SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Silvana Gomes Leite Siqueira

"ALGA PARDA *SARGASSUM FURCATUM* E ANFÍPODES AMPITOÍDEOS ASSOCIADOS COMO POTENCIAIS BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) SILVANA GOMES LEITE SIQUEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fosca Pedini Pereira Leite

Co-orientador: Giuliano Buzá Jacobucci

Fevereiro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Si75a

Siqueira, Silvana Gomes Leite, 1975-
Alga parda *Sargassum furcatum* e anfípodes ampitóides associados com potenciais bioindicadores de poluição por hidrocarbonetos de petróleo / Silvana Gomes Leite Siqueira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Fosca Pedini Pereira Leite.
Coorientador: Giuliano Buzá Jacobucci.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Poluição marinha. 2. Sargassum. 3. Amphipoda. 4. Herbívoro. 5. Fauna associada. I. Leite, Fosca Pedini Pereira, 1947-. II. Jacobucci, Giuliano Buzá. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Brown algae *Sargassum furcatum* and associated amphithoids amphipods as potential bioindicators of pollution by petroleum hydrocarbons
Palavras-chave em Inglês:
Marine pollution
Sargassum
Amphipods
Herbivores
Associated fauna
Área de concentração: Ecologia
Titulação: Doutora em Ecologia
Banca examinadora:
Fosca Pedini Pereira Leite [Orientador]
Cristiana Silveira Serejo
Denis Moledo de Souza Abessa
Ronaldo Adriano Christofoletti
Antonia Cecília Zacagnini Amaral
Data da defesa: 28-02-2012
Programa de Pós Graduação: Ecologia

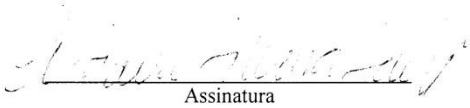
Campinas, 28 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra . Fosca Pedini Pereira Leite (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Cristiana Silveira Serejo

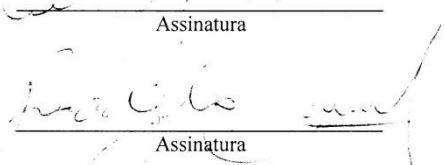


Assinatura

Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa

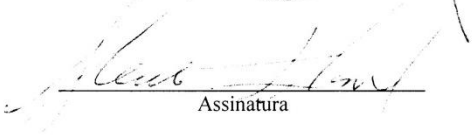
Assinatura

Prof. Dr. Ronaldo Adriano Christofoletti



Assinatura

Profa. Dra. Antonia Cecília Zacagnini Amaral



Assinatura

Prof. Dr. Marcel Okamoto Tanaka

Assinatura

Prof. Dr. Flavio Dias Passos

Assinatura

Prof. Dr. José Roberto Trigo

Assinatura

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha família especialmente ao Marcos e aos meus queridos filhos Gabriel e Luca.

Agradecimentos

À minha amiga e orientadora Profa. Dra. Fosca Pedini Pereira Leite meu imenso agradecimento por todos os ensinamentos e apoio incondicional ao meu trabalho em todos os momentos.

À Profa. Dra. Cecília Amaral, a quem eu sempre recorria para pedir ajuda ou material emprestado, pelas conversas de diferentes assuntos, que muitas vezes me faziam sorrir.

Ao meu co-orientador Dr. Giuliano Jacobucci pelas conversas e sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcel Okamoto Tanaka pela ajuda e sugestões nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Cíntia Badaró Pedroso pelos os ensinamentos acerca dos princípios básicos da ecotoxicologia.

À Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro por me ter fornecido os reagentes utilizados nos experimentos ecotoxicológicos e pelas sugestões para o desenho experimental toxicológico.

À Profa. Dra. Márcia Caruso Bícego, à Dra. Satie Taniguchi e à Marília Gabriela Morina Batista pela realização das análises químicas e pelo trabalho desenvolvido em parceria.

À minha amiga Alessandra pelo apoio nos momentos mais difíceis e tensos, pelas conversas e momentos de descontração.

Ao amigo Paulo Henrique que mesmo longe sempre esteve disposto a me ajudar nas analises estatísticas.

À minha amiga Milena Corbo, que foi muito importante nesta etapa da minha vida sendo minha confidente e parceira nos tradicionais almoços no Giovanetti,

Aos amigos e colegas de laboratórios Sueli, Luiza, Simone, Izadora, Larissa, Edson, Marília, Natália, Danilo, Carol, Abel, Marcos, Lilian, Aline, Lufe, Ingrid e Andressa pelas conversas, piadas, risos, choros, ajuda na coleta de campo, por cuidar dos meus anfípodes quando eu não estava presentes, enfim pela convivência e tornar as idas ao laboratório muito prazerosas.

Aos membros da Pré-Banca: Dra. Cristiana Serejo, Dr. Denis Abessa e Ronaldo Christofoletti pelas valiosas críticas e sugestões encaminhadas em tempo recorde.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo por ter cedido à infraestrutura do Laboratório de Ecologia Química para a preparação das soluções usadas nos experimentos de ecotoxicologia.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar) pela infra-estrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos técnicos do CEBIMar Joseph, Eduardo e Joseiton pela ajuda nas coletas.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo 07/50488-9).

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Ecologia do Instituto de Biologia da UNICAMP por contribuir para minha formação profissional.

À Maria Célia Duarte Pio, secretaria da Pós-Graduação em Ecologia pela ajuda nos assuntos burocráticos.

Em fim, agradeço a todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo ix

Abstract xi

Introdução geral 1

Capítulo 1: Presença de hidrocarbonetos na alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 e nos anfípodes ampitoídeos associados, procedentes de dois costões rochosos do Canal de São Sebastião 6

Introdução 6

Material e Métodos 8

Resultados 12

Discussão 18

Capítulo 2: Riqueza, variação temporal e espacial das espécies de ampitoídeos associadas à alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 do Canal de São Sebastião. 22

Introdução 22

Materiais e Métodos 24

Resultados 26

Discussão 35

Capítulo 3: Biologia populacional de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 associada à alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 dos costões rochosos da Ilha de São Sebastião. 39

Introdução 39

Materiais e Métodos 40

Resultados 43

Discussão 47

Capítulo 4: A relação entre os hidrocarbonetos derivados de petróleo presentes na alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 a densidade e o comprimento corporal de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 (Crustacea, Amphipoda, Ampithoidae). 51

Introdução 51

Material e métodos 53

Resultados 57

Discussão 62

Capítulo 5: Comportamento reprodutivo, cuidado parental e maturidade sexual de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816. 68

Introdução 68

Material e métodos 69
Resultados 72
Discussão 76
Capítulo 6: *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 (Amphipoda: Ampithoidae) uma nova proposta de organismo para ensaios ecotoxicológicos marinhos. 80
Introdução 80
Material e métodos 82
Resultados 86
Discussão 89
Considerações finais 92
Referências bibliográficas 94
Anexo 1 126

Resumo

O monitoramento dos ambientes marinhos pode ser feito avaliando a presença de poluentes em organismos que são capazes de acumular estas substâncias. Desta forma, este estudo avaliou a presença de hidrocarbonetos petrogênicos na alga parda *Sargassum furcatum* e em anfípodes ampitoídeos associados provenientes de costões rochosos do Canal de São Sebastião, o qual está sujeito à poluição por petróleo, devido às operações do Duto e Terminais Centro Sul (DTCS) e por efluentes domésticos. Identificou-se as espécies de ampitoídeos que ocorreram associadas ao *S. furcatum* estudando também a variação espacial e temporal da composição desta comunidade. A relação entre os hidrocarbonetos presentes em *S. furcatum,* a densidade e a estrutura populacional de *Cymadusa filosa,* espécie de ampitoídeo mais representativa da região, também foi investigada. Adicionalmente foi realizado o estudo do comportamento reprodutivo de *C. filosa* e avaliado o seu uso como bioindicador de qualidade da água, por meio de teste de toxidade aguda de curta duração. O material analisado foi proveniente de 7 coletas realizadas entre março de 2007 a novembro de 2008 em 7 costões rochosos. Foram quantificados os hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos derivados de petróleo tanto na alga como nos anfípodes, que compostos variaram em termos de concentração entre os meses amostrados. A alga possivelmente refletiu as concentrações de hidrocarbonetos presentes na água enquanto que os anfípodes podem ter assimilado via contato direto ou via alimentação. Foram identificadas seis espécies de anfípodes da Família Ampithoidae: *Ampithoe* sp., *A. divisura, A. marcuzzi, A. ramondi, C. filosa* e *Sunampithoe pelagica* que apresentaram diferenças significativas em termos de ocorrência, densidades e variação temporal. A população de *C. filosa,* de modo geral, foi dominada por jovens, possivelmente devido a elevada fecundidade das fêmeas. Ocorreu também

desvio da razão sexual a favor das fêmeas, relacionado com o comportamento diferencial do macho ou devido a sua maior sensibilidade aos hidrocarbonetos presentes na alga. Tanto hidrocarbonetos alifáticos como policíclicos aromáticos influenciaram a densidade e estrutura de tamanho dos diferentes estádios de desenvolvimento *de C. filosa.* Foram observadas interações agonísticas entre machos e fêmeas de *C.filosa*, formação de tubos conjugais e a alimentação de filhotes ainda no marsúpio pela fêmea, caracterizando o cuidado parental desta espécie. Verificou-se ainda que o período de incubação dos ovos foi curto e a maturidade sexual ocorreu entre seis a sete semanas. Os resultados de toxidade aguda sugerem que *C.filosa* tem um potencial para uso em experimentos de ecotoxicologia marinha devido a elevada sensibilidade ao cobre e ao naftaleno, contudo estudos adicionais com outros xenobióticos são necessários para comprovação destes resultados e para validar o uso desta espécie no monitoramento dos ambientes marinhos.

Abstract

The monitoring of marine environments can be made by evaluation of pollutant presence in organisms that are able to accumulate these substances. Thus, this study evaluated the occurrence of oil-derived hydrocarbons in the brown algae *Sargassum furcatum* and in its associated amphitoid amphipods found on rocky shores of the São Sebastião Channel, which is exposed to pollution by oil due to the operations of the Duct and Center Southern Terminal (DTCS) and domestic sewage. The species of amphitoid that occurred associated to *S. furcatum* were identified, and time and spatial variation of the composition of this community were also studied. The relationship between the hydrocarbons present in *S. furcatum* and the density and populational stucture of *Cymadusa filosa,* the most representative species of amphitoid in the area, was also investigated. Additionally a study on the reproductive behavior of *C. filosa* was conducted and its use as a bioindicator of water quality was evaluated through high toxicity test of short duration. The analysed material was obtained from 7 samples taken from march 2007 to november 2008 on 7 rocky shores. The oil-derived aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons were quantified both in the algae and in the amphipods. Such compounds varied in concentration between the months of sampling. The algae possibly reflected the hydrocarbon concentrations present in the water while the amphipods may have assimilated hydrocarbons by direct contact or through the trophic chain. Six species of amphipods from the Ampithoidae family were identified: *Ampithoe sp., A. divisura, A. marcuzzi, A. ramondi, C. filosa* and *Sunampithoe pelagica* which presented significant differences in occurrence, density and temporal variation. The population of *C. filosa* in general was dominated by young individuals, possibly due to the high fecundity of the females, and there was a deviation of the sexual ratio

favoring the females, related to the male's differential behavior or due to its higher sensibility to hydrocarbons in the algae. Both aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons influenced the density and size structure of the different stages of development of *C. filosa.* Agonistic interactions between male and female *C. filosa* were observed, formation of share tubes and feeding of the offspring still in the pouch by the female, characterizing parental care by this species. It was also verified that the egg incubation period was short and sexual maturity occurred between six and seven weeks. The results of high toxicity suggest that *C. filosa* has potential for use in experiments of marine ecotoxicology due to its high sensibility to copper and naphthalene, however, additional studies with other xenonbiotics are necessary to confirm these results and to validate the use of this species in marine environments monitoring.

Introdução geral

Os combustíveis fósseis, particularmente o petróleo, constituem uma das principais fontes energéticas da atualidade. Tanto a extração quanto o transporte do pretóleo, são consideradas atividades de alto impacto ambiental devido aos riscos de vazamento relacionados com tais atividades em ambientes marinhos. Entetanto a extração e transporte são responsáveis por 11 % do petróleo introduzido no ambiente marinho (IPEICA 2005), enquanto que as operações rotineiras de carga e descarga respondem por cerca de 29% (ITOPF 2011/12). Por outro lado, 44% da poluição por petróleo é proveniente de fontes terrestres diversas como por exemplo, efluentes domésticos e industriais (ITOPF 2011).

O petróleo é constituído principalmente por hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos, que são classificados em: n-alcanos, alcanos ramificados (incluindo os isoprenóides), cicloalcanos (naftenos), aromáticos e alcenos (presentes em produtos refinados e ausentes em petróleo) (FUNDESPA 2009). Os hidrocarbonetos alifáticos tendem a ser pouco tóxicos, mas apresentam efeitos anestésicos e narcotizantes (Evans & Rice 1974; Gerlach 1976). Os cicloalcanos ou naftenos são formados por até seis átomos de carbono arranjados em anel e têm toxicidade intermediária entre os alifáticos e os aromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos são constituídos por anéis benzênicos e são relativamente hidrossolúveis em relação aos outros compostos (Evans & Rice 1974). São exemplos, benzeno, benzo[a]pireno, naftaleno, benzo[a]antraceno, tolueno, xileno e fenantreno. São extremamente tóxicos e muitos têm efeito carcinogênico comprovado (Gerlach 1976). Compostos com enxofre, nitrogênio, oxigênio, ferro, níquel, vanádio, cobre, sódio, dentre outros também estão presentes no petróleo em pequenas quantidades (Bícego 1988).

