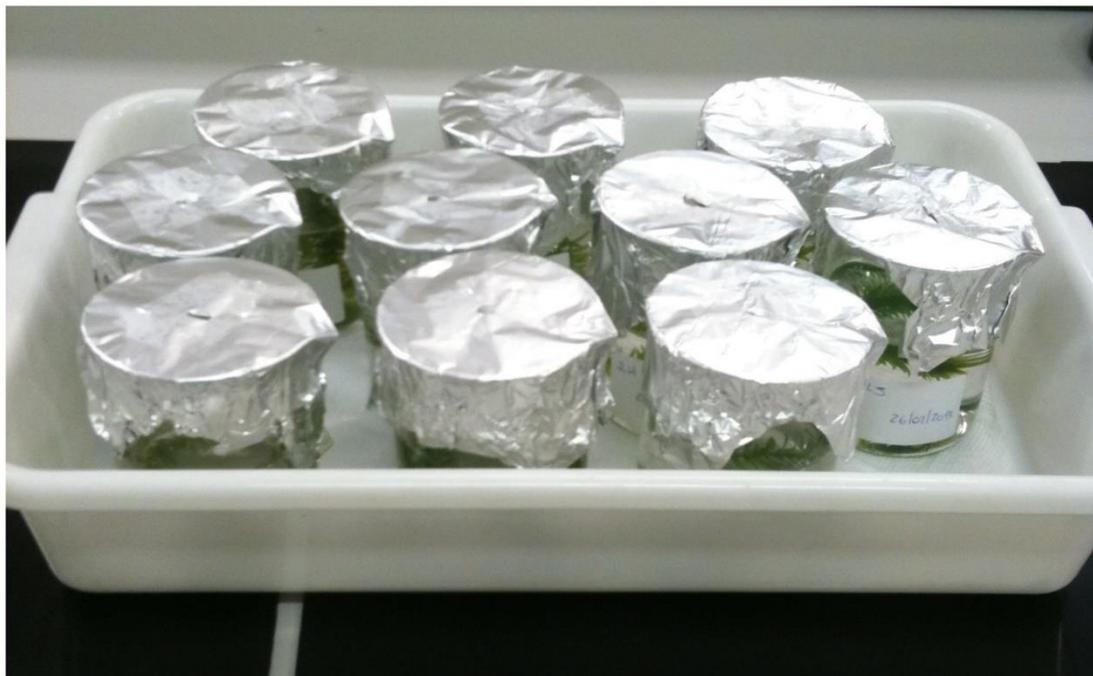
Figura 4. a) Indivíduos macho com aproximadamente 3mm de tamanho corpóreo total; b) Macho e fêmea em comportamento de amplexo copulatório; c) Indivíduo fêmea com aproximadamente 2,5mm de tamanho corpóreo total. Seta indica os ovos no marsúpio; d) Jovens recém eclodidos com aproximadamente 1mm de tamanho corpóreo total; e) Ovos com embriões em desenvolvimento; f) Béquer com meio de cultivo e ramo de Elódea para o acompanhamento da reprodução dos indivíduos.

Os machos da P1 (Figura 4a) foram retirados de seus respectivos béqueres (Figura 5a) e devolvidos ao recipiente de cultivo assim que o tempo de

fertilização terminava, ou seja, no momento em que o macho liberava a fêmea do amplexo copulatório (Figura 4b). Permanecia, assim, apenas a fêmea P1 dentro de cada béquer, fecundada ou não. As fêmeas P1 (Figura 4c e 4f) somente foram retiradas do béquer quando da eclosão dos ovos (Figura 4e) em seus marsúpios e da liberação de todos os neonatos (Figura 4d), denominados Geração Filial 1 ou F1. A partir desse momento, permaneceram em seus respectivos béqueres, apenas a F1, ou seja, a coorte a ser estudada.

Foi estabelecido, tendo respaldo estatístico, a seleção aleatória de três neonatos de cada béquer para a realização da média do tamanho corpóreo dos recém-nascidos. Após serem fotografados e medidos, os neonatos foram devolvidos vivos aos seus respectivos recipientes.

Após a liberação por parte das fêmeas de todos os filhotes, estes foram reunidos em um mesmo recipiente de vidro (Figura 5b) contendo 2 litros de água de cultura com procedimentos de manutenção idênticos aos das culturas do laboratório, com troca, lavagem e contagem dos indivíduos realizada uma vez por semana.



a) 10 béqueres com os casais P1



b) Recipiente com a coorte em desenvolvimento

Figura 5. a) Disposição dos 10 béqueres, cada um com um casal parental (P1), para o acompanhamento da reprodução da F1. b) Recipiente de vidro contendo 2 litros de meio de cultivo e ramos de Elódea, onde foram reunidos todos os indivíduos da F1, ou seja, a coorte acompanhada.

Além da contagem semanal do número total de indivíduos, foram anotadas as seguintes totalizações: número de machos, número de fêmeas, número de fêmeas ovígeras, número de indivíduos imaturos, número de pares em amplexo copulatório e número aproximado de jovens nascidos. Conforme os indivíduos da coorte analisada iam se reproduzindo, os neonatos eram retirados do aquário e distribuídos nas culturas mantidas no laboratório, para a manutenção no recipiente apenas dos indivíduos da coorte, ou seja, a geração F1.

Todos os indivíduos da coorte foram fotografados em intervalo aproximado de 15 dias, para posterior mensuração de seus tamanhos. A medição do cefalotórax, em milímetros, de todos os indivíduos da coorte, através de seus registros fotográficos, foi realizada com o fim de agrupá-los em classes de tamanho, de acordo com o seu crescimento ao longo do tempo, determinando assim, as faixas de idade ou classes etárias. Como todos os indivíduos utilizados neste experimento nasceram no mesmo período, com no máximo três dias de diferença entre eles (de acordo com a metodologia mencionada em “Construção da Tabela de Vida”), todos pertencem à mesma classe etária, caracterizando assim uma coorte. Dessa forma, as classes etárias foram separadas por dia em que foram realizadas as medições de todos os indivíduos, ou seja, faixas de idade/tamanho de 15 em 15 dias.

Estes procedimentos foram realizados ao longo de aproximadamente 8 meses, desde o monitoramento dos casais parentais, em fevereiro de 2013, até a morte do último indivíduo da coorte, em outubro de 2013.

Como complementação experimental, foi realizada uma estimativa do número de ovos por fêmea para obtenção da relação tamanho de fêmea e número de ovos produzidos para a espécie *H. azteca* cultivada no LEAL – FT UNICAMP. Como havia a necessidade de sacrificar as fêmeas para a contagem dos ovos, tal amostra não foi realizada com os indivíduos da coorte, mas sim com fêmeas de outras culturas da mesma espécie mantidas no laboratório. A retirada das fêmeas ovígeras nos aquários de cultura foi feita aleatoriamente com a coleta de ramos de Elódea de 20 cm. Assim, foram amostradas 61 fêmeas de tamanhos variados, ou seja, de todas as classes etárias maduras.

As fêmeas ovígeras foram fotografadas para medição de seus tamanhos corpóreos e posterior classificação em classes etárias. Foi utilizado o método de resfriamento para anestésias as fêmeas ovígeras e com auxílio do microscópio estereoscópico e um conjunto de pinças, foram retirados e contados os ovos de cada fêmea. Assim, foi possível realizar a correlação entre o tamanho da fêmea (sua classe etária) e a quantidade de ovos produzidos, isto é, a fecundidade.

Para a modelagem populacional, e na inserção dos dados de fecundidade por classe etária na tabela de vida, foram utilizados os valores obtidos pela aplicação da função-potência sugerida por Flynn e colaboradores (2008) como descrito na metodologia a seguir na seção Construção de Tabela de Vida.

Classificação do Morfotipo

A classificação do morfotipo da *H. azteca* cultivada no LEAL de acordo com os fenótipos - corpo pequeno e corpo grande – foi baseada em dados de medidas de tamanho corporal relativas ao número de ovos por ninhada e comparados ao gráfico gerado por Wellborn e Broughton (2008). As medidas de cefalotórax, cabeça e corpo total, assim como número de ovos, foram realizadas no grupo de 61 fêmeas retiradas de culturas mantidas no LEAL. Para estas medidas foram obtidas as equações de reta que permitiram a extrapolação de dados para toda a coorte experimental.

Construção da Tabela de Vida

Houve a necessidade de realizar uma adaptação para a inserção dos dados na tabela de vida, visto que o intervalo de tempo entre o nascimento dos jovens de cada casal parental foi maior que 3 dias, intervalo adotado para que todos os indivíduos da prole fossem considerados da mesma classe etária, ou seja, pertencentes a mesma coorte.

Este intervalo de tempo foi adotado após a evidencia, obtida com a medição de todos os indivíduos da prole dos casais parentais, de que intervalos maiores descaracterizam a geração, pois a diferença de tamanhos observada já estabelecia, em momento inicial, a existência de subgrupos de tamanhos/idade diferentes. Dessa forma, através do tamanho e dos registros do dia de nascimento de todos os indivíduos, estabeleceu-se uma coorte com parte adequada da prole total gerada, de modo que, apenas os jovens que nasceram com intervalo inferior a três dias e que, por conseguinte, estavam dentro da mesma faixa de tamanho, constituíram efetivamente a coorte a ser estudada.