De modo geral os efeitos de derramamentos de petróleo, mesmo que de pequenas dimensões, podem gerar sérios danos sobre as comunidades marinhas (Evans & Rice 1974; IPEICA 2000). Um dos

danos diretos mais imediatos às comunidades, principalmente em derrames de óleos grossos e viscosos tende a ser eliminação maciça de organismos por recobrimento e asfixia que impedem as trocas dos organismos com o ambiente, impossibilitando processos como respiração, fotossíntese, excreção e alimentação (IPEICA 2000). Os organismos podem morrer por intoxicação causada pelos aromáticos, como benzeno, tolueno e xileno, sendo as larvas, geralmente mais sensíveis que os adultos. Efeitos indiretos como redução da fecundidade, da taxa de fertilização, além de alterações morfológicas e fisiológicas podem não resultar em mortalidade dos organismos, mas causam sérios efeitos populacionais, que por sua vez, alteram ou desestruturam as comunidades (Cairns & Buikema 1984; IPEICA 2000; ITOPF 2011/12).

Em locais afetados por acidentes, modificações da estrutura das comunidades impactadas foram investigadas e em estudos onde houve acompanhamento temporal, notaram-se recuperação das comunidades alguns anos após o derramamento (Nikitik & Robinson 2003). No entanto, a recolonização do substrato por espécies mais tolerantes e de crescimento rápido, como é o caso de algumas espécies de algas, pode manter a comunidade em estágios sucessionais iniciais por longos períodos, impedindo o estabelecimento de organismos de ciclo de vida mais lento (Marques *et al.* 2002).

Estudos experimentais com espécies isoladas ou com comunidades reconstituídas em laboratório, além de estudos sinecológicos realizados após acidentes com navios tanque, indicaram que os hidrocarbonetos petrogênicos são efetivamente acumulados pelos organismos marinhos (Vigano *et al*. 2007; Hellou *et al*. 2009). A incorporação pode ocorrer através da absorção de hidrocarbonetos presentes na coluna d'água, na água intersticial ou ainda via ingestão de partículas (Marques *et al.* 2002). Em locais onde houve derrame ou há poluição crônica por petróleo, os tecidos de certos organismos, como peixeis e mexilhões, tendem a refletir a concentração de hidrocarbonetos presentes no sedimento (Taniguchi 2002). Também já foram detectadas alterações morfológicas e reprodutivas

em algas expostas a petróleo (Maurat 1996).

Os efeitos tóxicos de contaminantes presentes em ecossistemas marinhos podem ser avaliados e monitorados de diversas formas (Underwood & Peterson 1988). É possível, por exemplo, verificar o potencial tóxico de uma substância por meio de testes de toxicidade, que avaliam a sensibilidade (ou resistência) de uma determinada espécie a uma substância tóxica, a um efluente ou a uma amostra ambiental suspeita de contaminação. Também podemos identificar o impacto de um poluente por meio da comparação entre comunidades com ausência (controle) e presença do poluente ou ainda em um gradiente de poluição. Nesta abordagem, normalmente se avalia a estrutura e a composição das comunidades, assim como a dinâmica de populações de espécies dominantes (Gesteira & Dauvin 2000).

Vários organismos são capazes de acumular poluentes do ambiente aquático através da transferência de substâncias presentes na água e ou sedimento (Vigano *et al*. 2007). Uma das principais vantagens de se utilizar organismos marinhos como bioacumuladores é a possibilidade de se monitorar a entrada de substâncias de difícil medição na água devido à baixa concentração. Neste sentido, algas marinhas e bivalves vêm sendo frequentemente utilizados no monitoramento de hidrocarbonetos, metais pesados e organoclorados (Vasquez & Guerra 1996; Kirso & Irla 1998; Filho *et al.* 1999; Taniguchi 2002; Davis *et al.* 2003; Crespo & Yusty 2004; Colombo *et al*. 2005; Roberts *et al*. 2008; Pereira *et al.* 2007, 2011), no entanto, estudos sobre a incorporação de hidrocarbonetos por algas bentônicas são pouco freqüentes, mas já foi revelado a presença desses compostos em diferentes espécies de algas, incluindo feofíceas (Lytle *et al*. 1979; Knutzen & Sortland 1982) e entre elas a alga parda do gênero *Sargassum* (Laquia 2006).

Bancos de *Sargassum* (Phaeophyta - Fucales) são muito abundantes em diversas localidades da costa brasileira (Eston *et al.* 1986; Eston & Bussab 1990). Na região sudeste os bancos de *Sargassum* são particularmente conspícuos em costões de áreas rasas, podendo representar mais de 80% da

cobertura e biomassa de algas em determinadas áreas do litoral dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Paula & Oliveira Filho 1980; Paula & Eston 1987; Széchy & Paula 2000).

A fauna associada à *Sargassum* é extremamente diversa e numerosa, sendo o grupo dos anfípodes um dos mais representativos (Curvêlo 1998; Dubiaski-Silva 1999; Leite *et al*. 2000; Lima 2002; Leite & Turra 2003). Estes animais vêm sendo apontados como eficientes bioindicadores do ambiente marinho devido a sua representatividade numérica, reduzida mobilidade e sensibilidade a uma variedade de poluentes (Thomas 1993). A sensibilidade da fauna de anfípodes de substrato não consolidado à contaminação por petróleo e seu valor como bioindicador de recuperação ambiental já foram confirmados em vários estudos (Sanders *et al*. 1980; Bonsdorff *et al*. 1990; Dauvin & Gentil 1990; Nikitik & Robinson 2003; Gómez- Gesteira & Dauvin 2003; Gerra-García *et al*. 2003). Por outro lado, estudos recentes também revelaram o potencial de anfípodes associados à macroalgas, particularmente os caprelídeos no monitoramento de compostos organometálicos presentes em tintas anti-incrustantes como o tributil-estanho (TBT) no ambiente marinho (Takeuchi *et al*. 2001; Ohji *et al.* 2003).

O litoral norte do Estado de São Paulo que abrange os municípios de Ubatuba, Caraguatatuba, São Sebastião e Ilhabela (São Paulo, Decreto nº 49.215) está sob forte impacto antrópico devido às operações do maior terminal de carga e descarga de petróleo e derivados do país, o Duto e Terminais Centro Sul (DTCS) localizado no Canal de São Sebastião e também devido as descargas frequentes de esgotos domésticos, bem como atividades náuticas relacionadas ao turismo (Furtado *et al.* 1987; Milanelli 1994; Lima 2002; CETESB 2008).

A contaminação por hidrocarbonetos de alifáticos e policíclicos aromáticos derivados de petróleo do Canal já foi constatada em alguns estudos realizados com amostras de água e sedimento (Weber *et al*. 1998; Zanardi *et al*. 1999a; Zanardi *et al*. 1999b; Medeiros & Bícego 2004; Silva & Bícego 2010) e como as algas podem adsorver hidrocarbonetos na água (Marques *et al*. 2002, Laquia 2006), esse

trabalho teve como objetivos responder as perguntas: a alga parda *Sargassum furcatum* Kützing (1843) encontradas nos costões rochosos do Canal poderiam acumular os hidrocarbonetos dissolvidos na água? Os anfípodes da família Ampithoidae por serem herbívoros também acumulariam estes hidrocarbonetos por meio de cadeia trófica? Qual o efeito dos hidrocarbonetos presentes na alga parda *S. furcatum* sobre a população da espécie mais representativa entre os ampitoídeos?

Desta forma o primeiro capítulo deste trabalho teve como objetivo avaliar a presença de hidrocarbonetos em *S. furcatum* e anfípodes ampitoídeos associados em dois costões rochosos do Canal de São Sebastião. O capítulo 2 objetivou-se identificar quais são as espécies de ampitoídeos que ocorrem associadas à alga parda *S. furcatum*, e se existe variação espacial e temporal nas densidades destas espécies em seis costões rochosos do Canal. No capítulo 3 foi estudada a biologia populacional de *Cymadusa filosa*, Savigny (1816) uma espécie de família Ampithoidae que apresenta distribuição subtropical e tropical (Peart 2004) e é frequentemente encontrada associada a bancos de *Sargassum* do litoral norte do Estado de São Paulo (Tararam & Wakabara 1981, Wakabara *et al*. 1983, Leite *et al*. 2000, Jacobucci *et al*. 2002, Tanaka & Leite 2003; Jacobucci 2005; Leite *et al*. 2006).

A relação entre os hidrocarbonetos presentes na alga parda *S. furcatum* e a densidade e a estrutura populacional de *C. filosa*, a espécie mais abundante dentre os ampitoídeos do Canal de São Sebastião, foi investigado no capítulo 4.

Em virtude da melhor adequação da espécie de *C. filosa* a condições de laboratório assim como a facilidade de obtenção destes animais em campo e devido a sua representatividade numérica no Canal de São Sebastião, bem como forma de fornecer informações e subsídios para o uso desta espécie como indicadora de qualidade ambiental, foi realizado o estudo do comportamento reprodutivo o qual é apresentado no capítulo 5 e no capítulo 6, avaliou-se a sobrevivência de filhotes de *C. filosa* expostos à três xenobióticos por meio de testes de toxicidade aguda de curta duração.

Capítulo 1: Presença de hidrocarbonetos na alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 e nos anfípodes ampitoídeos associados, procedentes de dois costões rochosos do Canal de São Sebastião.

Introdução

Os hidrocarbonetos constituem uma das principais classes de compostos orgânicos e são também componentes abundantes da matéria orgânica nas zonas costeiras (Bícego *et al.* 2008). Quantidades consideráveis de tais compostos orgânicos, provenientes do petróleo e derivados, são introduzidas no ambiente marinho por meio de drenagem urbana, efluentes domésticos e industriais, atividades náuticas e pequenos derrames (Aleixo *et al.* 2007; Bícego *et al.* 2008). Uma fração dos hidrocarbonetos é assimilada pela biota, perdida por evaporação, fotooxidação, biodegradação, etc (ITOPF 2011/12). Entretanto, parte considerável desses compostos se deposita no sedimento, podendo permanecer ali durante anos (Volkman *et al*. 1992).

Dentre os hidrocarbonetos, aqueles provenientes do petróleo, que incluem os hidrocarbonetos alifáticos (HA) e policíclicos aromáticos (HPA), apresentam uma relativa persistência no ambiente, baixa biodegradabilidade e alta lipofilicidade, sendo, portanto, preocupantes do ponto de vista ambiental (Redman *et al.* 2002; Torres *et al.* 2008). Tanto hidrocarbonetos alifáticos como aromáticos podem ter origem biogênica (Bícego *et al.* 2008; Meire *et al*. 2007), entretanto, em amostras de água, algas e sedimentos a presença de alguns compostos como Mistura Complexa Não Resolvida (UCM), pristano e fitano, CPI e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, torna possível a distinção entre hidrocarbonetos de origens antrópicas como biológicas (Redman *et al.* 2002; Guerra-Garcia *et al*. 2003; Laquia 2006).

A UCM é caracterizada por uma mistura de compostos cíclicos ramificados presentes no petróleo que não podem ser separadas por meio de cromatografia gasosa (Volkman 1992). A razão entre os isoprenoides pristano e fitano é outro indicador poderoso da origem dos hidrocarbonetos,

pristano é geralmente encontrado no zooplacton enquanto que fitano é um componete comum em pretóleo, em regiões não contaminadas por petróleo a razão geralmente é entre 3 a 5, enquanto valores próximo a 1 sugerem contaminação por petróleo (Steinhauer & Boehm 1992). O índice de preferência de carbono (CPI) confere distinção efetiva entre os n-alkanos petrogênicos daqueles originados de ceras cuticulares de plantas superiores (Guerra-Garcia *et al*. 2003). Desta forma o monitoramento ambiental pode ser feito avaliando a presença ou ausência e a concentração destes hidrocarbonetos em tecidos de diversos organismos marinhos, bem como na água e no sedimento (Medeiros & Bicego 2004).

As algas marinhas e bivalves estão sendo utilizados frequentemente no monitoramento de hidrocarbonetos, metais pesados e organoclorados (Vasquez & Guerra 1996; Kirso & Irla 1998; Montone *et al*. 2001; Taniguchi 2002; Davis *et al*. 2003; Crespo & Yusty 2004, Colombo *et al*. 2005; Chung *et al*. 2007; Pereira *et al.* 2007, 2011) em diversas partes do mundo. No Brasil a alga parda *Sargassum* já é utilizada para o monitoramentos de metais pesados (Nassar *et al.* 2002), na remoção destes elementos de efluentes industriais (Esteves *et al*. 2000) e Láquia (2006) indicou o seu potencial para monitoramento de hidrocarbonetos alifáticos.