Como nas tabelas de vida são inseridas apenas as taxas de mortalidade e sobrevivência das fêmeas, foi aplicada a razão sexual da prole total relativa ao número de indivíduos da coorte. Por convenção, estipula-se um número de 1000 indivíduos para a obtenção do valor do número de indivíduos inicial (N_0) padronizado (FLYNN; VALÉRIO-BERARDO; PEREIRA, 2008). Obtém-se assim os valores da primeira coluna (N_x) que representa o número de sobreviventes para cada classe etária correspondente. A segunda coluna (S_x) representa a proporção de sobreviventes entre a respectiva classe etária a classe anterior e foi calculada pela fórmula: $S_x = N_x/N_{x-1}$. A terceira coluna (l_x) refere-se à proporção de sobreviventes e foi calculada pela fórmula: $l_x = N_x/N_0$. A próxima coluna (D_x) apresenta o número de indivíduos que morreram entre a classe etária correspondente e a anterior, sendo calculada por: $D_x = N_x - N_{x+1}$. A quinta e última coluna (q_x) refere-se à probabilidade de morte entre uma faixa de idade e a imediatamente anterior ($q_x = D_x/N_x$) (GOTELLI, 2007).

Após a compilação da tabela de vida, foi elaborada a tabela de fecundidade (m_x). As informações da fecundidade (número médio de ovos produzidos por fêmea para cada classe etária) foram obtidas através da utilização da função-potência, que relaciona o comprimento da fêmea (mm) e o tamanho da ninhada (FLYNN; VALÉRIO-BERARDO; PEREIRA, 2008), aplicada ao grupo de fêmeas da coorte:

$$m_x = NE = 0,11 \cdot L(mm)^{3,25}$$

O potencial reprodutivo (R_0), ou seja, o número de fêmeas que cada fêmea irá gerar em média ao longo de sua vida, foi calculado pela soma do produto $lx.mx$.

$$R_0 = \sum lxmx$$

O tempo de geração (T), que representa a estimativa do tempo (neste caso em quinzenas) que a coorte leva para gerar a próxima geração, foi calculado pela divisão da soma do produto de $lx.mx.X$ pelo R_0 .

$$T = \frac{\sum lxmxX}{R_0}$$

A taxa intrínseca de crescimento (r) foi calculada pelo logaritmo natural de R_0 dividido pelo tempo de geração.

$$r = \frac{\ln(R_0)}{T}$$

Acompanhamento do Crescimento Populacional

Dezesseis indivíduos (8 machos e 8 fêmeas), em comportamento de amplexo copulatório, foram selecionados aleatoriamente das culturas do laboratório. Os indivíduos foram mantidos em um mesmo recipiente com 2 litros de meio de cultivo, seguindo as metodologias de cultivo do laboratório, ao longo de 9 semanas, juntamente com toda a prole que foi sendo gerada (F1, F2, F3, etc.) sem a retirada de nenhum indivíduo, diferentemente do realizado no experimento para o estabelecimento da coorte. A manutenção do aquário, contagem e sexagem dos indivíduos foi realizada quinzenalmente.

Este acompanhamento do crescimento da população se fez necessário para a obtenção das informações de capacidade suporte para a população de *H. azteca* característica do recipiente padrão do laboratório (aquário com 2 litros de meio de cultivo) e para o cálculo da Taxa Instantânea de Crescimento (r_i) da população nestas condições. A capacidade suporte de todos os recipientes utilizados no laboratório para o cultivo de *H. azteca* passou a ter como base as informações obtidas a partir dos resultados deste experimento.

Com o número de indivíduos contados a cada semana, foram calculadas as r_i para diferentes intervalos de tempo, através do resultado do logaritmo natural da divisão do número de indivíduos na população em um determinado tempo pelo número inicial de indivíduos, dividido pelo tempo a qual se refere o r_i (WALTHALL; STARK, 1997), conforme a equação abaixo:

$$r_i = \frac{\ln\left(\frac{Nt}{N0}\right)}{t}$$

Dessa forma foi possível determinar o menor período de tempo que uma determinada população leva para atingir um r_i equivalente numericamente ao r calculado por construção de tabela de vida idade específica.

Foram elaboradas também, as curvas logísticas para a população acompanhada, utilizando as taxas instantâneas de crescimento (r_i) de determinados períodos de tempo e a taxa de crescimento intrínseca (r) obtida através da tabela de vida. A fórmula para obtenção da curva logística segue descrita abaixo:

$$N(t) = K / \left[1 + \frac{K - N_0}{N_0} \right] e^{-rt}$$

RESULTADOS

Acompanhamento da Coorte

Dos dez casais parentais, separados para o estabelecimento da coorte, sete fêmeas foram fecundadas por seu respectivo macho, gerando um total de 108 jovens. O número máximo e o mínimo de jovens eclodidos dentre as sete fêmeas foram de 27 e 1, respectivamente, com número médio de 15,43 jovens por fêmea e desvio padrão de 8,94 (Tabela 1).

Tabela 1. Número de jovens eclodidos no início do experimento por cada fêmea parental e média de jovens por fêmea

Fêmea	1	2	3	4	5	6	7	Total	Média	Desvio Padrão
Número de jovens	7	17	27	23	18	15	1	108	15,43	8,94

O nascimento da prole que gerou o total de 108 jovens de sete fêmeas ocorreu ao longo de 3 semanas. Dos 108 jovens, 77 constituíram a coorte monitorada, pois nasceram em um intervalo até no máximo de 3 dias, seguindo a metodologia descrita na metodologia para caracterização da coorte.

Uma amostra de 35 dos 108 indivíduos foi utilizada para obter a média do tamanho dos neonatos no período em que foram liberados do marsúpio. Esta média foi de 0,78mm de cefalotórax, com valor mínimo de 0,54mm e máximo de 0,92mm na primeira semana de vida após liberação do marsúpio.

Com os 77 jovens já alocados em um mesmo aquário, a partir do dia 18 de março de 2013, a coorte se manteve por mais 8 meses. A Tabela 2 apresenta o decaimento da coorte, ou seja, foi contado o número de indivíduos remanescentes nas datas em que a cultura foi manipulada para a medição dos tamanhos corpóreos.

Tabela 2. Número de indivíduos vivos na coorte nas datas estabelecidas para manipulação e contagem dos indivíduos.

Data	Número de Indivíduos
18 de março	77
30 de março	76
17 de abril	73
08 de abril	71
28 de abril	67
12 de junho	64
27 de junho	42
11 de julho	37
23 de julho	31
07 de agosto	27
23 de agosto	19
05 de setembro	10
19 de setembro	6
03 de outubro	6
17 de outubro	5
24 de outubro	0

A Figura 6 indica o declínio da coorte causado pela morte dos indivíduos ao longo do tempo.

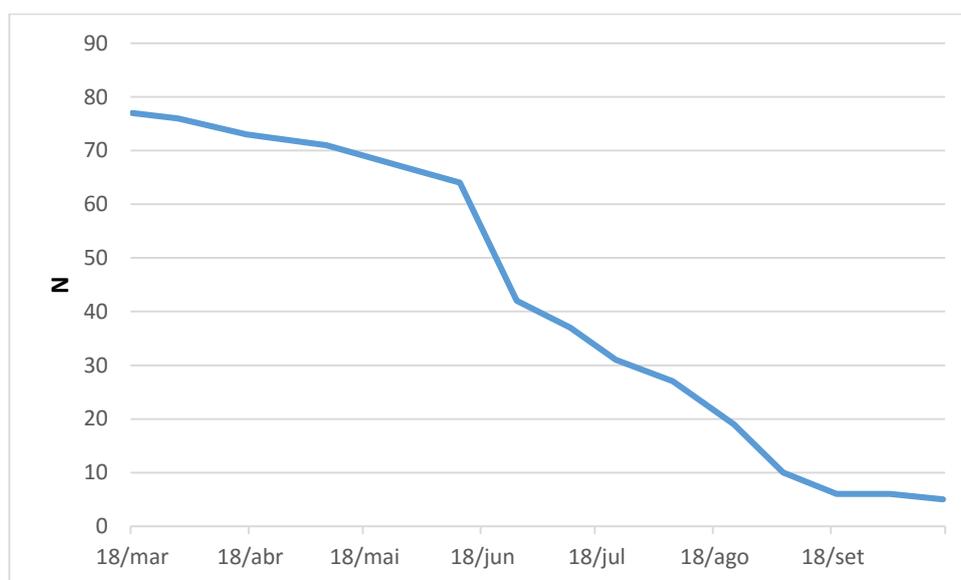


Figura 6. Declínio da coorte ao longo do tempo. N: número de indivíduos.

A razão sexual calculada utilizando-se toda a prole da Geração Parental (P1) foi de 1:0,94, ou seja, 56 machos e 52 fêmeas.

Nos anfípodas, há uma correlação entre o tamanho do cefalotórax e o tamanho total de seu corpo. Esta correlação, com valor de 0,92 e representada por equação linear obtida pela mensuração de indivíduos da coorte avaliados está apresentada na Figura 7.

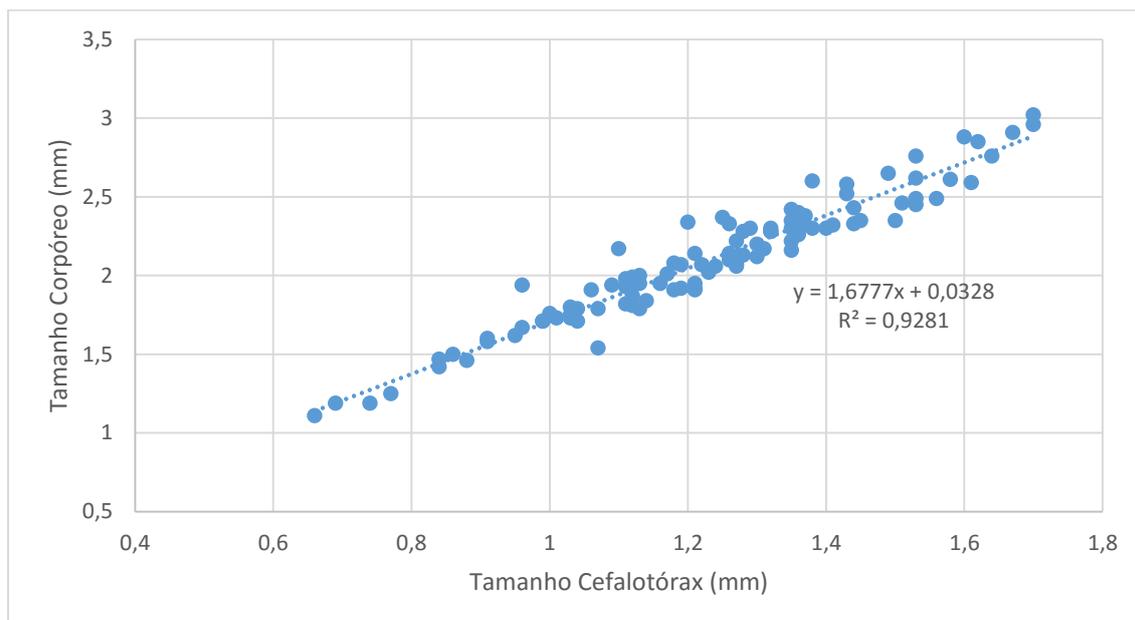


Figura 7. Correlação entre o tamanho do cefalotórax e o tamanho total do corpo de indivíduos de *Hyalella azteca*.