Muitas espécies de anfípodes ocorrem associadas aos bancos de *Sargassum* do litoral paulista (Wakabara *et al*. 1983, Leite *et al*. 2000, Jacobucci *et al*. 2002, Tanaka & Leite 2003, Leite *et al*. 2007), estes animais vêm sendo considerados como bioindicadores por que apresentam importância ecológica, representatividade numérica, reduzida mobilidade, sensibilidade a uma variedade de xenobióticos marinho (Thomas 1993) e por acumularem tais substâncias (Knutzen & Sortland 1982; Landrum *et al*. 2003). Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de hidrocarbonetos alifáticos (HA) e aromáticos (HPA) na alga parda *Sargassum furcatum* Kützing (1843) e nos anfípodes associados da família Ampithoidea, coletados em dois costões rochosos localizados no Canal de São Sebastião, uma região vulnerável à poluição por petróleo, devido às

operações do do terminal de carga e descarga de petróleo e derivados, o Dutos e Terminais Centro Sul (DTCS), mas também pelos aportes crônicos referentes às marinas, garagens náuticas, águas de drenagem urbana, lançamento de esgotos e outras fontes difusas (Medeiros & Bícego 2004; Pereira *et al*. 2007).

Material e Métodos

1. Área de estudo

As coletas foram realizadas em 2 costões rochosos localizados no Canal de São Sebastião localizado no litoral norte do Estado de São Paulo (Fig.1).

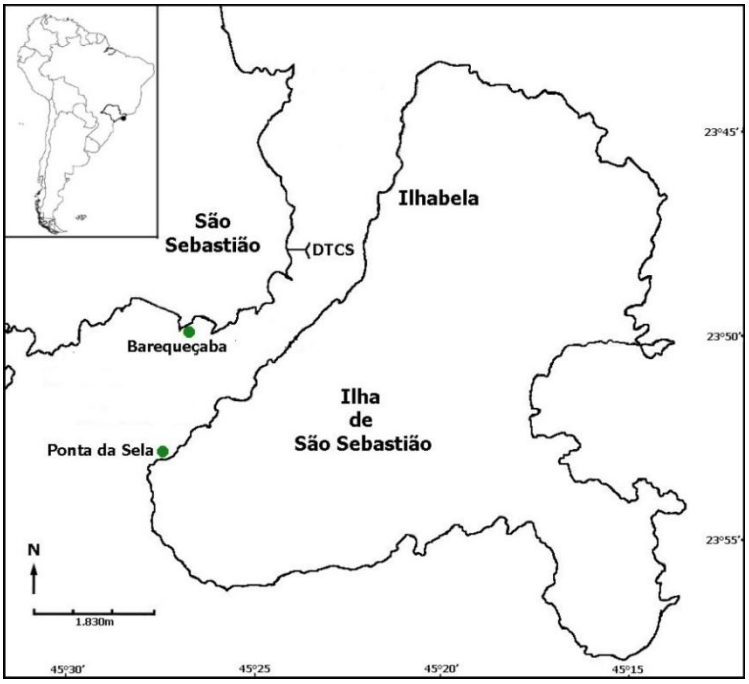


Figura 1: Localização dos costões rochosos estudados no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo. Modificado de Denadai (2001).

Este Canal separa o continente da Ilha de São Sebastião, a segunda maior Ilha do Brasil, formando uma área protegida ideal para operações com navios (Arasaki *et al*. 2004)(Fig. 1). Apresenta uma extensão de 22 km, largura de 5,6 a 7,2 km nas duas entradas, estreitando-se para 1,9 km na região central, onde sua profundidade máxima pode alcançar 45 metros (Castro *et al.* 2008). A paisagem é

bastante heterogênea no Canal, constituída de praias intercaladas por costões rochosos proeminentes e muitas vezes extensos (Rocha 1988). Tais costões rochosos normalmente apresentam um lado mais exposto à movimentação de água e outro lado mais protegido, onde se acumulam pequenos blocos de rocha na frente do costão (Giordano 1986).

No Canal de São Sebastião encontra-se o Duto e Terminais Centro Sul (DTCS)(Fig.1), antigo Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR) que constitui o principal terminal marítimo do país, respondendo por mais de 60% da movimentação de petróleo e derivados do país (Santos & Câmara 2002). O impacto antrópico nesta região está relacionado principalmente às atividades turísticas e do setor petroquímico, responsáveis por lançamentos freqüentes de esgoto, petróleo e derivados (Zanardi *et al*. 1999b; CETESB 2008).

2. Procedimentos de amostragens e Análises químicas

As coletas foram realizadas em março, maio, agosto e novembro de 2008. Em cada costão rochoso as frondes de *S. furcatum* foram coletadas por meio de mergulho livre entre 1 a 2 m de profundidade. As frondes foram raspadas do substrato com auxílio de uma espátula e colocadas em sacos de tecido novos (sem uso anterior) com malha de 0,2 mm e transferidas para bandejas de alumínio previamente calcinadas a 400^{o}C, identificadas e acondicionadas em caixas de isopor, no barco. Este material foi levado ao laboratório do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP).

Cada bandeja foi aberta para a seleção de folíolos de *S.furcatum*, eliminando epífitas que poderiam alterar os resultados. Os folíolos separados, totalizando aproximadamente 20g em cada amostra, foram novamente embalados em bandejas esterilizadas e congelados.

Os anfípodes foram removidos do restante das algas com auxílio de um microcópio estereoscópio, indivíduos da família Ampithoidae foram identificados até se obter a quantidade de 10

g. Estes animais foram armazenados em frascos de vidros previamente descontaminados e congelados. Tanto as amostras da alga *S. furcatum* quanto as dos anfípodes ampitoídeos foram enviados posteriormente para o Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Ocenográfico da Universidade São Paulo (IO-USP), no qual foram realizadas as análises dos teores de hidrocarbonetos. Neste laboratório, as amostras de *S. furcatum* e anfípodes ampitoídeos foram secas durante 72 horas em liofilizador Thermo Savant – modulyo D. em seguida, foram maceradas e homogeneizadas em almofariz com pistilo e armazenadas em frascos de vidro previamente limpos com solvente.

A extração dos hidrocarbonetos dos anfípodes ampitoídeos e da alga *S. furcatum* foi baseada no método proposto por MacLeod *et al*. (1986). Uma porção de cada uma das amostras foi extraída com n-hexano e diclorometano 50% (v/v) em soxhlet durante 8 horas. O grau de pureza dos solventes era "para análise de resíduos orgânicos", ambos da J. T. Baker, Estados Unidos. Antes da extração foram adicionados 100 μL dos padrões internos (surrogate) com diferentes concentrações no branco e em cada uma das amostras. Para os hidrocarbonetos alifáticos (HA) e policíclicos aromáticos (HPA) foram adicionados hexadeceno e eicoseno (50 ng μL^{-1}) e naftaleno-d_8, acenafteno-d_{10}, fenantreno-d_{10}, criseno-d_{12} e perileno-d_{12} (5 ng μL^{-1}), respectivamente, em todas as amostras, brancos e materiais de referência certificados (SRM).

O extrato evaporado foi submetido a uma coluna cromatográfica contendo 8 gramas de sílica gel sobre 16 gramas de alumina (ambas da Merck) 5% desativadas com água pré-extraída e 1 grama de sulfato de sódio da J. T. Baker no topo. A eluição foi feita com 80 ml de uma mistura de n-hexano e diclorometano (50%). O eluato foi concentrado novamente e foram adicionados os padrões internos cromatográficos 100 tetradeceno (50 ng μL^{-1}) para os alifáticos e (benzo(b)fluoranteno-d_{12} - 5 ng μL^{-1}) para um volume final de 1 ml.

Uma alíquota do extrato final foi injetada no cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (GC-FID 6890) para análise de hidrocarbonetos alifáticos e outra no cromatógrafo

a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS 6890/5973N) ambos da Agilent Technologies. As temperaturas do injetor e detector do GC-FID foram de 300^{o}C e 325^{o}C, respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio ultrapuro e o gás auxiliar foi o nitrogênio. As temperaturas do GC-MS foram de 280 e 300^{o}C no injetor e na interface e na fonte de íons, respectivamente e o gás de arraste foi o hélio. A injeção em ambos os equipamentos foi feita em splitless e a coluna capilar utilizada foi de sílica fundida com 30 metros, 0,32 mm, de diâmetro interno e 0,25 um de filme de 5% fenilmetilsiloxana da J&W Scientific. A programação da rampa de temperatura foi 40^{o}C subindo a uma taxa de 20^{o}C min^{-1} até 60^{o}C e em seguida até 290^{o}C a 5^{o}C min^{-1} e em seguida a 10^{o}C min^{-1} até 300^{o}C ficando isotérmico durante 10 minutos. A identificação dos HAs e HPAs foi feita por comparação dos tempos de retenção com padrões de referência da Accustandard, EUA. Os compostos analisados no GC-MS em modo SIM (monitoramento seletivo de íons) também foram identificados também através do espectro de massas. A quantificação foi feita por razões entre os surrogates e os compostos de interesse, baseadas nas curvas analíticas montadas com pelo menos 05 concentrações diferentes de cada grupo de compostos. Os hidrocarbonetos alifáticos quantificados foram os n-alcanos, incluindo C12–C34, isoprenóides (pristano, fitano) e os HPA quantificados foram os compostos com 2-5 anéis e seus alquilsubstituídos.

O controle de qualidade analítica incluiu a análise de brancos, branco fortificado, matriz fortificada e duplicata de amostra, material de referência certificado (SRM 2978 (Mussel Tissue) proveniente da National Institute of Standards and Technology (NIST) dos Estados Unidos (EUA).

3. Análise dos dados

Foram calculados a razão Pristano/Fitano e o índice de preferencia de carbono (CPI) como indicadores de poluição por petróleo (Guerra-Guarcia 2003).

Para verificar se as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos totais e policíclicos aromáticos

encontradas nas amostras da alga parda *S. furcatum* e de anfípodes ampitoídeos diferem entre si e entre os costões rochosos, foi realizado um teste de análise de variância bifatorial (ANOVA) onde a concentração foi a variável resposta e os fatores foram: o tipo de organismo (alga e anfípode) e o local de amostragem (Ponta da Sela e Barequeçaba). Para realização desta análise os dados foram logaritimizados e avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias (Zar 1998).

Resultados

Os hidrocarbonetos alifáticos quantificados nas amostras de *S. furcatum* e anfípodes ampitoídeos foram os n-alcanos, alifáticos resolvidos e a UCM (Mistura Complexa Não Resolvida)(Tab. 1 e 2). Dentre os n-alcanos encontrados, observa-se um padrão de distribuição dos hidrocarbonetos, ocorrendo compostos com maiores concentrações entre n-C_{13} e o n-C_{26}, destacando-se o n-$C_{17,}$ nas amostras de algas de Barequeçaba e da Ponta da Sela nos meses de amostragem (Fig. 2). Os n-alcanos encontrados nos anfípodes ampitoídeos também apresentou padrão semelhante de distribuição entre os costões rochosos, ocorrendo duas modas de distribuição: a primeira entre os n-alcanos n-C_{17} ao n-C_{24} e a segunda ocorrendo entre n-C_{25} ao n-$C_{35,}$ havendo o predomínio dois n-alcanos o n-$C_{17\ e}$ n-C_{29} (Fig. 3).

Tabela 1: Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos, razão pristano/fitano e índice de preferência de carbono(CPI) encontrados nas amostras de *Sargassum furcatum* (µg g^{-1} peso seco) coletadas nos costões rochosos da Ponta da Sela e Barequeçaba no ano de 2008.

	Ponta da Sela			**Barequeçaba**			
	Janeiro	**Agosto**	**Novembro**	**Janeiro**	**Maio**	**Agosto**	**Novembro**
n-alcanos	9,9	14,8	7,7	5,26	14,8	15,6	4,28
Alifáticos resolvidos	41,8	82,3	29,3	61,1	57,7	63,4	16,4
UCM*	n.d.	412	49,8	n.d.	204	12,8	27,9
Pristano/fitano	8,8	0,84	0,51	0,332	0,82	0,6	n.c.
CPI	0,61	1,5	1,1	0,188	1,5	1,6	1,24
Alifáticos totais	41,8	494,3	79,1	61,1	261,7	76,3	44,3

*Mistura Complexa Não Resolvida ; n.d. – abaixo do limite de detecção; n.c.- não calculado

Tabela 2: Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos, razão pristano/fitano e índice de preferência de carbono(CPI) encontrados nas amostras de anfípodes ampitoídeos coletadas nos costões rochosos da Ponta da Sela e Barequeçaba.

	Ponta da Sela			Barequeçaba			
	Janeiro	**Agosto**	**Novembro**	**Janeiro**	**Maio**	**Agosto**	**Novembro**
n-alcanos totais	14,6	12,4	15,1	7,85	22,1	44,5	27
Alifáticos resolvidos	561	227	407	657	164	199	266
UCM*	n.d.	n.d.	nd	n.d.	n.d.	n.d.	nd
CPI	0,289	1,8	3,25	0,29	1,9	34,8	26,1
Pristano/fitano	n.c.	n.c.	n.c.	0,844	n.c.	n.c.	2,8
Alifáticos totais	561	227	407	657	164	199	266

*Mistura Complexa Não Resolvida ; n.d. – abaixo do limite de detecção ; n.c.- não calculado

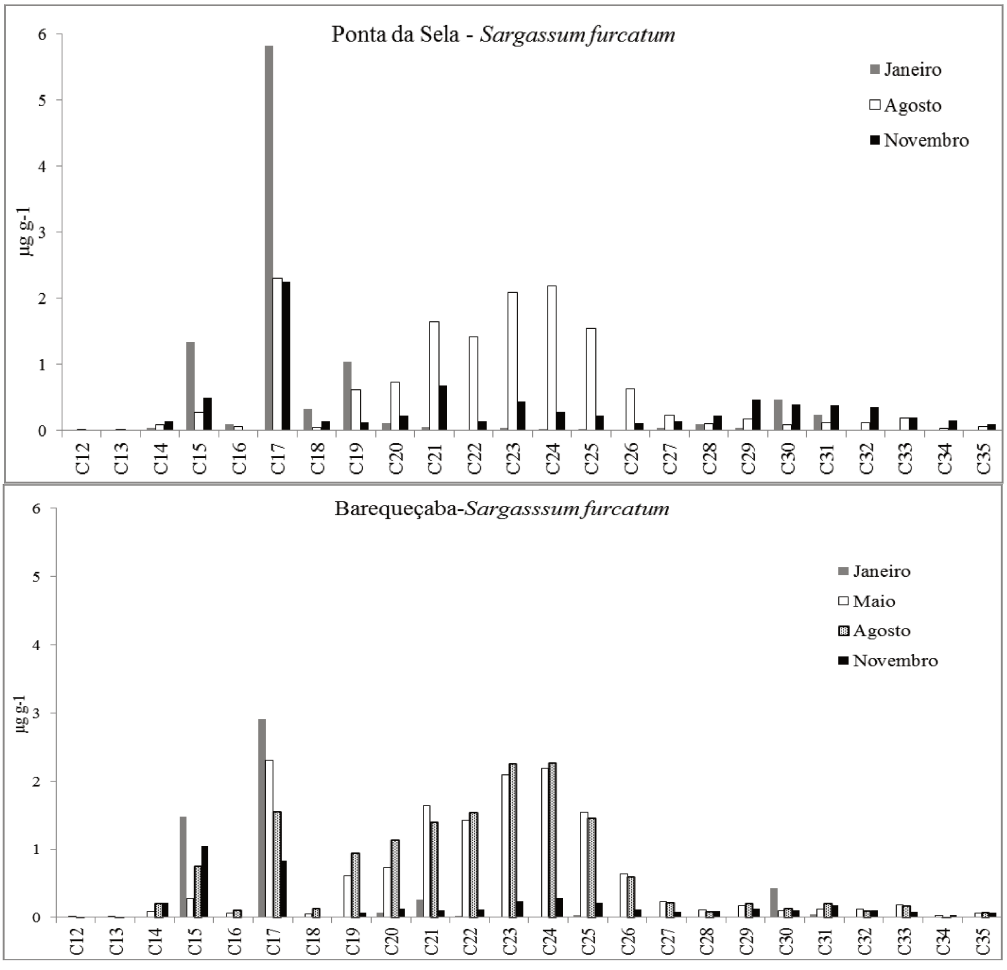


Figura 2: Perfis de distribuição dos hidrocarbonetos alifáticos n-alcanos quantificados nas amostras de *Sargassum furcatum* nos costões rochosos da Ponta da Sela e da Praia de Barequeçaba nos meses de amostragem.

A UCM (Mistura Complexa Não Resolvida) esteve presente nas amostras de *S. furcatum* na Ponta da Sela em agosto e novembro e não foi detectada nas amostras da alga de Barequeçaba em março e a maior concentração desta mistura foi encontrada na Ponta da Sela em novembro (412 $\mu g\ g^{-1}$ peso seco)(Tab. 1.). A razão Pristano/Fitano foi elevada na Ponta da Sela (8,8) em março, entretanto valores < 1 dominaram as amostras de algas nos meses de amostragens. Nos anfípodes esta razão só foi determinada para as amostras de Barequeçaba onde a razão foi de 0,82 em março e de 2,8 em novembro (Tab. 1 e 2). O índice de preferência de carbono (CPI) foi calculado tanto para as amostras de *S. furcatum* quanto para as amostras de Ampithoidae, contudo os valores deste índice foram mais variáveis nas amostras de anfípodes entre os costões e entre os meses de amostragem, nestes animais o CPI foi elevado em agosto e novembro no costão rochoso da Praia de Barequeçaba (Tab. 1 e 2).

As concentrações de hidrocarbonetos de alifáticos totais (UCM + alifáticos resolvidos) não diferiram significativamente entre os costões rochosos, contudo, as concentrações destes compostos foram maiores nas amostras anfípodes ampitoídeos do que nas amostras de *S. furcatum* ($F_{1, 10}$= 7,08; p=0,02)(Fig.4; Tab. 3).

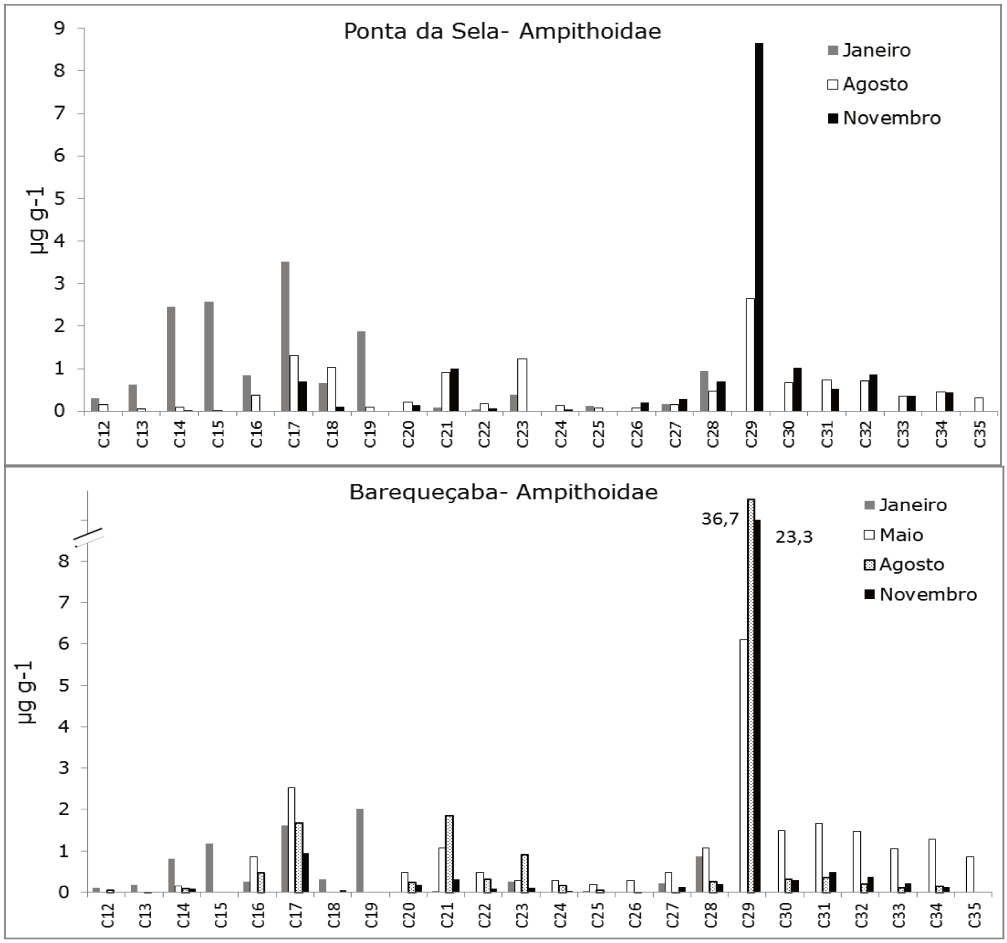


Figura 2: Perfis de distribuição dos hidrocarbonetos alifáticos n-alcanos quantificados nas amostras de Ampithoidae nos costões rochosos da Ponta da Sela e da Praia de Barequeçaba nos meses de amostragem.

Tabela 3: Analise de variância (ANOVA) comparando as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (HA) e policíclicos aromáticos (HPA) entre costões rochosos (Ponta da Sela e Barequeçaba) e entre as amostras de *S. furcatum* e as amostras anfípodes ampitoídeos (organismos).

	gl	SQ	F	p
HA				
Costões	1	0,06	0,49	0,49
Organismos	1	0,89	7,08	0,02
Costões.organismos	1	0,00001	0,0001	0,99
Resíduo	10	0,125		
HPA				
Costões	1	0,001	0,007	0,93
Organismos	1	0,21	0,83	0,38
Costões.organismos	1	0,01	0,04	0,84
Resíduo	10	0,25		

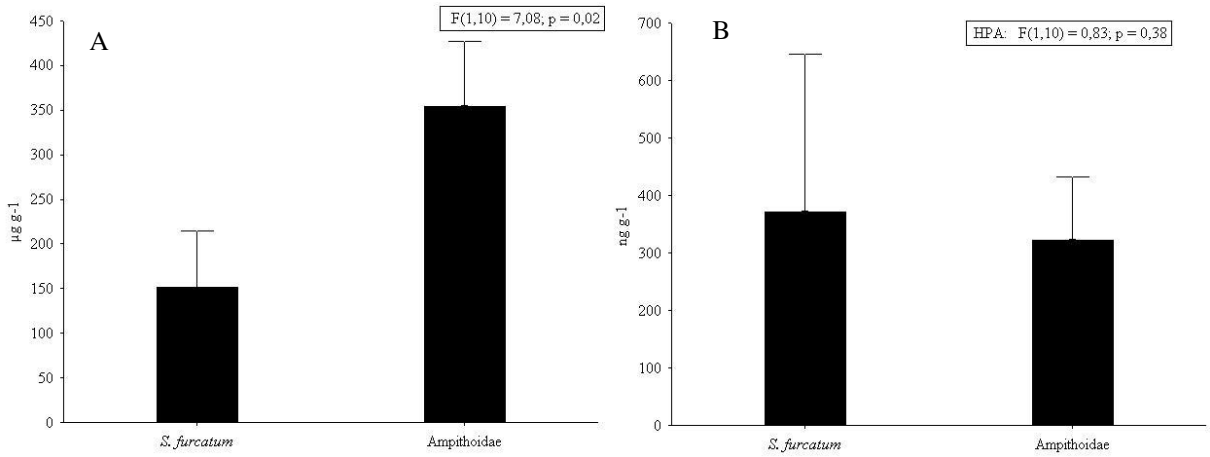


Figura 4: Concentração média de hidrocarbonetos alifáticos (A) e policíclicos aromáticos (B) encontrados nas amostras de *S. furcatum* e anfípodes da família Ampithoidae, coletadas nos costões rochosos de Barequeçaba e Ponta da Sela.

Com relação aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os compostos de baixo peso molecular (2 aneis aromáticos) como metil, dimetil, trimetilnaftalenos e o naftaleno foram dominantes nas amostras de *S. furcatum* assim como nos anfípodes ampitoídeos, contudo concentrações elevadas destes compostos foram encontrados na amostra de *S. furcatum* coletada no costão rochoso da Praia de Barequeçaba em agosto de 2008, na qual o hidrocarboneto policíclico aromático naftaleno se destacou em termos de concentração (1073 $ng.g^{-1}$peso seco) (Fig. 5 e 6).

Também foram encontrados compostos com maior peso molecular como o pireno e criseno (4 aneis aromáticos) nos anfípodes e nas algas dos dois costões rochosos e na amostra de alga do mês de agosto respectivamente.

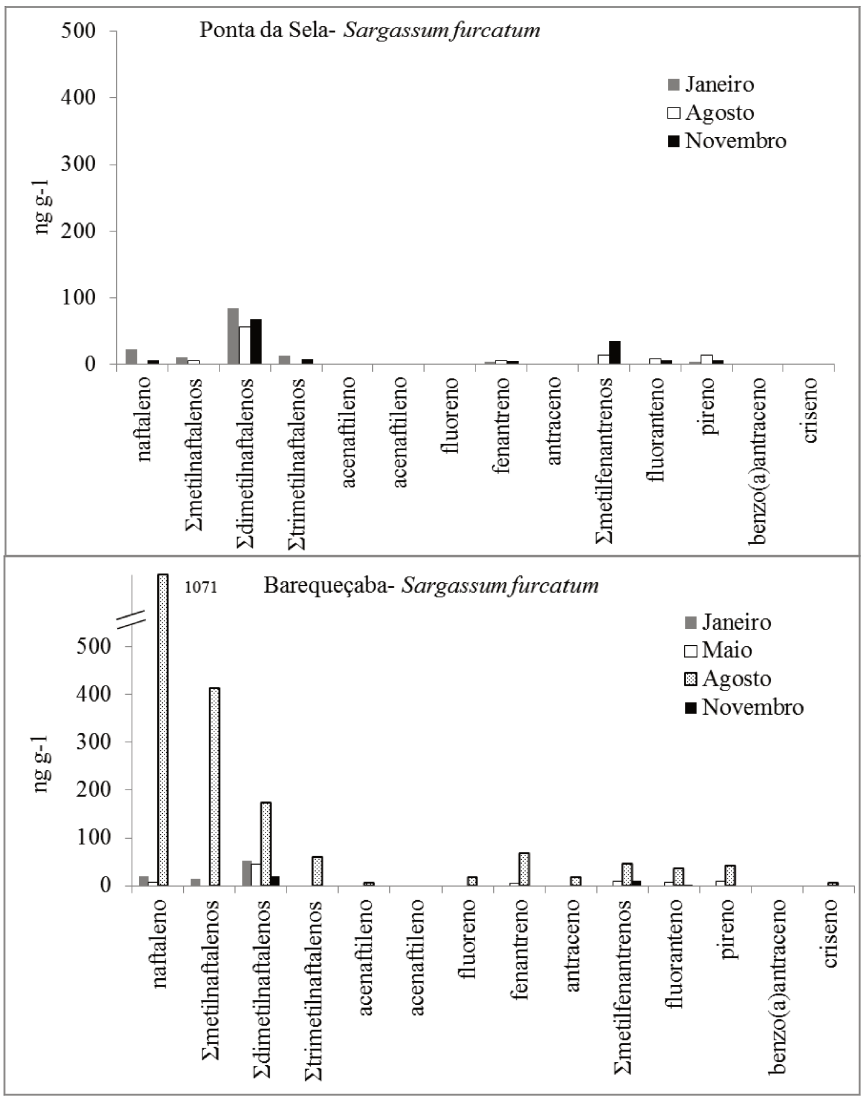


Figura 5: Perfis de distribuição dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos quantificados nas amostras de *Sargassum furcatum* nos costões rochosos da Ponta da Sela e da Praia de Barequeçaba.