Foram realizadas medidas de comprimento do cefalotórax em todos os indivíduos da coorte representando a geração filial (F1) em 14 datas diferentes, correspondendo a períodos de 15 dias aproximados, ao longo dos 8 meses, tempo que levou até que o último representante da coorte morresse. Destas medidas foram obtidas a média do tamanho de cefalotórax correspondente a idade dos indivíduos. O processo de crescimento dos indivíduos da coorte, pela medida do cefalotórax médio e respectivo erro padrão, pode ser visualizado graficamente, ao longo do tempo na Figura 8.

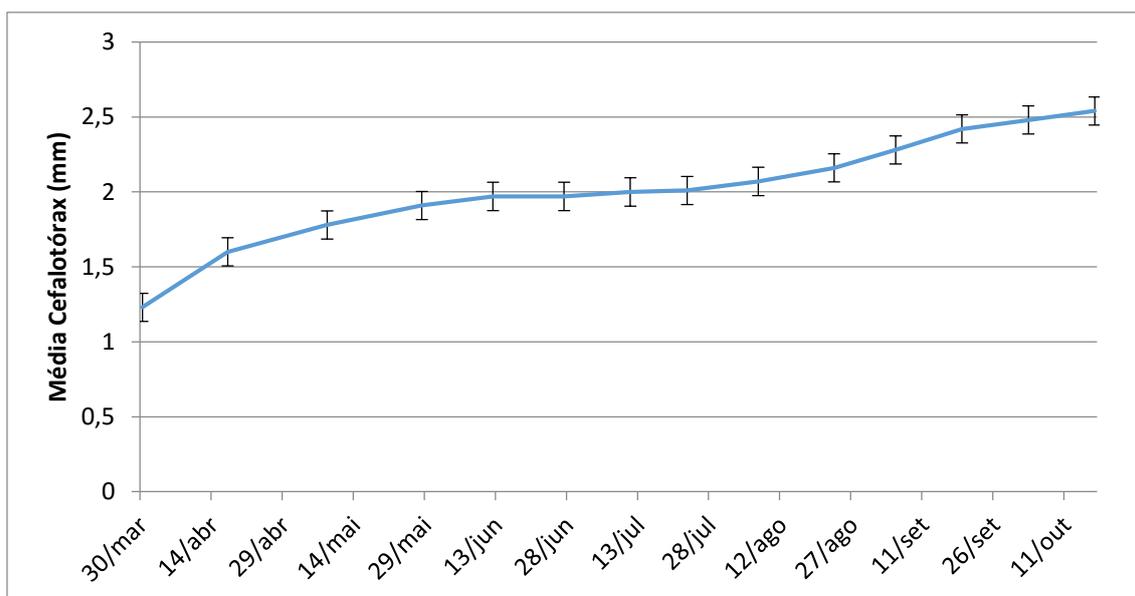


Figura 8. Valores médios do crescimento dos indivíduos da coorte monitorada e erro padrão das medidas tomadas em cada data ao longo do tempo de desenvolvimento do experimento.

Fecundidade e Classificação do Morfotipo

Para o estabelecimento da relação tamanho da fêmea/números de ovos produzidos foi utilizado um grupo de 61 fêmeas, de tamanhos variados, pertencentes as culturas de *H. azteca* mantidas no laboratório LEAL, para a contagem dos ovos fecundados em seus marsúpios e medida do tamanho da fêmea geradora.

O número de ovos por fêmea e seu respectivo tamanho de cefalotórax em milímetros estão listados na Tabela 3, gerando uma média de 9,6 +/- 7,07 por fêmea.

Tabela 3. Número de ovos por fêmea e respectivo tamanho de cefalotórax em milímetros. N: número; CT: cefalotórax; DesvPad: desvio padrão.

Fêmea	N ovos	CT (mm)	Fêmea	N ovos	CT (mm)	Fêmea	N ovos	CT (mm)	Fêmea	N ovos	CT (mm)
1	2	1,19	17	4	1,51	33	4	1,84	49	23	2,25
2	5	1,31	18	5	1,53	34	4	1,88	50	16	2,26
3	1	1,34	19	4	1,54	35	12	1,92	51	12	2,26
4	7	1,34	20	7	1,55	36	6	1,97	52	18	2,28
5	6	1,36	21	5	1,57	37	13	1,98	53	23	2,34
6	3	1,38	22	2	1,58	38	19	1,99	54	30	2,35
7	5	1,4	23	4	1,6	39	14	1,99	55	15	2,36
8	2	1,41	24	4	1,61	40	8	2	56	26	2,4
9	3	1,42	25	3	1,62	41	2	2,03	57	15	2,46
10	4	1,43	26	3	1,62	42	16	2,06	58	18	2,64
11	5	1,43	27	10	1,64	43	14	2,07	59	24	2,68
12	7	1,44	28	5	1,64	44	15	2,09	60	20	2,71
13	6	1,44	29	7	1,65	45	17	2,14	61	15	2,77
14	4	1,44	30	6	1,67	46	11	2,18	Total	588	
15	5	1,49	31	3	1,67	47	15	2,21	Média	9,63	1,84
16	6	1,49	32	5	1,72	48	15	2,21	DesvPad	7,07	0,41

A correlação entre o tamanho do corpo da fêmea e o número de ovos produzidos por ninhada está apresentada na Figura 9, juntamente com a equação da reta e o valor de R^2 .

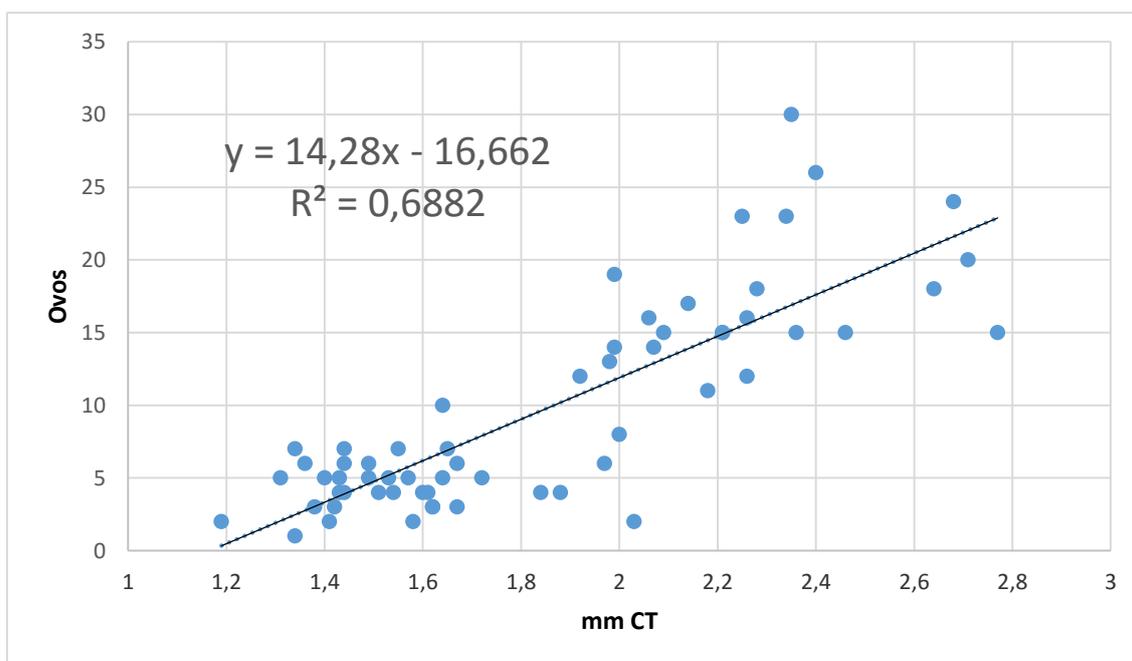


Figura 9. Linha de tendência, equação da reta e valor de R-quadrado entre o tamanho do indivíduo e a quantidade de ovos carregados no marsúpio.

As medidas de tamanho corporal realizadas relativas ao número de ovos por ninhada estão expostas na Tabela 5.

Tabela 4. Medidas médias do tamanho do cefalotórax, da cabeça e do número de ovos para as fêmeas da coorte acompanhada.