As concentrações de os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontradas tanto nos anfípodes quanto nas algas no geral foram menores que as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e não houve diferença significativa entre os costões rochosos e entre a alga *S. furcatum* e os anfípodes ampitoídeos associados quanto a concentação de tais hidrocarbonetos (Fig. 4-B; Tab. 3).

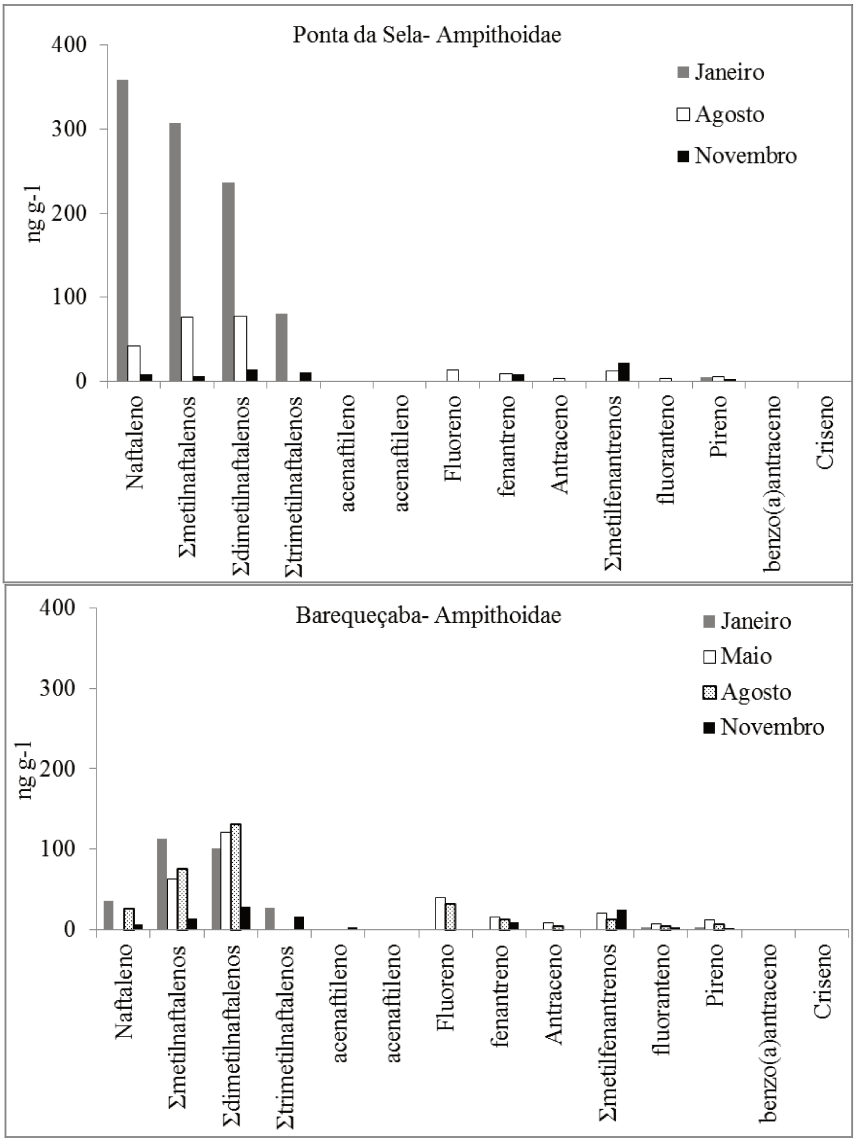


Figura 6: Perfis de distribuição dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos quantificados nas amostras de *Sargassum furcatum* nos costões rochosos da Ponta da Sela e da Praia de Barequeçaba.

Discussão

Os resultados do estudo indicam que os costões rochosos estudados foram expostos a petróleo ou derivados de petróleo uma vez que, nas amostras de *S. furcatum* foi possível identificar a presença da Mistura Complexa Não Resolvida (UCM) entre os hidrocarbonetos alifáticos. Tal mistura é constituída de compostos de óleo que são resistentes à degradação (Farrington *et al.*1977; Guerra-

Garcia *et al.* 2003), contudo a origem dos hidrocarbonetos alifáticos nas amostras de algas está associada tanto a fontes antropogênicas, como o petróleo, quanto à fonte biogênica, visto que o no perfil de distribuição dos n-alcanos (Fig. 2), elevadas concentrações de n-C_{17} foram encontradas. Segundo Philp (1985), os n-alcanos mais abundantes nas algas bentônicas e fitoplâncton marinho são os de cadeia ímpar entre n-C_{15} ao n-C_{21}, principalmente o n-C_{15} e o n-C_{17}, conforme foi visto neste estudo.

A procedência dos hidrocarbonetos alifáticos também pode ser avaliada, observando a presença individual de alguns hidrocarbonetos ramificados em tecidos de alguns organismos, dentre os quais, podem-se destacar o pristano (C_{19}) e fitano (C_{20}), isoprenóides mais comuns na maioria dos sedimentos marinhos, pois estão presentes em todos os petróleos e também em fontes naturais (Bícego *et al* 2008). O pristano é mais comum entre os hidrocarbonetos biogênicos, enquanto que o fitano raramente é biossintetizado (Guerra-Garcia *et al.* 2003). Sendo assim, pode-se utilizar a razão pristano/fitano para diferenciar a origem dos hidrocarbonetos nas amostras de organismos (Bícego *et al*. 2008). Em amostras não contaminadas por óleo, a razão é maior que um, normalmente entre 3 e 5 (Steinhauer & Boehm, 1992) como a grande maioria das amostras de *S. furcatum* apresentou uma razão próxima a 1, tal resultado confirma novamente a origem petrogênica dos hidrocarbonetos alifáticos encontrados nesta alga.

Da mesma forma que foi observada nas amostras de *S.furcatum,* alguns hidrocarbonetos alifáticos presentes nas amostras de anfípodes da família Ampithoidae também indicam que tais hidrocarbonetos podem ser derivados de petróleo e de origem biogênica. Por exemplo, nos perfis de distribuição de n-alcanos (Fig. 3) notam-se elevadas concentrações de n-C_{29}, o qual pode ser adquirido por meio de adsorção e ou consumo de partes da alga *S. furcatum*, uma vez que este hidrocarboneto alifático pode ser proveniente de ceras cuticulares de plantas superiores (Philp 1985) e também foi

encontrado nas amostras de algas. Outro n-alcano que pode ter sido acumulado via teia trófica é o n-$C_{17,}$ encontrado em grandes concentrações na alga parda *S. furcatum*.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos dominantes nas amostras de *S. furcatum* e de anfípodes ampitoídeos foram os de baixo peso molecular como metil, dimetil, trimetilnaftalenos e onaftaleno, isto pode ser explicado devido suas características hidrofóbicas, dado que, a distribuição na coluna d'água destes hidrocarbonetos é regida pela solubilidade na água e as propriedades de partição associadas, representadas pelo coeficiente de partição octanol-água K_{ow}, sendo comum encontrar os hidrocarbonetos de menor peso molecular, normalmente constituídos de 2 ou 3 anéis aromáticos dissolvidos na água (IMW 1995). A alga *S. furcatum* por sua vez poderia refletir e acumular as concentrações de hidrocarbonetos do ambiente onde vivem, assim como foi observado em outras espécies de algas pardas coletadas em uma região moderadamente poluída da Costa da Noruega (Knutzen e Sortland 1982). Por outro lado os anfípodes poderiam acumular estes hidrocarbonetos pelo contato direto com a água ou por consumo de sua alga hospedeira. Esta hipótese pode ser suportada por alguns estudos desenvolvidos com outras espécies de anfípodes. Segundo Pastorinho *et al.* (2009), a acumulação de cobre, outro poluente marinho, pelo anfípode marinho herbívoro *Echinogammarus marinus* Leach, pode ocorrer de duas formas: pelo contato com água contaminada por este metal e ou pela alimentação. Adicionalmente foram encontradas concentrações mais elevada de tributil-estanho (TBT) nos ampitoídeos *Cymadusa compta* Smith, alimentados com fragmentos de gramas marinhas expostos ao TBT (Kelly *et al*. 1990).

Os costões rochosos amostrados neste estudo estão expostos a diferentes fontes de contaminação, enquanto o costão rochoso da Ponta da Sela pode sofre impactos das lavagens clandestinas de porões de petroleiros (Bícego *et al.* 2008), o costão rochoso da Praia de Barequeçaba está mais sujeito a poluição de efluentes domésticos devido a sua proximidade as atividades turísticas e

influência urbana, uma vez que neste local existe um bairro residencial. Este fato poderia explicar as concentrações mais elevadas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados neste local, já que estes compostos podem ser provenientes de embarcações turisticas e de efluentes domésticos (Bícego *et al.* 2004; Pereira *et al*. 2007). Contudo não foi observado diferença significativa entre as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos entre os costões rochosos amostrados, todavia as concentrações de alifáticos foram maiores nas amostras de anfípodes ampitoídeos do que nas amostras de *S. furcatum*, sugerindo uma biocumulação destes poluentes

De forma geral tanto os hidrocarbonetos alifáticos quanto o policíclicos aromáticos encontrados nas algas e nos anfípodes apresentaram derivados de petróleo, indicando a contaminação da região do Canal de São Sebastião. As algas podem absorver estes compostos presentes na água enquanto que os ampitoídeos podem acumulá-los via contato ou por ingestão de algas contaminadas uma vez que a concentração média de hidrocarbonetos alifáticos foi maior. Contudo devido ao pequeno número de amostras obtidas neste estudo, trabalhos adicionais são necessários para comprovação dos resultados.

Capítulo 2: Riqueza, variação temporal e espacial das espécies de ampitoídeos associadas à alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 do Canal de São Sebastião.

Introdução

Os anfípodes são crustáceos que se destacam em termos de diversidade e abundância na comunidade de macrófitas marinhas (Mukai 1971; Edgar 1983; Norton & Benson 1983; Gunnill 1985) e em especial quando ocorrem associados à alga parda *Sargassum* (Curvêlo 1998; Dubiaski-Silva 1999; Jacobucci 2000; Lima 2002; Leite & Turra 2003).

A alga parda *Sargassum* é um componente conspícuo das comunidades de águas tropicais e subtropicais e geralmente ocorrem em bancos extensos desde a franja do infralitoral até o infralitoral (Paula & Oliveira Filho 1980). Na região sudeste do Brasil os bancos de *Sargassum* são particularmente abundantes em costões rochosos, representando a maior parte da cobertura e biomassa de algas em determinadas áreas do litoral dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Paula & Oliveira Filho 1980; Paula & Eston 1987, Széchy & Paula 2000) sendo encontrados tanto em costões rochosos abrigados como expostos ou semi-expostos à ação das ondas (Schézy & Paula 2000; Tanaka & Leite 2003; Schézy & Veloso 2008). Tais características hidrodinâmicas dos costões rochosos podem ocasionar diferenças estruturais entre populações de *Sargassum cymosum*, onde em locais protegidos da ação das ondas mostram-se mais abundantes em termos de biomassa (Paula & Oliveira Filho 1980; Leite *et al.* 2000). Contudo a estruturação dos bancos de *Sargassum* relaciona-se tanto com fatores abióticos como hidrodinamismo, temperatura e profundidade (Jacobucci *et al*. 2010), quanto a fatores biológicos como a fenologia das diferentes espécies *Sargassum* e a interação com fauna de herbívoros (Cruz-Rivera & Hay 2000; Jacobucci 2005).

Os anfípodes da família Ampithoidae representados no litoral paulista pelas espécies de *Ampithoe ramondi* Audouin 1826, *Cymadusa filosa* Savigny1816, *Sunampithoe pelagica* Milne

Edwards 1850, (Wakabara e*t al*. 1983; Leite *et al.* 2000; Tanaka & Leite 2003; Jacobucci & Leite 2006; Tanaka & Leite 2007; Leite 2011; Leite *et al.* 2011) exercem influência na estruturação das comunidades de *Sargassum* (Cruz-Rivera & Hay 2000; Jacobucci 2005; Jacobucci & Leite 2008) por que além consumir seus tecidos, utiliza-os para construção de seus abrigos em forma de tubo (Brawley 1992; Appadoo & Myers 2003, Roberts *et al.* 2008b). O sucesso dessas três espécies tubícolas no mesmo ambiente pode estar relacionado a diferentes aspectos de sua biologia, incluindo diferenças nos períodos reprodutivos, na fecundidade e na duração do desenvolvimento embrionário (Steele & Steele 1975; Leite 1996a). Entretanto, fatores relacionados com a competição intraespecífica (Brawley & Adey 1981), a tolerância das espécies de anfípodes em relação à ação das ondas (Leite et al. 2000), ação de predadores, como os peixes (Nelson 1979) ou a poluição ambiental (Roberts *et al*. 2008b) podem atuar na estruturação da composição das espécies da família Ampithoidae influenciando a variação de suas densidades.

Apesar de existir vários estudos da comunidades de anfípodes associados a diferentes espécies de *Sargassum*, abordando diversos aspectos desta associação no litoral norte do Estado de São Paulo (Wakabara et al. 1983; Leite *et al.* 2000; Tanaka & Leite 2003; Jacobucci & Leite 2006, 2008; Tanaka & Leite 2007; Leite 2011; Leite *et al.* 2011), até o presente momento foi realizado apenas um estudo sobre a macrofauna associada à alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 dos costões rochosos do localizados no Canal de Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo (Lima 2002). Por outro lado, observa-se que alguns foram desenvolvidos com a fauna de anfípodes associada a fundos não consolidados deste Canal (Santos & Pires-Vanin 2002; Arasaki *et al.* 2004; Pires-Vanin 2008).

Os costões rochosos presentes no Canal apresentam ampla diversidade de substratos biológicos como algas, bivalves, poliquetas e cirripédias (Milanelli 2003) e possuem diferenças relacionas ao hidrodinamismo (Giordano 1986; Milanelli 2003), porém pouco se conhece sobre a dinâmica destes

substratos e da fauna associadas. Tal conhecimento pode fornecer subsídios para programas de monitoramento ambiental (Milanelli 2003), uma vez que o Canal de São Sebastião está sujeito à poluição por petróleo e seus derivados, devido às operações do Ductos e Terminais Centro Sul (DTCS), bem como das atividades turísticas e esgotos domésticos comuns em regiões litorâneas (Zanardi *et al*. 1999b; Arasaki *et al.* 2004; Medeiros & Bicego 2004; SMA 2006; CETESB 2008). Assim como forma de contribuir para o conhecimento da comunidade de anfípodes associados a algas, os objetivos deste trabalho foram: identificar quais são as espécies da família Ampithoidae que ocorrem associadas a bancos de *S. furcatum* presentes em seis costões rochosos do Canal e verificar se tais espécies apresentam variação espacial e temporal em suas densidades.

Materiais e Métodos

1.Área de Estudo

Este estudo foi desenvolvido em costões rochosos localizados no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo (Fig.1). O Canal é delimitado pela Ilha de São Sebastião e pelo o município de São Sebastião no continente, possui cerca de 22 km de extensão e larguras de 7,2 e 5,6 km, na entrada norte e sul respectivamente, porém, na parte central a largura é mais estreita sendo de 1,9 km (Castro *et al.* 2008)(Fig. 1). Os costões rochosos são os ecossistemas costeiros mais abundantes desta região (Milanelli 2003) dentre os quais, seis costões rochosos foram selecionados para realização deste estudo em virtude da presença de bancos de *S. furcatum*, e pelo fato de apresentar diferenças quanto ao grau de exposição as ondas. Segundo Milanelli (2003) os costões rochosos da Praia do Curral, Saco do Itapuã e Ponta da Sela apresentam grau moderado de exposição a ondas, podendo ser classificados em semi-abrigados, enquanto que os costões rochosos da Praia de Guarapocaia e Viana são abrigados. O costão rochoso do Ponta do Recife pode ser considerado semi-abrigado segundo os critérios de Széchy & Paula (2000)(Fig.1).

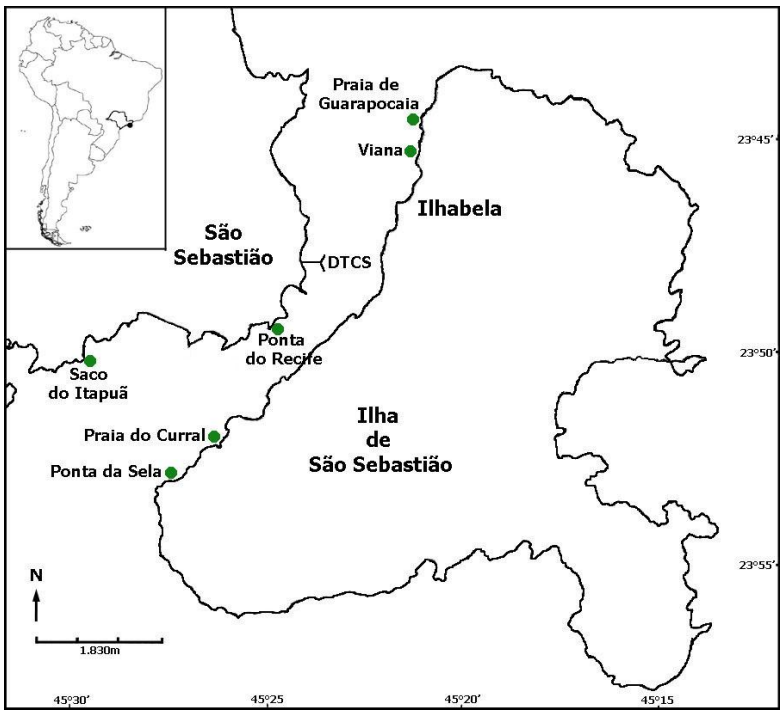


Figura 1: Localização dos **c**ostões rochosos estudados no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo. Modificado segundo Denadai (2001).

2. *Procedimentos de amostragens e tratamento dos dados*

As coletas foram realizadas nos meses de março, setembro, dezembro de 2007 e fevereiro de 2008 nos seis costões rochosos. A amostragem do material foi realizada por meio de mergulho livre entre 1 e 2 m profundidade. Nos bancos de *S. furcatum,* 10 frondes, foram coletadas aletoriamente ao longo de um transecto de 50m de extensão. As frondes foram cobertas com sacos de tecidos de malha de 0,2mm e transportadas até o laboratório do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar - USP).

No laboratório as algas foram mantidas no freezer até que os animais não apresentassem sinais vitais. Após este resfriamento, as algas foram submetidas a quatro lavagens sucessivas com água do mar e a água resultante desse processo foi filtrada em rede com malha de 0,2 mm para retenção da fauna que foi fixada em álcool 70%. As algas lavadas foram congeladas, e todo material foi

transportado para o Laboratório de Interações entre Comunidades Marinhas (LICOMAR- Unicamp). Neste laboratório, com o auxilio de um microscópio estereoscópico os anfípodes ampitoídeos foram separados da fauna, contados e identificados em nível específico.

As frondes de *S. furcatum* foram secas a 70°C em estufa durante 24 h e em seguida foram pesadas.

3. Análises dos dados

Para verificar se houve variação no peso seco das frondes de *S. furcatum* encontrados nos costões rochosos e entre os meses amostrados foi realizada análise de variância (ANOVA) bifatorial, onde a variável resposta foi o peso seco das frondes e fatores foram os costões rochosos e os meses de amostragem.

A densidade das espécies de ampitoídeos foi obtida, dividido-se o número de indivíduos de cada espécie pelo peso da fronde onde eles foram encontrados. Com estes dados foi verificado se a densidade das espécies, separadamente, variam entre os costões rochosos e entre os períodos de amostragem, por meio de analise de variância bifatorial (ANOVA) onde a variável resposta foi a densidade e os fatores foram os costões rochosos e os meses de amostragem. Quando os dados não se enquadavam nas premissas da ANOVA foi realizado o teste não paramétrico de kruskall Wallis. Para fins de normalização, as densidades das espécies de ampitoídeos foram tranformadas em log ou log (X+1)(Clarke & Warrick 2001) e os dados foram analisados quanto homogeneidade de variância (Zar 1998). Quando os resultados foram significativos foi realizado o teste *a posteriori* de comparações múltiplas de Tukey.

Resultados

Houve variação significativa da biomassa (peso seco) de *S. furcatum* entre os costões rochosos

e entre os períodos de amostragem ($F_{14,\ 207}$=4,61; p<0,001)(Fig.2). Em março de 2007 as maiores frondes foram encontradas nos costões rochosos da Praia de Guarapocaia e Viana (Fig.2). Em setembro a variação observada foi devido à ausência das frondes de *S. furcatum* no costão rochoso do Saco do Itapuã, neste mesmo período nota-se que a biomassa de *S. furcatum* dos costões rochosos da Ponta da Sela, Praia do Curral e Ponta do Recife foi diferente das frondes dos costões da Praia de Guarapocaia e Viana (Fig.2). Em dezembro de 2007 a biomassa média foi maior no costão rochoso Viana, a qual apresentou diferenças visíveis com relação às biomassas das algas dos costões rochosos da Ponta da Sela e Saco do Itapuã. Por outro lado a maior biomassa média das frondes de *S. furcatum* em fevereiro de 2008 foi encontrada no costão rochoso da Praia do Curral enquanto que as menores foram nos costões rochosos da Ponta da Sela e Saco do Itapuã (Fig.2). Analisando o peso seco das frondes de *S. furcatum* entre os meses amostrados, setembro diferiu dos demais períodos de coletas (Tukey; p< 0,05) por apresentar as menores frondes.

Foram encontrados associados às frondes de *S. furcatum* dos seis costões rochosos no período de estudo 3.881 indivíduos da família Ampithoidae pertencentes a seis espécies: *Cymadusa filosa* (1.627 indivíduos); *Sunampithoe pelagica* (908 indivíduos); *Ampithoe ramondi* (756 indivíduos); *Ampithoe* sp. (217 indivíduos), *Ampithoe divisura* Shoemaker, 1938 (67 indivíduos), *Ampithoe marcuzzi* Ruffo, 1954 (56 indivíduos)(Anexo 1) e 250 animais foram classificados como ampitoídeos jovens por serem animais pequenos e de difícil identificação em nível de gênero.

As espécies *Ampithoe* sp. e *A. marcuzzi* (Anexo 1: Fig. B e C) ocorreram apenas nos costões rochosos da Praia do Curral e Praia do Guarapocaia respectivamente, enquanto que *A. divisura* (Anexo 3: A) não foi encontrada no costão rochoso Viana (Tab.1) e *Sunampithoe pelagica* não ocorreu no Saco do Itapuã. *C. filosa* e *A. ramondi* ocorrem em todos os costões rochosos amostrados.

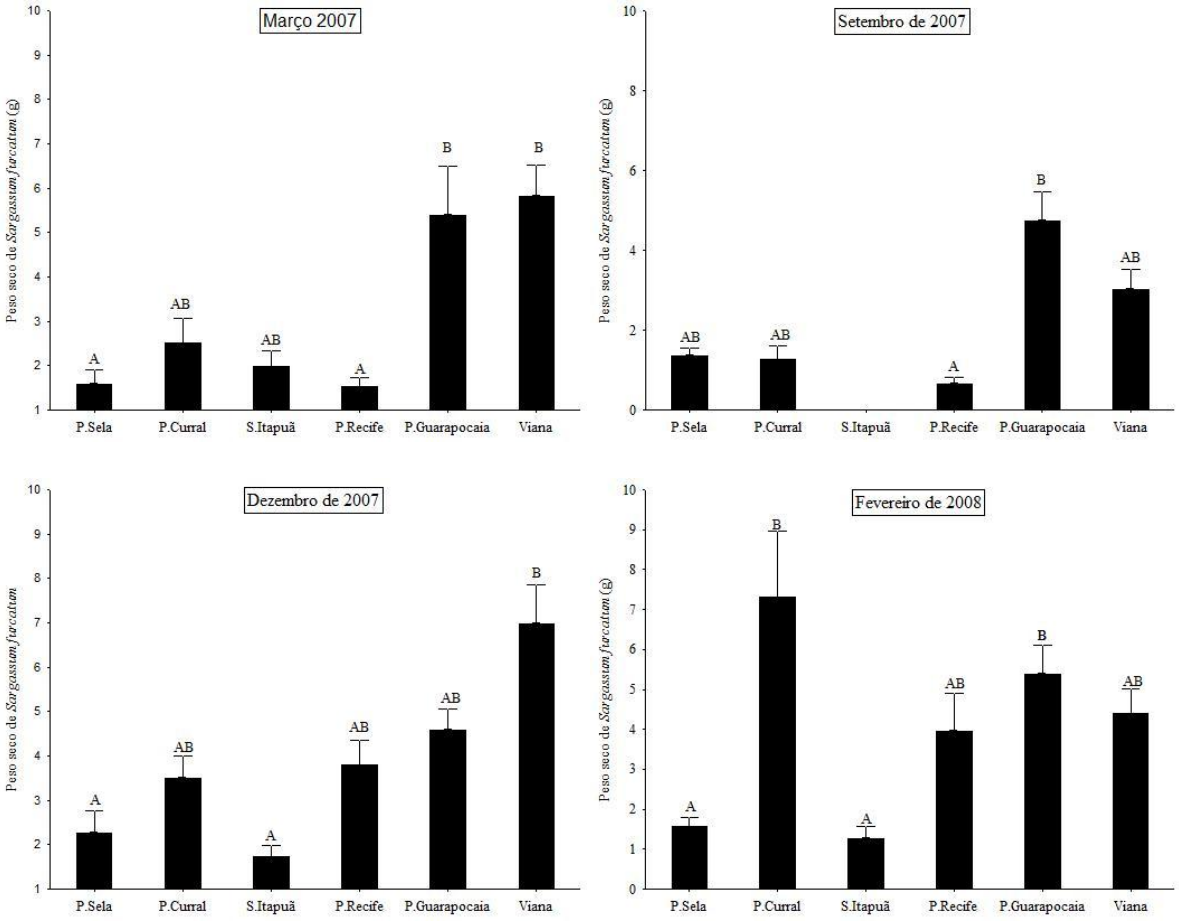


Figura 2: Peso seco em gramas(± erro padrão) das frondes de *Sargassum furcatum* coletadas nos costões rochosos nos 4 períodos de coletas (P.Sela = Ponta da Sela; P.Curral = Praia do Curral; P. Recife= Ponta do Recife; P.Guarapocaia= Praia de Guarapocaia). Barras com a mesma letra indicam ausência de diferença significativa (Tukey; $p< 0,05$).