Data	Medida média de Cefalotórax (mm)	Medida média da Cabeça (mm)	Número médio de ovos
30 de março	1,19	-	-
17 de abril	1,57	-	-
08 de maio	1,76	-	-
28 de maio	1,88	0,340	10,1844
12 de junho	1,95	0,352	11,184
27 de junho	1,99	0,359	11,7552
11 de julho	2,00	0,371	11,898
23 de julho	2,03	0,376	12,3264
07 de agosto	2,07	0,384	12,8976
23 de agosto	2,17	0,396	14,3256
05 de setembro	2,28	0,416	15,8964
19 de setembro	2,41	0,440	17,7528
03 de outubro	2,47	0,451	18,6096
17 de outubro	2,54	0,464	19,6092

As medidas do tamanho da cabeça (comprimento em milímetros da cabeça) e número de ovos produzidos pelo morfotipo de *H. azteca* cultivada no LEAL foram colocadas em gráfico (Figura 10) na mesma composição de eixos utilizada por Wellborn e Broughton (2008) na representação de seus resultados a fim de comparar o morfotipo cultivado no LEAL aos definidos pelos autores como fenótipo corpo pequeno e fenótipo corpo grande. O morfotipo do LEAL apresenta tamanho da cabeça compatível com o morfotipo corpo pequeno e número de ovos por ninhada compatível com o morfotipo corpo grande definidos por Wellborn e Broughton.

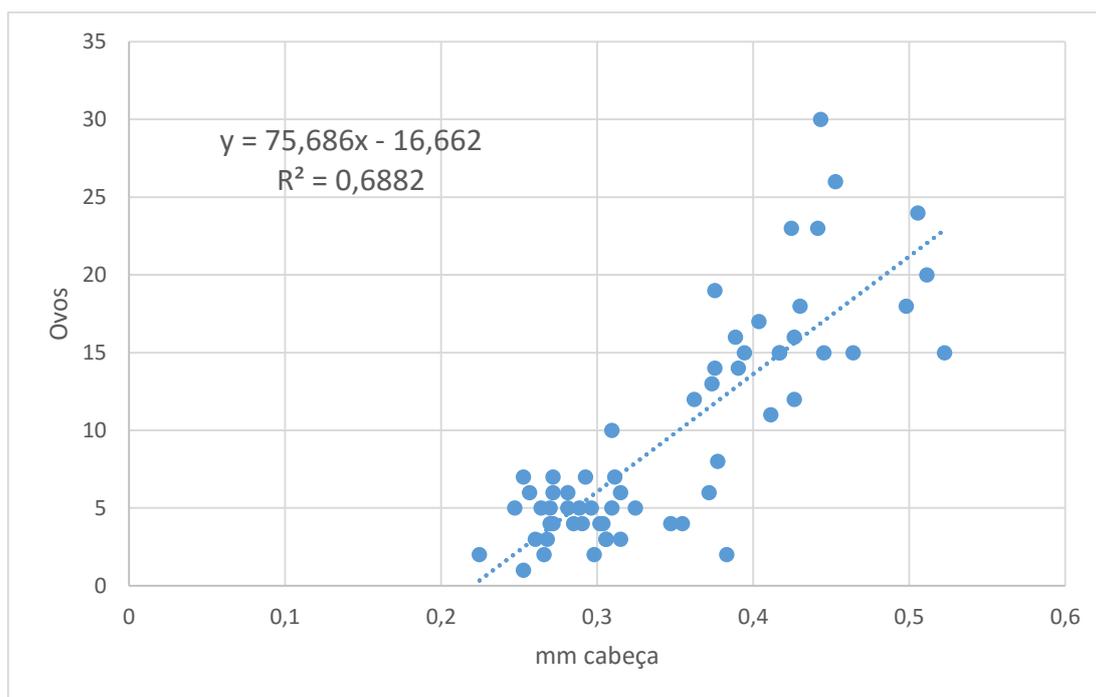


Figura 10. Pontos obtidos da relação entre tamanho de cabeça (em mm) e número de ovos por ninhada para fêmeas das culturas de *Hyalella asteca* do LEAL.

Tabela de Vida e Parâmetros de Referência

A tabela de vida e a tabela de fecundidade da coorte acompanhada estão apresentadas na Tabela 5. A primeira coluna, denominada “x”, que indica o tempo, refere-se as classes etárias, divididas de 15 em 15 dias, datas em que as medidas de tamanho dos indivíduos foram feitas. A segunda coluna indica o intervalo de tamanho dos indivíduos na classe etária correspondente. As colunas que se seguem, denominadas “Nx”, Sx, “lx”, “Dx” e “qx” representam, respectivamente, para cada classe etária, o número de indivíduos vivos (padronizado inicialmente em 1000), a proporção de sobreviventes, o número de indivíduos mortos e a taxa de mortalidade.

Tabela 5. Tabela de vida e de fecundidade da coorte monitorada. Nx: número de indivíduos em cada classe etária; Sx: proporção de sobreviventes entre a respectiva classe etária e a classe anterior; lx: proporção de sobrevivente da classe etária em relação ao N inicial; Dx: número de mortes entre a respectiva classe etária e a classe anterior; qx: probabilidade de morte entre a classe etária correspondente e a anterior; mx: número médio de ovos produzidos por fêmea para a classe etária correspondente.

X (Tempo)	Intervalo de Tamanho	Tabela de Vida					Tabela de Fecundidade		
		Nx	Sx	lx	Dx	qx	mx	lx*mx	lx*mx*X
0	0 - 0,91	1000,00	0,99	1,00	12,99	0,01	0,01	0,01	0,01
1	0,91 - 1,4	987,01	0,96	0,99	38,96	0,04	0,18	0,17	0,33
2	1,34 - 1,78	948,05	0,97	0,95	25,97	0,03	0,47	0,41	1,24
3	1,45 - 1,95	922,08	0,94	0,92	51,95	0,06	0,62	0,55	2,18
4	1,6 - 2,07	870,13	0,96	0,87	38,96	0,04	0,79	0,62	3,10
5	1,65 - 2,1	831,17	0,66	0,83	285,71	0,34	0,85	0,61	3,65
6	1,74 - 2,17	545,45	0,88	0,55	64,94	0,12	0,97	0,42	2,97
7	1,75 - 2,22	480,52	0,84	0,48	77,92	0,16	1,02	0,44	3,51
8	1,85 - 2,23	402,60	0,87	0,40	51,95	0,13	1,12	0,40	3,64
9	1,91 - 2,25	350,65	0,70	0,35	103,90	0,30	1,19	0,36	3,63
10	1,99 - 2,31	246,75	0,53	0,25	116,88	0,47	1,32	0,28	3,10
11	2,14 - 2,38	129,87	0,60	0,13	51,95	0,40	1,56	0,17	2,06
12	2,2 - 2,57	77,92	0,83	0,08	12,99	0,17	0,01	0,01	0,01
13	2,3 - 2,64	64,94	0,00	0,06	64,94	1,00	0,18	0,17	0,33
14	2,41 - 2,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,41	1,24

A partir dos dados da tabela de fecundidade foram calculados os valores do potencial reprodutivo (R_0), tempo de geração (T) e taxa de crescimento intrínseco (r). Resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores do potencial reprodutivo (R_0), tempo de geração (T) e taxa de crescimento intrínseco (r) da geração de *Hyalella azteca* monitorada.

Parâmetro demográfico	Valor
Potencial Reprodutivo (R_0)	4,70 fêmeas produzidas por fêmea
Tempo de Geração (T)	6,94 quinzenas
Taxa de crescimento intrínseco (r)	0,26 per capita per quinzena

Acompanhamento do Crescimento Populacional e Taxa Instantânea de Crescimento (ri)

Com relação ao experimento relativo à verificação do crescimento populacional foram gerados, ao longo das 9 semanas de acompanhamento, 511 indivíduos, a partir de 8 casais parentais. O número de indivíduos contados a cada semana está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Experimento de crescimento populacional. Número de indivíduos por tempo transcorrido do experimento marcado em semanas.

Tempo (semanas)	Número de Indivíduos
0	16
1	59
2	120
3	148
4	196
5	214
6	262
7	377
8	489
9	511

O crescimento populacional durante as 9 semanas de experimento se comportou de maneira exponencial (Figura 9), como é esperado inicialmente para populações cultivadas em ambientes controlados, sem predação e com aporte alimentar ilimitado. Observa-se também o início da estabilização da densidade da população na 9ª semana, quando a curva começa a atingir um patamar de estabilização numérica, atingindo a capacidade suporte do ambiente (K).

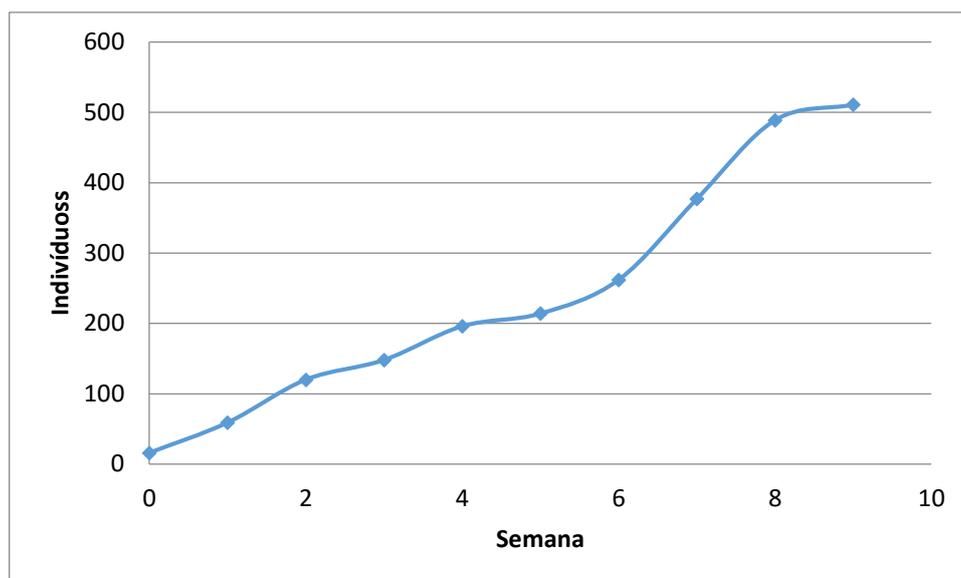


Figura 9. Crescimento exponencial da população ao longo de 9 semanas

Entre a 8ª e 9ª semana de acompanhamento, quando a população atingiu tamanho de 511 indivíduos, foram registrados comportamentos de canibalismo e o meio de cultivo não permanecia com qualidade suficiente para sustentar a população mesmo após a manutenção semanal. Sendo assim, com o término do experimento, a capacidade suporte dos aquários utilizados para cultivo no laboratório foi estimada com base nessas informações, ou seja, 250 indivíduos por litro. Considerando que cada recipiente possui 2 litros de meio de cultivo, a capacidade suporte corresponderia a 500 indivíduos por aquário.

As informações do crescimento exponencial da população foram base para o cálculo da Taxa Instantânea de Crescimento (r_i). Assim, foram calculados os r_i para os intervalos de tempo de 14, 18, 21, 28, 35, 42, 56 e 63 dias de desenvolvimento da população, de acordo com a Tabela 8. Como esperado, a taxa de crescimento da população decai com o passar do tempo e mais se aproxima ao valor de r obtido com a construção da tabela de vida quando se considera o intervalo de tempo de 18 dias, em negrito.

Tabela 8. Taxas Instantâneas de Crescimento de uma população de *H. azteca* em diferentes intervalos de tempo

Tempo (dias)	Taxa Instantânea de Crescimento r_i
0	0
7	0,537
14	0,331
18	0,265
21	0,232
28	0,18
35	0,151
42	0,131
56	0,109
63	0,094

As curvas logísticas criadas para os períodos de 14, 18, 21 e 28 dias (Figura 10a) foram então comparadas com a curva logística desenhada a partir do valor do r obtido através da construção da tabela de vida, Figuras 10 b, c, d, e e, respectivamente, considerando também a capacidade suporte do meio em 500 indivíduos. A maior proximidade entre os valores de r e r_i foi obtida aos 18 dias de idade da coorte, quando r é igual a 0,26 e r_i , 0,265.

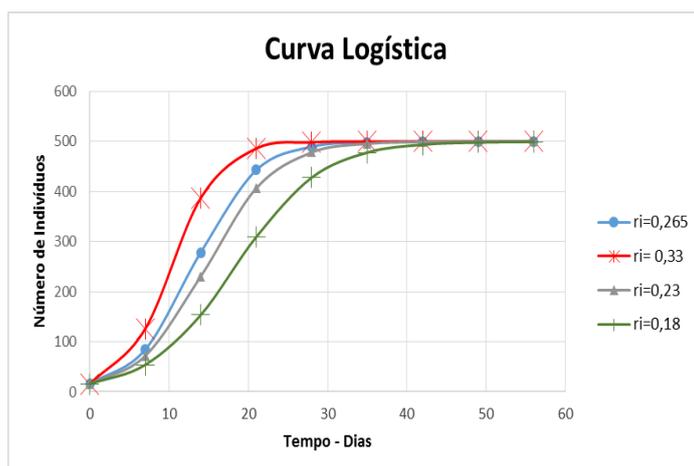


Figura a

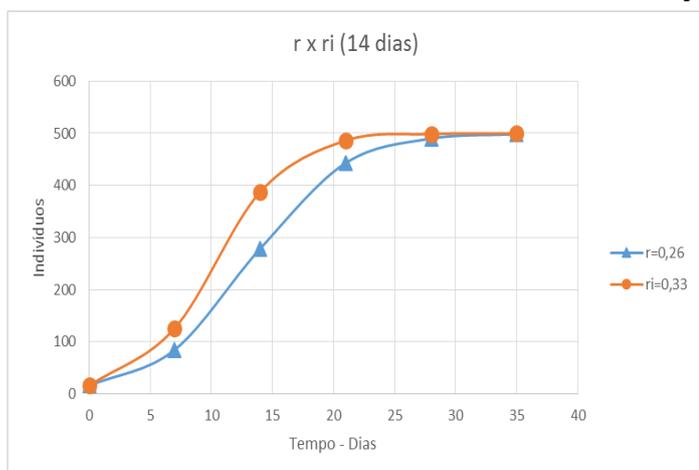


Figura b

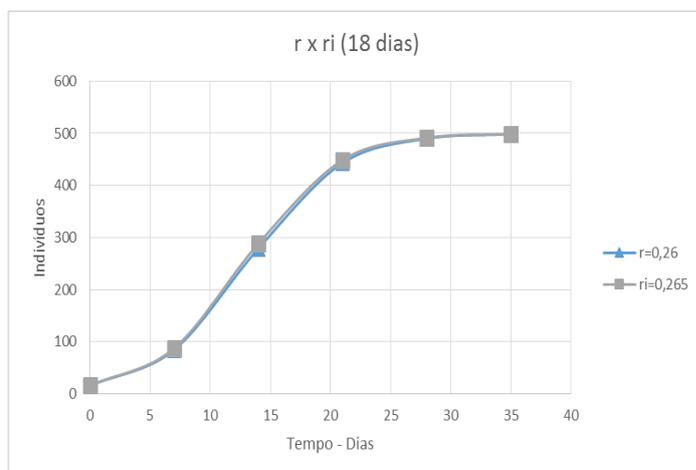


Figura c

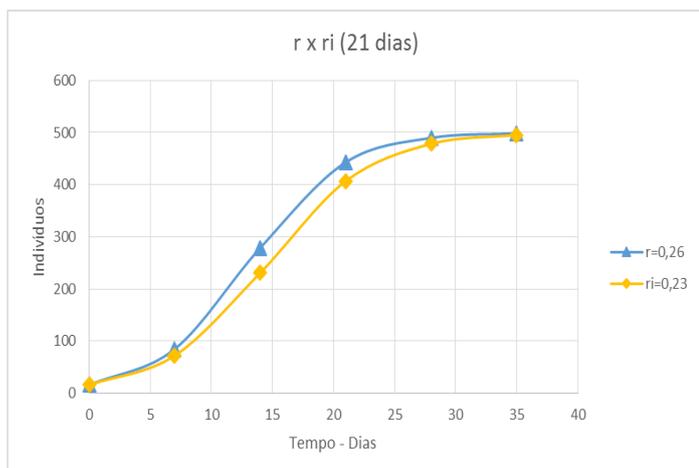


Figura d

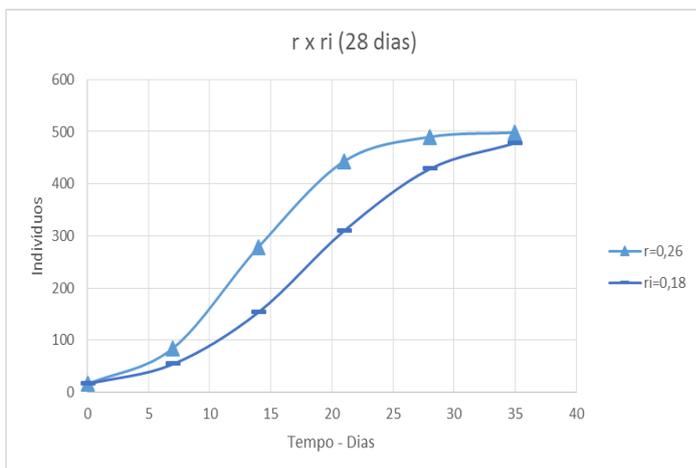


Figura e

Figura 10. Curva Logística do crescimento da população em diferentes intervalos de tempo, com capacidade suporte do ambiente estabilizada em 500 indivíduos. a) Quatro curvas logísticas obtidas a partir das taxas instantâneas de crescimento em 14, 18, 21 e 28 dias; b, c, d, e) Curva logística do crescimento da população em 14, 18, 21 e 28 dias de experimento, respectivamente, comparadas com a curva logística com taxa intrínseca de crescimento obtida pela tabela de vida.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A ameaça global representada pelos efeitos subletais de contaminantes tóxicos ainda não é tratada de forma adequada (DEVAUX et al., 2011). Diversos estudos indicam que os efeitos subletais, pouco perceptíveis, afetam as populações em concentrações mais baixas do que as curvas resposta dos testes tradicionais obtidas através da utilização de endpoints em nível individual (DEVAUX et al., 2011; INGERSOLL et al., 1998; NORBERG-KING et al., 2006; STARK; BANKS, 2003).

Os efeitos subletais sutis de contaminantes podem ser discernidos através de experimentos baseados em tabelas de vida, os LTRE (Life Table Response Experiments), ou seja, uma abordagem por análise de parâmetros demográficos como *endpoints* (FORBES; CALOW, 1999, 2010; LEVIN et al., 1996), que vem sendo privilegiada no desenvolvimento contínuo de testes ecotoxicológicos em busca de maior relevância ecológica (ALEGRETTI, 2015; BROWN; CONRADI; DEPLEDGE, 1999; CONRADI; DEPLEDGE, 1998; FORBES; CALOW, 2010; LEVIN et al., 1996). *Endpoints* demográficos levam em consideração taxas e variáveis em nível populacional que são importantes caracterizadores da estratégia de vida adotada pelas espécies teste e, portanto, indicadores mais adequados de toxicidade.