Tabela 1: Espécies de ampitoídeos e sua ocorrência nos costões rochosos estudados.

Espécies	Costões rochosos					
	Ponta da Sela	Praia do Curral	Saco do Itapuã	Ponta do Recife	Praia de Guarapocaia	Viana
Ampithoe divisura	X	X	X	X	X	
Ampithoe marcuzzii					X	
Ampithoe sp.		X				
Ampithoe ramondi	X	X	X	X	X	X
Cymadusa filosa	X	X	X	X	X	X
Sunampithoe pelagica	X	X		X	X	X

Avaliando as espécies de ampitoídeos isoladamente, houve variação significativa das densidades de *C. filosa* entre os costões rochosos e entre os meses de amostragens ($F_{14,\ 207}$=2,94; p>0,001), sendo que as maiores densidades de *C. filosa* ocorreram em março de 2007 (Fig.4; Tab.2) (Tukey; p< 0,005). Neste mês, contudo, observou-se que a densidade de *C. filosa* encontrada no costão rochoso do Saco do Itapuã foi menor e diferiu dos demais costões rochosos (Fig.4; Tab.2), adicionalmente a densidade desta espécie também foi diferente entre os costões da Ponta da Sela e Saco do Itapuã em dezembro de 2007 enquanto que nos meses de setembro e fevereiro não foi encontrado diferenças nas densidades de *C. filosa* entre os costões rochosos (Fig.4). Por outro lado, a densidade de *A. ramondi* diferiu entre os costões rochosos amostrados ($H_{5,\ 200}$= 50,16; p<0,001)(Fig. 5A) e não foi observado variação significativa entre os períodos de coleta ($H_{3,\ 200}$ = 6,33; p = 0,09) (Fig. 5-B). A diferença observada da densidade de *A. ramondi*, de acordo com o teste *a posteriori* de comparação múltipla, indicou que costão rochoso do Saco do Itapuã diferiu dos demais costões, ocorrendo neste costão as maiores densidades desta espécie, sendo que em fevereiro encontrou-se em média 9,74 indivíduos por grama de peso seco de *S. furcatum* (Tab.2). A densidade de *S. pelagica* seguiu o mesmo padrão de *A. ramondi* apresentando diferenças significativas entre os costões rochosos ($H_{4;150}$= 26,51; p<0,001) e ausência de diferença significativa das densidades desta espécie entre os meses de ocorrência ($H_{3;\ 150}$= 7,67; p = 005), contudo, o teste de comparação múltipla indicou que a diferença entre os costões foi devido à elevada densidade de *S.pelagica* que ocorreu no costão rochoso da Praia do Curral em dezembro (6,22 inds/g-Tab.2 e Fig.6).

A espécie *A. divisura* não apresentou diferenças significativas em suas densidades tanto entre os costões rochosos ($H_{2;108}$ = 1,35; p = 0,50), quanto entre os meses de sua ocorrência ($H_{4;\ 108}$ = 9,15; p = 0,06) (Fig.7). A densidade média de *Ampithoe* sp., que ocorreu apenas no costão rochoso da Praia do Curral, não diferiu significativamente entre os períodos de coleta ($H_{3;40}$ = 4,7; p = 0,19) (Fig.8-1), no entanto, podemos observar que em setembro foi encontrado em média 6,79 indivíduos por grama de

peso seco de *S. furcatum* que correspondeu a maior densidade encontrada nesta coleta (Tab.2). Também não foi encontrada diferença significativa nas densidades *Ampithoe marcuzzi* ($H_{3,40}$ = 3,33; p = 0,34) (Tab.2) na Praia de Guarapocaia entre os períodos trabalhados embora esta espécie não tenha ocorrido em setembro (Fig.8-2).

De forma geral observa-se que dentre as seis espécies de ampitoídeos encontradas, cinco apresentam variação espacial em suas densidades, enquanto que *C. filosa* além de ocorrer em todos os costões rochosos nos quatro meses de amostragem, apresentou ampla variação na densidade tanto entre os locais amostados quanto entre os períodos de coletas.

Tabela 2: Densidades das espécies de ampitoídeos (média ± erro padrão de inds/g de peso seco de *Sargassum*) encontradas em cada costão rochoso entre os meses de coletas.

	Espécies	Março	Setembro	Dezembro	Fevereiro
Ponta da Sela	*Ampithoe ramondi*	1,3 ± 0,17	0,33 ± 0,33	5,87 ± 2,13	5,96 ± 3,40
	Ampithoe divisura	0,34 ± 0,26	--	0,38 ± 0,28-	0,26 ± 0,19
	Ampithoe sp.	--	--	--	--
	Ampithoe marcuzzii	--	--	--	--
	Cymadusa filosa	8,95 ± 1,67	0,17 ± 0,17	3,54 ± 1,03	2,34 ± 0,91
	Sunampithoe pelagica	--	--	--	0,35 ± 0,24
Praia do Curral	*Ampithoe ramondi*	2,35 ± 0,69	0,18 ± 0,09	1,50 ± 0,60	0,89 ± 0,24
	Ampithoe divisura	0,05 ± 0,04	--	0,20 ± 0,20	--
	Ampithoe sp.	0,98 ± 0,66	6,79 ± 5,64	0,21 ± 0,12	1,52 ± 0,51
	Ampithoe marcuzzi	--	--	--	--
	Cymadusa filosa	6,24 ± 1,12	2,33 ± 2,23	1,00 ± 0,27	2,12 ± 0,39
	Sunampithoe pelagica	1,45 ± 0,65	--	6,22 ± 0,91	1,13 ± 0,25
Saco do Itapuã	*Ampithoe ramondi*	2,44 ± 0,50	--	5,10 ± 1,39	9,74 ± 1,98
	Ampithoe divisura	0,37 ± 0,19	--	1,12 ± 0,67	1,10 ± 0,53
	Ampithoe sp.	--	--	--	--
	Ampithoe marcuzzii	--	--	--	--
	Cymadusa filosa	0,41 ± 0,10	--	0,26 ± 0,26	0,79 ± 0,37
	Sunampithoe pelagica	--	--	--	--
Ponta do Recife	*Ampithoe ramondi*	0,37 ± 0,23	6,7 ± 2,38	1,30 ± 0,54	1,78 ± 1,05
	Ampithoe divisura	--	--	0,30 ± 0,14	0,37 ± 0,20
	Ampithoe sp.	--	--	--	--
	Ampithoe marcuzzi	--	--	--	--
	Cymadusa filosa	5,14 ± 0,99	0,85 ± 0,51	2,09 ± 0,57	1,57 ± 0,46
	Sunampithoe pelagica	--	--	0,43 ± 0,01	0,03 ± 0,03
Praia de Guarapocaia	*Ampithoe ramondi*	0,61 ± 0,29	--	--	0,42 ± 0,13
	Ampithoe divisura	--	--	0,02 ± 0,02	--
	Ampithoe sp.	--	--	--	--
	Ampithoe marcuzzi	0,36 ± 0,34	--	0,20 ± 0,13	0,16 ± 0,09
	Cymadusa filosa	2,88 ± 0,71	0,66 ± 0,30	0,44 ± 0,15	3,05 ± 1,04
	Sunampithoe pelagica	0,05 ± 0,03	3,45 ± 1,19	1,23 ± 0,43	0,92 ± 0,28
Viana	*Ampithoe ramondi*	0,76 ± 0,41	--	0,03 ± 0,02	0,31 ± 0,11
	Ampithoe divisura	--	--	--	--
	Ampithoe sp.	--	--	--	--
	Ampithoe marcuzzi	--	--	--	--
	Cymadusa filosa	4,41 ± 0,99	0,98 ± 0,35	0,71 ± 0,26	2,73 ± 0,68
	Sunampithoe pelagica	--	0,35 ± 0,35	1,62 ± 0,89	1,61 ± 0,56

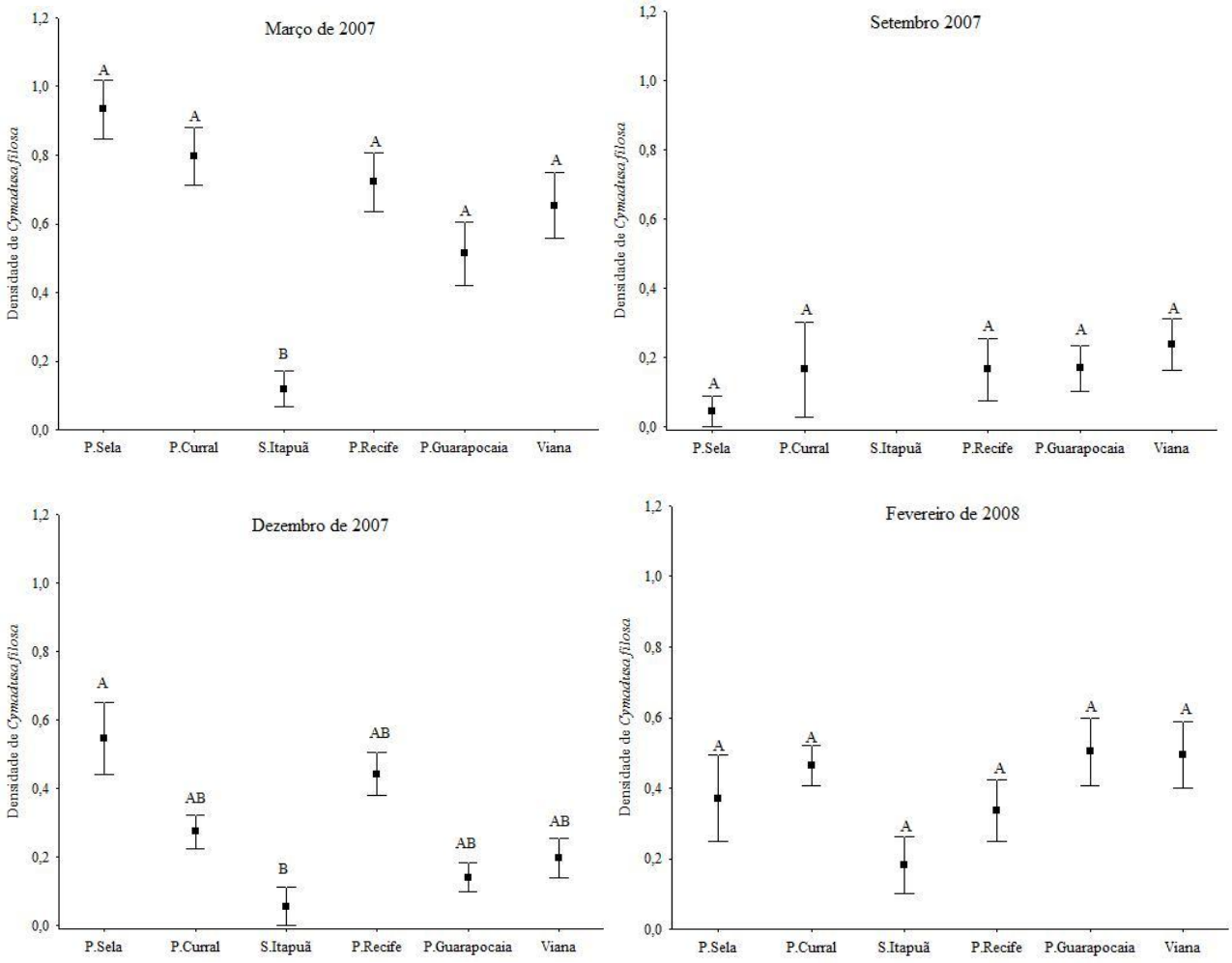


Figura 4: Densidade (log) de *Cymadusa filosa* (± erro padrão) coletadas nos costões rochosos nos 4 períodos de coletas (P. Sela = Ponta da Sela; P. Curral = Praia do Curral; P. Recife = Ponta do Recife; P. Guarapocaia = Praia de Guarapocaia). Barras com a mesma letra indicam ausência de diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$).

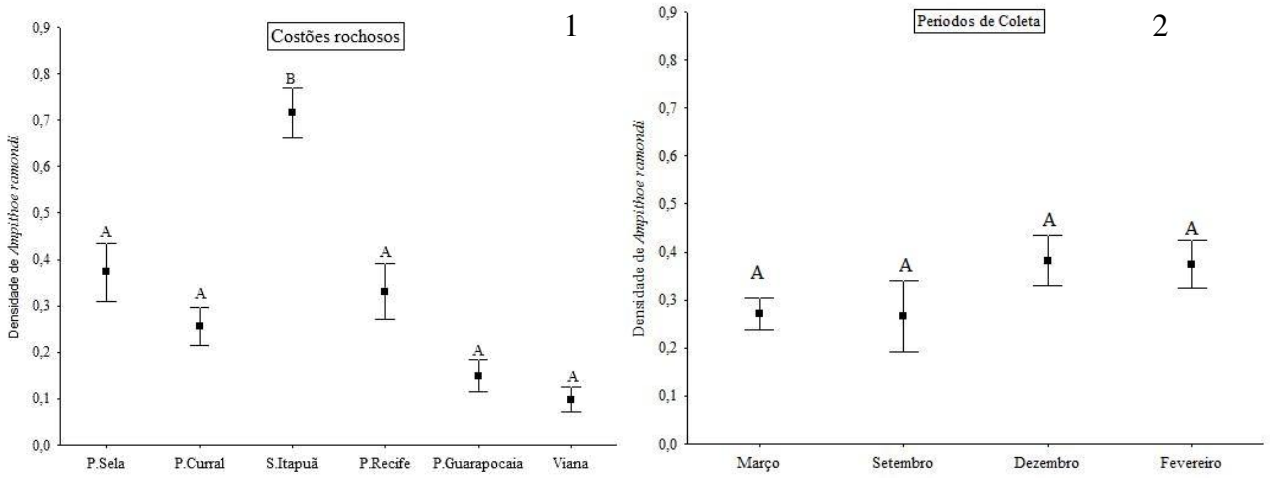


Figura 5: Densidade (log) de *Ampithoe ramondi* (± erro padrão) entre os costões rochosos (1) e entre os períodos de coleta (2). Barras com a mesma letra indicam ausência de diferença significativa (Tukey; p< 0,05).