O conceito de estratégia de vida postula que a seleção natural molda a ocorrência e duração de eventos chave ao longo do ciclo de vida, de forma que a sobrevivência da prole seja otimizada. A idade e tamanho em que a maturidade sexual é atingida, os eventos reprodutivos, o sucesso reprodutivo, a senescência e a morte dependem das condições ecológicas as quais os organismos foram submetidos ao longo do tempo, o que determina os caminhos evolutivos adotados (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010). Dentre as teorias sobre estratégia de vida, a de maior respaldo é a estratégia r-K. A estratégia K é associada a uma alta taxa de sobrevivência, tanto para os adultos como para os indivíduos jovens de uma população. Nessa estratégia as fêmeas apresentam baixa fecundidade, longo tempo de geração e são iteróparas, dessa maneira a densidade da população acaba se mantendo relativamente estável. A estratégia

r é caracterizada por baixa sobrevivência dos adultos, alta fecundidade, fêmeas iteróparas, tempo de geração curto, e densidade populacional variável (MACARTHUR; WILSON, 1967; PIANKA, 1970; STEARNS, 1976). A estratégia de vida utilizada por determinada espécie é bem caracterizada pelos parâmetros da estatística demográfica: tipo de reprodução (semélpara ou iterópara), taxa de crescimento (r) e tempo de geração (T) (DUQUE; TAPHORN; WINEMILLER, 1998).

Pelos resultados obtidos, o morfotipo de *H. azteca* cultivado no LEAL (Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes) da Faculdade de Tecnologia da Unicamp pertence ao fenótipo corpo menor do complexo, sendo representante de estratégia de vida r atingindo pequeno tamanho corporal o que acarreta em menor número de ovos produzidos por ninhada. O aumento na fecundidade com o aumento do tamanho do corpo é geral entre crustáceos (HARTNOLL, 1982), sugerindo que este parâmetro reprodutivo pode ser determinado por relações fisiológicas alométricas (WELLBORN, 1995b). O pequeno número de ovos é compensado por uma reprodução contínua e idade precoce de maturidade sexual. Deste modo há um aumento da produção do número de ninhadas ao longo da vida (R_0) e diminuição do tempo de geração (T) com o conseqüente aumento da taxa de crescimento intrínseca (r). Steele e Steele (1991) afirmam que espécies tropicais e subtropicais apresentam em geral tamanho de corpo menor, produzindo, portanto, menos ovos e apresentando fecundidade mais baixa. Sendo assim, a fecundidade baixa, compensada pelo intervalo de tempo curto entre ninhadas e ciclo de vida multivoltínico, permite o aumento geométrico da população.

É frequente o uso de espécies cultivadas em laboratório para compor teste com o intuito de predizer o efeito de um contaminante em populações naturais. Entretanto, populações de diferentes espécies não reagem da mesma maneira a estressores (STARK; BANKS; ACHEAMPONG, 2004) e um grande número de trabalhos tem demonstrado que as respostas a estressores ambientais em nível populacional podem ser geneticamente dependentes (DUAN; GUTTMAN; ORIS, 1997; GUTTMAN, 1994).

A espécie epibentônica *H. azteca* é uma das mais utilizadas em teste de toxicidade tanto de coluna d'água como de sedimento e sua sensibilidade a diferentes contaminantes tem uma base genética confirmada, sendo, portanto, a diversidade genética constatada entre populações de *H. azteca* particularmente problemática no contexto da testagem toxicológica (MAJOR, 2012).

As populações naturais de *H. azteca* que forneceram os estoques populacionais mantidos para utilização em testes, foram originalmente coletados de populações relativamente isoladas devido à natureza heterogênea dos ambientes lênticos e a capacidade migratória limitada da espécie (MAJOR, 2012). Estas particularidades associadas às condições de cultivo em laboratório favoreceram o aparecimento de alterações na estrutura genética das populações cultivadas referentes a alteração na frequência de alelos, perda de alelos, diminuição da heterozigosidade, alterações resultantes de deriva genética, cruzamentos não randômicos e seleção artificial (DUAN; GUTTMAN; ORIS, 1997; HOGG et al., 1998; WELLBORN; BROUGHTON, 2008; WELLBORN; COTHRAN, 2004; WITT; HEBERT, 2000; WITT; BLINN; HEBERT, 2003; WITT; THRELOFF; HEBERT, 2006).

Testes crônicos realizados por Major (2012) indicaram a existência, entre populações naturais e cultivadas, de 4 clades do complexo de *H. azteca* com diferentes características relativas a estratégia de vida, em particular o tamanho do corpo e a eficiência reprodutiva. Diversos autores reportaram a evolução de espécies provisórias agrupadas nos fenótipos - corpo pequeno e corpo grande - como o resultado de pressão seletiva associada ao risco de predação. As populações de *Hyalella* provenientes de ambientes de baixa predação atingiriam tamanhos corporais maiores e possuiriam maior capacidade competitiva, enquanto aquelas de ambientes com alta predação apresentariam menor tamanho corporal (WELLBORN, 1994a). As populações com fenótipo corpo maior têm ninhadas aproximadamente duas vezes maiores que as de corpo menor (WELLBORN et al., 2005).

Estudos com metais pesados mostraram uma diferença significativa em mortalidade e sobrevivência para diferentes genótipos de *H. azteca* em testes de exposição aguda (DUAN et al., 2000a, 2000b, 2001), demonstrando assim que

variações genóticas parecem afetar a resposta dos organismos em testes de toxicidade em nível populacional. A identificação das espécies teste, portanto, constitui uma etapa crítica antes da realização de bioensaios ecotoxicológicos.

As medidas de tamanho corporal realizadas relativas ao número de ovos por ninhada sugerem que as populações cultivadas no LEAL (Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes) da Faculdade de Tecnologia da Unicamp pertencem a fenótipo corpo menor do complexo *Hyalella*. Dedução gerada pela análise do gráfico (Figura 10) gerado por Wellborn e Broughton (2008) considerando as medidas de corpo (comprimento em milímetros da cabeça) e número de ovos para os tipos morfológicos regionais americanos publicados (STRONG, 1972; WELLBORN; COTHRAN; BARTHOLF, 2005; WELLBORN; COTHRAN, 2004; WELLBORN, 1995a, 1995b).

O crescimento das fêmeas de *H. azteca* foi contínuo por toda a vida em condições laboratoriais, fato também observado para *H. pleoacuta* e *H. castroi* por CASTIGLIONI (2007), sendo a taxa de crescimento corporal maior nas fases iniciais (juvenis), quando os indivíduos crescem exponencialmente (WELTON; CLARKE, 1980). Resultados semelhantes foram reportados para a *H. azteca* por (OTHMAN; PASCOE, 2001).

A estimativa de efeitos tóxicos em populações é complicada ainda pelo fato da exposição potencialmente resultar em parte da população morrendo enquanto indivíduos sobreviventes podem estar prejudicados por efeitos subletais (STARK; WENNERGREN, 1995). Efeitos subletais podem prejudicar os indivíduos de diferentes formas; fracasso reprodutivo (MYERS; HULL, 2003), duração de vida afetada (BUTTER; SINGH; DHAWAN, 2003), a resposta alterada do macho aos feromônios (HOELSCHER; BARRETT, 2003) e habilidade diminuída de evitação a predadores como resposta a alterações morfológicas (BUTTER; SINGH; DHAWAN, 2003; JOSAN; SINGH, 2000). Para complicar ainda mais o assunto, populações podem compensar a perda de indivíduos. Se, depois da exposição ao contaminante, não ocorrem efeitos subletais mas a população é reduzida, os sobreviventes dispõem de mais recursos e podem produzir prole maior do que em populações controle, um fenômeno chamado compensação populacional (STARK; BANKS, 2003).

A aplicação da taxa de crescimento populacional (r), pelo fato de integrar valores de sobrevivência das classes etárias específicas e fecundidade em um mesmo parâmetro, faz deste por definição, um *endpoint* ecologicamente mais relevante na avaliação de xenobióticos do que as medições de parâmetros individuais tradicionais (FORBES; CALOW, 1999). Entretanto, os experimentos que se utilizam da ferramenta de tabela de vida são considerados muito extensos, necessitando de um tempo razoavelmente grande para gerar resultados. Assim, o ri (taxa instantânea de crescimento) tem sido apontado como um *endpoint* alternativo e tem sido usado em trabalhos de entomologia de modo a avaliar o efeito populacional (letal e subletal) de contaminantes (STARK; BANKS, 2003).

A obtenção dos valores de ri se baseia no acompanhamento do crescimento de uma população por um tempo predeterminado, menor do que o necessário para a obtenção do r . Diferentemente do que ocorre no acompanhamento de uma coorte, o cálculo do ri se faz basicamente a partir do número inicial e final de indivíduos de uma população inteira (ocorrência de sobreposição de gerações) em intervalo de tempo escolhido. O cálculo das duas taxas de crescimento, a intrínseca (r) e a instantânea (ri), gera, como resultado particular de cada, um único número. Este valor, sendo negativo, representa que a população está em decréscimo, em direção à extinção; sendo o valor igual a zero, significa que a população se encontra estável, sem crescimento ou sem decréscimo; sendo um número positivo, diz-se que a população está em crescimento.

Este fato simplista, da possibilidade de se possuir um único valor de comparação, representa mais um motivo positivo, na argumentação do uso de parâmetros populacionais, para a utilização do r e do ri . Além disso, a utilização do ri como parâmetro para a avaliação da ação de contaminantes como fator significativamente negativo no crescimento de uma população e o uso do r apenas como valor de referência para aquela avaliação, possibilita o estabelecimento de procedimentos em laboratório que integram tanto a teórica ecológica como a toxicológica, mais discutida em trabalhos que se utilizam apenas de parâmetros individuais. Ou seja, com uma metodologia laboratorial realizável em um curto período de tempo e apresentando resultados mais

abrangentes, conseqüentemente apresenta ser um estudo com baixo custo e mais acurado, no que tange a representação do impacto de um produto químico no ecossistema (WALTHALL; STARK, 1997). Uma questão importante para que se estabeleça tal comparação, é a determinação do intervalo de tempo em que se dará o acompanhamento da população para a obtenção do *ri* a ser comparado com o *r* de referência, obtido através da tabela de vida.

Indica-se aqui o método de construção de tabelas de vida para a obtenção de *endpoints* para avaliação de estresse toxicológico a nível populacional, apontando como preferencial a taxa intrínseca de crescimento, como se segue, com as recomendações metodológicas adaptadas de trabalhos publicados que utilizaram metodologia LTRE (ALEGRETTI, 2015; LEVIN et al., 1996; NEUPARTH; COSTA; COSTA, 2002), sendo a metodologia de cultivo recomendada pela ABNT e já adotada nos cultivos realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Abílio Lopes – LEAL.

Para cada tratamento, 10 casais em amplexo copulatório devem ser separados e mantidos em béqueres de 250 ml até o nascimento da primeira coorte. A escolha do número de casais se baseou no número médio de ovos produzidos por *H. azteca*, que é de treze ovos por fêmea por ninhada.

Dentre os jovens neonatos liberados do marsúpio (F1), 70 indivíduos, nascidos em intervalo de 3 dias, devem ser retirados dos béqueres e colocados juntos em recipiente com capacidade para 2 litros de água contendo os agentes estressores nas concentrações testadas. Os indivíduos machos e fêmeas da geração parental (G1) também deverão ser inseridos no mesmo recipiente. Estes devem ser mantidos, nos diferentes tratamentos testes e controle, por 18 dias. O tempo de duração do experimento foi sugerido como o tempo de obtenção de *ri* equivalente a *r*. A duração de testes ecotoxicológicos, particularmente testes crônicos, se constitui geralmente em um importante problema técnico. Idealmente, um teste crônico deve englobar todo ciclo de vida dos organismos, desde o nascimento até a época de reprodução, ou pelo menos os estágios mais sensíveis (HILL et al., 1994). Apesar de um teste de longa duração ter grande utilidade quando se considera do ponto de vista científico,

um período máximo de 4 semanas foi acordado para testes crônicos envolvendo amphipoda (MARTINEZ-MADRID et al., 1999; NIPPER; ROPER, 1995).

O conhecimento das estatísticas demográficas e estratégia de vida de uma espécie são importantes no estabelecimento de endpoints populacionais a ser utilizados em experimentos de ecotoxicologia crônica com maior poder de previsibilidade para o efeito de agentes estressores. Os dados aqui obtidos permitem o uso dos parâmetros, taxa de sobrevivência (lx), fecundidade (mx), tamanho na maturidade sexual, capacidade suporte (K), taxa de crescimento intrínseco r e instantânea ri como *endpoints*. É recomendada a utilização da taxa de crescimento instantânea (ri) como endpoint potencialmente mais econômico.

Diante do alto nível de divergência genética para o complexo *H. azteca* e considerando-se que outros autores demonstraram que diferenças genéticas a nível de subespécie podem afetar o resultado de testes de toxicidade com diversos contaminantes (DUAN et al., 2000a, 2000b, 2001), recomenda-se que os parâmetros populacionais característicos da estratégia de vida sejam levantados para a cultura teste quando do estabelecimento e da seleção dos endpoints a serem utilizados em testes de toxicidade em nível populacional.

Na próxima etapa deste projeto, utilizaremos como referência a taxa intrínseca de crescimento r da coorte de *H. azteca* apresentada neste trabalho, para avaliar, através do ri , os efeitos subletais do corante Disperse Blue 291, que apresentou mutagenicidade, em testes *in vitro* (TSUBOY et al., 2007) e UMBUZEIRO et al., 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRETTI, L. **Análise de tabela de vida de uma população natural de *Parhyale hawaiiensis*. Recomendações para experimento de toxicidade crônica.** 71p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas. Limeira - SP. 2015.

ARAÚJO, R. P. DE A. **Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo.** 283p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo - USP. São Paulo - SP. 2005.

BROWN, R. J.; CONRADI, M.; DEPLEDGE, M. H. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (#Pallas, 1766). **Science of The Total Environment**, v. 233, n. 1-3, p. 77–88, ago. 1999.

BUTTER, N. S.; SINGH, G.; DHAWAN, A. K. Laboratory evaluation of the insect growth regulator lufenuron against *Helicoverpa armigera* on cotton. **Phytoparasitica**, v. 31, n. 2, p. 200–203, abr. 2003.

CASTIGLIONI, D. S. **Os ciclos biológicos de duas espécies simpátricas de *Hyalella* Smith, 1874 (Crustacea, Peracarida, Amphipoda, Dogielinotidae).** 256p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS. 2007.

CHEN, F. et al. Long-term impacts of elevated carbon dioxide and transgenic Bt cotton on performance and feeding of three generations of cotton bollworm. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 124, n. 1, p. 27–35, 2007.

CONRADI, M.; DEPLEDGE, M. H. Population responses of the marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) to copper. **Aquatic Toxicology**, v. 44, n. 1-2, p. 31–45, dez. 1998.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COTHRAN, R. D.; JEYASINGH, P. D. Condition dependence of a sexually selected trait in a crustacean species complex: importance of the ecological context. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 64, n. 9, p. 2535–46, set. 2010.

DE ARAGÃO UMBUZEIRO, G. et al. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 49–56, 2005.

DEVAUX, A. et al. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 405–411, 25 jan. 2011.

DIONNE, K. et al. No Evidence for Temporal Variation in a Cryptic Species Community of Freshwater Amphipods of the *Hyalella azteca* Species Complex. **Diversity**, v. 3, n. 4, p. 390–404, 8 ago. 2011.

DUAN, Y. et al. **Acute effects of heavy metals and low pH on the genetic**

structure of *Hyalella azteca*. Pensacola, FL (United States): Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 1995.

DUAN, Y. et al. Genotype and toxicity relationships among *Hyalella azteca*: I. Acute exposure to metals or low pH. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1414–1421, maio 2000a.

DUAN, Y. et al. Genotype and toxicity relationships among *Hyalella azteca*: II. Acute exposure to fluoranthene-contaminated sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1422–1426, maio 2000b.

DUAN, Y. et al. Differential survivorship among allozyme genotypes of *Hyalella azteca* exposed to cadmium, zinc or low pH. **Aquatic Toxicology**, v. 54, n. 1-2, p. 15–28, set. 2001.

DUAN, Y.; GUTTMAN, S. I.; ORIS, J. T. Genetic differentiation among laboratory populations of *Hyalella azteca*: implications for toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 691, 1997.

DUQUE, A. B.; TAPHORN, D. C.; WINEMILLER, K. O. Ecology of the coporo, *Prochilodus mariae* (Characiformes, Prochilodontidae), and status of annual migrations in western Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, v. 53, n. 1, p. 33–46, 1998.

ENVIRONMENT CANADA (EC). Biological Test Method : Test for Survival and Growth in Sediment Using the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca*. . 1997, p. 117.

FLYNN, M. N.; PEREIRA, W. R. L. Abordagem Populacional na Ecotoxicologia. **RevInter**, v. 4, n. 3, p. 79–91, 2011.

FLYNN, M. N.; PEREIRA, W. R. L. S. Ecological model of competitive interaction among three species of amphipods associated to *Bryocladia thrysigera* (J. Agardh) and extreme environmental stress effects. **Nauplius**, v. 21, n. 1, p. 01–07, jul. 2013a.

FLYNN, M. N.; PEREIRA, W. R. L. S. Population Approach in Ecotoxicology (Stress Ecology). **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 75–85, 1 jul. 2013b.

FLYNN, M. N.; VALÉRIO-BERARDO, M. T.; PEREIRA, W. L. S. Dinâmica populacional de *Jassa slatteryi* em substrato artificial, São Sebastião, São Paulo, Brasil. **Biomatemática (UNICAMP)**, v. 18, p. 69–80, 2008.

FORBES, V. E.; CALOW, P. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1544–1556, jul. 1999.

FORBES, V. E.; CALOW, P. Integrating Population Modeling into Ecological Risk Assessment. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 6, p. 191–193, 2010.

FRANCE, R. L. Biogeographical Variation in Size-Specific Fecundity of the Amphipod *Hyalella azteca*. **Crustaceana**, v. 62, n. 3, p. 240–248, 1992.

FREIRE, M. M. et al. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 347–354, out.

2008.

FUJIWARA, M.; CASWELL, H. Estimating population projection matrices from multi-stage mark-recapture data. **Ecology**, v. 83, n. 12, p. 3257–3265, dez. 2002.

GOTELLI, N. **Ecologia**. Londrina: Editora Planta, 2007.

GUTTMAN, S. I. Population genetic structure and ecotoxicology. **Environmental health perspectives**, v. 102 Suppl, n. 12, p. 97–100, dez. 1994.

HALLAM, T. G.; CANZIANI, G. A.; LASSITER, R. R. Sublethal narcosis and population persistence: A modeling study on growth effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 947–954, maio 1993.

HARTNOLL, R. G. Growth. In: **The Biology of Crustacea: Embryology, Morphology and Genetics (Ed. DE Bliss.)**. New York, NY: Academic Press, 1982. p. 111–196.

HILL, I. R. et al. **Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1994.

HOELSCHER, J. A.; BARRETT, B. A. Effects of Methoxyfenozide-treated Surfaces on the Attractiveness and Responsiveness of Adult Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 3, p. 623–628, 1 jun. 2003.

HOGG, I. D. et al. Genetic evidence for a *Hyalella* species complex within the Great Lakes - St. Lawrence River drainage basin: implications for ecotoxicology and conservation biology. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, n. 6, p. 1134–1152, 15 jun. 1998.

HUME, K. D. et al. Sexual dimorphism in amphipods: the role of male posterior gnathopods revealed in *Gammarus pulex*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 58, n. 3, p. 264–269, jul. 2005.

INGERSOLL, C. G. et al. Use of sublethal endpoints in sediment toxicity tests with the amphipod *Hyalella azteca*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 1508–1523, ago. 1998.

JAGER, T.; KLOK, C. Extrapolating toxic effects on individuals to the population level: the role of dynamic energy budgets. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1557, p. 3531–3540, 2010.

JOSAN, A.; SINGH, G. Sublethal effects of lufenuron on the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 20, n. 04, p. 303–308, 19 dez. 2000.

KIM, M. et al. Residual and sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on the instantaneous rate of increase of *Tetranychus urticae*. **Crop Protection**, v. 25, n. 6, p. 542–548, jun. 2006.

KRAMARZ, P. E.; BANKS, J. E.; STARK, J. D. “Density-Dependent Response of the *Pea Aphid* (Hemiptera : Aphididae) to” by Paulina E. Kramarz, et al. **Journal Of Entomological Science**, v. 42, n. 2, p. 200–206, 2007.

KRAMER, V. J. et al. Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 64–76, jan. 2011.

KWAN, K. K.; DUTKA, B. J. Evaluation of toxi-chromotest direct sediment toxicity testing procedure and microtox solid-phase testing procedure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 656–662, nov. 1992.

LAWRENCE, A. J.; POULTER, C. Impact of copper, pentachlorophenol and benzo[a]pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*. **Marine ecology. Progress series**, v. 223. October, p. 213–223, 2001.

LEVIN, L. et al. Demographic Responses of Estuarine Polychaetes to Pollutants: Life Table Response Experiments. **Ecological Applications**, v. 6, n. 4, p. 1295, nov. 1996.

LOWRY, J. K.; MYERS, A. A. A Phylogeny and Classification of the Senticaudata subord. nov. (Crustacea: Amphipoda). **Zootaxa**, v. 3610, n. 1, p. 1–80, 2013.

MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. **The Theory of Island Biogeography**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1967.

MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, out. 2008.

MAJOR, K. **Genetic and life history differences among laboratory and wild populations of *Hyalella azteca***. [s.l.] University of Illinois, 1 maio 2012.

MARTINEZ-MADRID, M. et al. Sediment Toxicity Bioassays for Assessment of Contaminated Sites in the Nervion River (Northern Spain) . 2. Tubifex tubifex Reproduction Sediment Bioassay. **Ecotoxicology**, v. 8, n. 2, p. 111–124, 1999.

MOURÃO, S. A. et al. Toxicidade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) ao ácaro-vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 827–830, 2004.

MYERS, C.; HULL, L. Insect growth regulator impact on fecundity and fertility of adult tufted apple bud moth, *Platynota idaeusalis* Walker. **Journal of Entomological Science**, v. 38, n. 3, p. 420–430, 2003.

NELSON, M. K.; BRUNSON, E. L. Postembryonic growth and development of in laboratory cultures and contaminated sediments. **Chemosphere**, v. 31, n. 4, p. 3129–3140, ago. 1995.

NEUPARTH, T.; COSTA, F. O.; COSTA, M. H. Effects of Temperature and Salinity on Life History of the Marine Amphipod *Gammarus locusta*. Implications for Ecotoxicological Testing. **Ecotoxicology**, v. 11, n. 1, p. 61–73, 2002.

NIPPER, M. G.; ROPER, D. S. Growth of an amphipod and a bivalve in uncontaminated sediments: Implications for chronic toxicity assessments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4-12, p. 424–430, abr. 1995.

NOËL, H. L. et al. Towards a population ecology of stressed environments: the effects of zinc on the springtail *Folsomia candida*. **Journal of Applied Ecology**, v. 43, n. 2, p. 325–332, 31 mar. 2006.

NORBERG-KING, T. J. et al. Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironmus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests.

- Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 10, p. 2662, 2006.
- OTHMAN, M. S.; PASCOE, D. Growth , Development and Reproduction of *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) in Laboratory Culture. **Crustaceana**, v. 74, n. 2, p. 171–181, 2001.
- PEREIRA, R. B. **Ecologia de populações e biologia reprodutiva em *Hyalella* (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE)**. 113p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG. 2014.
- PIANKA, E. R. On r- and k-selection. **The American Naturalist**, v. 104, n. 940, p. 592–597, 1970.
- POLETTI, M.; COLLETTE, L.; OMOTO, C. Compatibilidade de Agrotóxicos com os Ácaros Predadores *Neoseiulus californicus* (McGregor) e *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **BioAssay**, v. 3, n. October, p. 1–14, 3 jul. 2009.
- SIBLY, R. M.; HONE, J. Population growth rate and its determinants: an overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1425, p. 1153–1170, 29 set. 2002.
- STARK, J. D.; BANKS, J. E. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual review of entomology**, v. 48, n. 1, p. 505–19, jan. 2003.
- STARK, J. D.; BANKS, J. E.; ACHEAMPONG, S. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. **Biological Control**, v. 29, n. 3, p. 392–398, mar. 2004.
- STARK, J. D.; SUGAYAMA, R. L.; KOVALESKI, A. Why demographic and modeling approaches should be adopted for estimating the effects of pesticides on biocontrol agents. **BioControl**, v. 52, n. 3, p. 365–374, 18 abr. 2007.
- STARK, J. D.; VARGAS, R. I.; BANKS, J. E. Incorporating variability in point estimates in risk assessment: Bridging the gap between LC50 and population endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 7, p. 1683–1688, jul. 2015.
- STARK, J. D.; WENNERGREN, U. Can Population Effects of Pesticides Be Predicted from Demographic Toxicological Studies? **Journal of Economic Entomology**, v. 88, n. 5, p. 1089–1096, 1 out. 1995.
- STEARNS, S. C. Life-History Tactics: A Review of the Ideas. **The Quarterly Review of Biology**, v. 51, n. 1, p. 3–47, 1976.
- STEELE, D. H.; STEELE, V. J. Morphological and environmental restraints on egg production in amphipods. In: WENNER, A.; KURIS, A. (Eds.). . **Crustacean Egg Production**. 7. ed. Rotterdam: A.A. Balkema, 1991. p. 157–170.
- STRONG, D. R. Life History Variation Among Populations of an Amphipod (*Hyalella Azteca*). **Ecology**, v. 53, n. 6, p. 1103, nov. 1972.
- THIEL, M. Chemical Communication in Peracarid Crustaceans. In: BREITHAUPT, T.; THIEL, M. (Eds.). . **Chemical communication in Crustaceans**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 199–218.
- TORRES, S. H. S. **Dinâmica populacional e ciclo de vida de *Hyalella* sp.**

(Amphipoda: Dogielinotidae) em córrego no oeste de Minas Gerais, Brasil. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2012.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia.** 3. ed. São Paulo, SP: Artmed Editora, 2010.

TSOLAKIS, H.; RAGUSA, S. Effects of a mixture of vegetable and essential oils and fatty acid potassium salts on *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 70, n. 2, p. 276–82, 2008.

TSUBOY, M. S. et al. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1650–1655, 2007.

USEPA. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.** Cincinnati, OH, United States of America, 1985.

VAN LEEUWEN, C. J.; LUTTMER, W. J.; GRIFFIOEN, P. S. The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna*: A cadmium example. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 9, n. 1, p. 26–39, fev. 1985.

VENZON, M. et al. Toxicidade letal e subletal do nim sobre o pulgão-verde e seu predador *Eriopis connexa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 627–631, maio 2007.

WALTHALL, W. K.; STARK, J. D. Comparison of two population-level ecotoxicological endpoints: The intrinsic (rm) and instantaneous (ri) rates of increase. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 1068–1073, 1997.

WANG, F.; GOULET, R. R.; CHAPMAN, P. M. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature. **Chemosphere**, v. 57, n. 11, p. 1713–1724, dez. 2004.

WELLBORN, G. A. Predator Community Composition and Patterns of Variation in Life History and Morphology Among *Hyalella* (Amphipoda) Populations in Southeast Michigan. **American Midland Naturalist**, v. 133, n. 2, p. 322–332, 1995a.

WELLBORN, G. A. The Mechanistic Basis of Body Size Differences Between Two *Hyalella* (Amphipoda) Species. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 9, n. 2, p. 159–168, 6 jun. 1994a.

WELLBORN, G. A. Size-Biased Predation and Prey Life Histories: A Comparative Study of Freshwater Amphipod Populations. **Ecology**, v. 75, n. 7, p. 2104, out. 1994b.

WELLBORN, G. A. Determinants of reproductive success in freshwater amphipod species that experience different mortality regimes. **Animal Behaviour**, v. 50, n. 2, p. 353–363, ago. 1995b.

WELLBORN, G. A.; BROUGHTON, R. E. Diversification on an ecologically constrained adaptive landscape. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 12, p. 2927–2936, jun. 2008.

WELLBORN, G. A.; COTHRAN, R.; BARTHOLF, S. Life history and allozyme diversification in regional ecomorphs of the *Hyaella azteca* (Crustacea: Amphipoda) species complex. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 84, n. 2, p. 161–175, 31 jan. 2005.

WELLBORN, G. A.; COTHRAN, R. D. Phenotypic similarity and differentiation among sympatric cryptic species in a freshwater amphipod species complex. **Freshwater Biology**, v. 49, n. 1, p. 1–13, jan. 2004.

WELTON, J. S.; CLARKE, T. T. Laboratory studies on the reproduction and growth of the amphipod, *Gammarus pulex* (L.). **Journal of Animal Ecology**, v. 49, n. 2, p. 581–592, 1980.

WITT, J. D.; HEBERT, P. D. Cryptic species diversity and evolution in the amphipod genus *Hyaella* within central glaciated North America: a molecular phylogenetic approach. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 57, n. 4, p. 687–698, 12 abr. 2000.

WITT, J. D. S.; BLINN, D. W.; HEBERT, P. D. N. The recent evolutionary origin of the phenotypically novel amphipod *Hyaella montezuma* offers an ecological explanation for morphological stasis in a closely allied species complex. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 2, p. 405–413, fev. 2003.

WITT, J. D. S.; THRELOFF, D. L.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 10, p. 3073–3082, 24 jul. 2006.