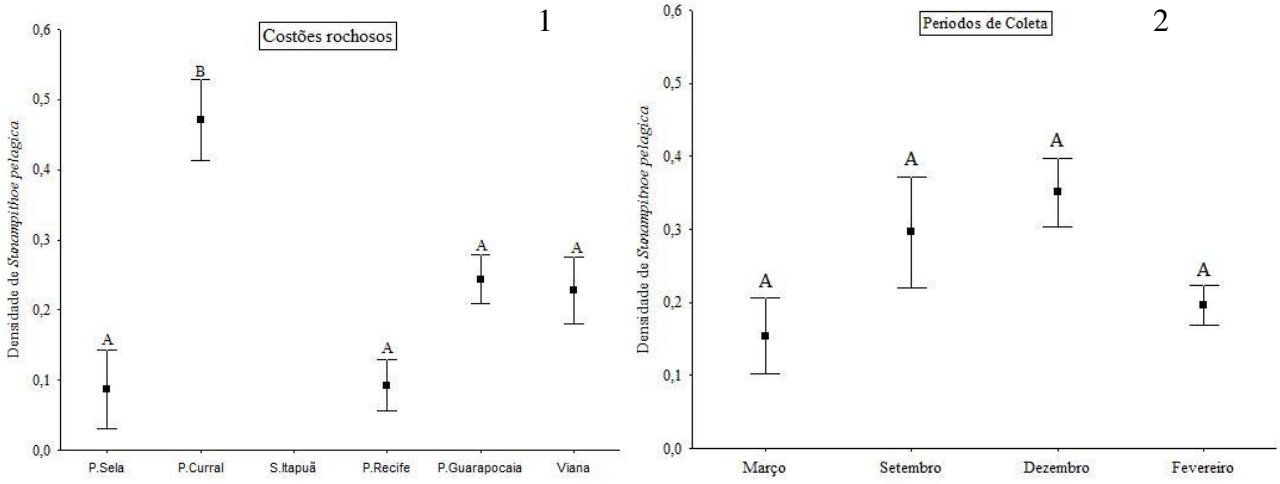


Figura 6: Densidade (log) de *Sunampithoe pelagica* (± erro padrão) entre os costões rochosos (1) e entre os períodos de coleta (2). Barras com a mesma letra indicam ausência de diferença significativa (Tukey; p< 0,05).

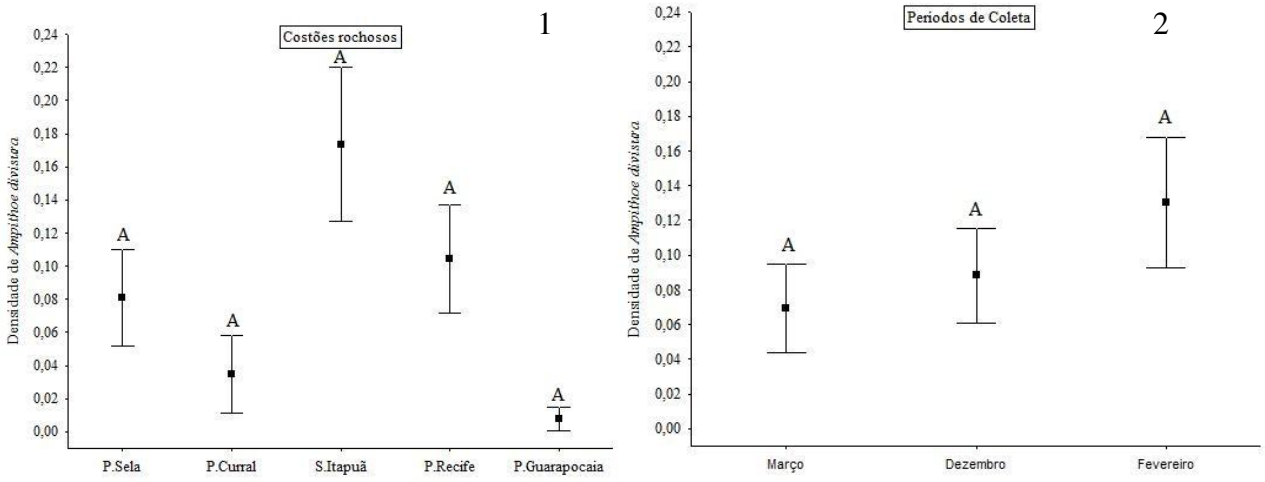


Figura 7: Densidade (log) de *Ampithoe divisura* (± erro padrão) entre os costões rochosos (1) e entre os períodos de coleta (2). Barras com a mesma letra indicam ausência de diferença significativa.

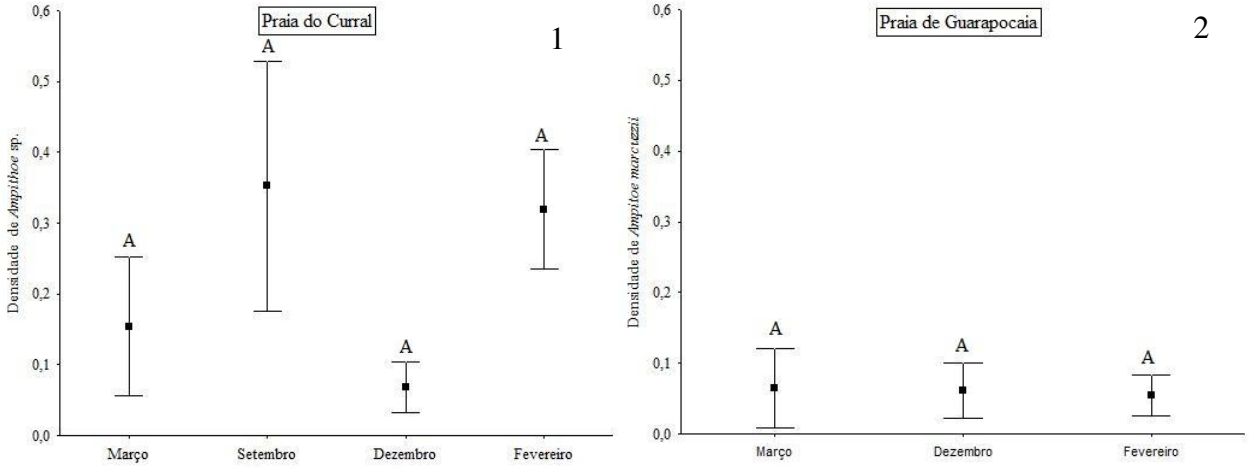


Figura 8: 1**-** Densidade (log) de *Ampithoe* sp. (± erro padrão) no costão rochoso da Praia do Curral. 2- Densidade (log) de *Ampithoe marcuzzi*(± erro padrão) no costão rochoso da Praia de Guarapocaia. Barras com a mesma letra indicam ausência de diferença significativa.

Discussão

Nos costões rochosos estudados do Canal de São Sebastião, foram encontradas seis espécies de anfípodes ampitoídeos, número maior do que o obtido em outros estudos realizados na região por Lima (2002) e Ferreira (2008) assim como em costões localizados fora do Canal (Tanaka & Leite 2003; Jacobucci & Leite 2006; Tanaka & Leite 2004; Leite *et al*. 2007; Leite 2011; Leite *et al.* 2011) onde foram encontradas apenas três espécies *Cymadusa filosa*, *Ampithoe ramondi* e *Sunampithoe pelagica*. Tal resultado indica que a riqueza de espécies da família Ampithoidae nos costões rochosos do Canal é maior que nas demais regiões já estudadas do litoral do Estado de São Paulo.

A espécie *Ampithoe divisura* já foi encontrada no litoral do Rio de Janeiro e de Santa Catarina (Serejo & Licínio 2002) e a identificação desta espécie para os costões rochosos do Canal de São Sebastião corresponde a uma nova ocorrência para o litoral do Estado de São Paulo, adicionalmente *Ampithoe marcuzzi* também representa uma nova ocorrência da espécie para região sudeste do Brasil. Este ampitoídeo foi encontrado inicialmente na Venezuela por Ruffo (1954) o qual descreveu a espécie. Posteriormente foi encontrada por Ortiz (1978) em Cuba e estudos mais recentes indicam uma distribuição mais ampla ocorrendo na costa leste da Flórida e na Carolina do Norte nos Estados Unidos (Duffy 1990; LeCroy 2002). No Brasil, *A. marcuzzi* foi encontrada em algumas regiões do litoral nordestino (Souza-Filho 2007) e a presença de *A. marcuzzi* no costão rochoso da Praia do Curral do Canal de São Sebastião sugere a expansão de sua ocorrência na costa brasileira.

Ampithoe sp. apresenta características morfológicas bem distintas das outras espécies do gênero *Ampithoe* que foram encontradas nos costões rochosos do Canal de São Sebastião como *A. ramondi, A. marcuzzi* e *A. divisura* (observação pessoal) e comparando as suas características morfológicas com a última revisão do gênero *Ampithoe* feita por Peart (2007), observou-se em princípio que *Ampithoe* sp. é diferente das 20 espécies do gênero que ocorrem na Austrália e adicionalmente difere da espécie *A. seticoxae* descrita recentemente para a costa do Rio de Janeiro (Serejo & Licínio 2002). Assim é

provável que seja uma nova espécie, que ficou restrita a um único costão.

As espécies mais comuns encontradas na área de estudo foram *A. ramondi, A. divisura, S. pelagica e C. filosa,* as três primeiras apresentaram variação das densidades entre os costões rochosos enquanto que as densidades de *C. filosa* também diferiram entre os meses de estudo. Variação temporal e espacial da fauna de gamarídeos do fital pode está relacionada a modificações de fatores ambientais locais como temperatura, hidrodinamismo, variação na complexidade estrutural devido à presença de epífitas, bem como mudanças sazonais na pressão de predação, disponibilidade de alimento, atividade reprodutiva (Edgar 1983; Tanaka & Leite 2003).

O hidrodinamismo foi considerado um fator importante para variação das densidades de ampitoídeos no estudo de Wakabara *et al* (1983). Estes autores desenvolveram um estudo em dois costões com hidrodinamismo diferentes, observaram que *C. filosa* ocorreu no costão rochoso mais exposto a ação das ondas, enquanto que *A. ramondi e S. pelagica* foram encontradas no costão rochoso mais abrigado. Resultado diferente foi encontrado por Leite *et al*. (2007) que analisaram a influência da variação da alga parda *S. cymosum* sobre a estrutura da assembleia de anfípodes entre duas praias com diferentes graus de exposição às ondas e observaram que *A. ramondi* ocorreu em maior densidade na praia mais abrigada e *C. filosa* na praia mais exposta, contudo *S.pelagica* apresentou densidades semelhantes nas duas praias. No presente estudo as maiores densidades de *A. ramondi, A. divisura e S. pelagica* foram encontradas em costões moderadamente expostos à ação das ondas (Figs. 1-7), já as espécies de *Ampithoe sp*. e *Ampithoe marcuzzi* foram restritas aos costões rochosos abrigados e semi-abrigados respectivamente e *C.filosa* não apresentou nenhum padrão quanto ao hidrodinamismo. Estes resultados indicam que o hidrodinamismo não influenciou diretamente na ocorrência e abundância das espécies de ampitoídeos nos costões rochosos do Canal de são Sebastião, uma vez que não foi observado nenhum padrão para distribuição dos ampitoídeos. Segundo Leite *et al*. (2007) características estruturais da alga *Sargassum* como o tamanho e a presença de epífitas, tem forte

influência sobre a densidade de anfípodes, que pode variar em pequena escala, dentro do costão rochoso, ou em escalas maiores, entre costões rochosos ou períodos de coletas diferentes. Desta forma as variações nas densidades das espécies de ampitoídeos do Canal de São Sebastião podem está relacionadas com as características estruturais de *S. furcatum* que apresentou variações nos pesos das frondes tanto entre os costões rochosos quanto entre os períodos de amostragens e também devido a presença de epífitas nestas algas (observação pessoal) que podem fornecer alimentos e refúgios adicionais de diferentes formas para fauna de ampitoídeos (Jacobucci & Leite 2006).

Alguns trabalhos realizados no Canal de São Sebastião informam que a temperatura pode variar em função das entradas de massas de água entre 20 a 28°C ao longo do ano (Silva *et al*., 2001), e isto pode influenciar as densidades de ampitoídeos, uma vez que, para os estudos realizados com *Sargassum filipendula* C. Agardh, temperaturas elevadas podem inibir o crescimento desta alga (Jacobucci 2005), assim densidades maiores de anfípodes ampitoídeos seriam resultado da redução do substrato disponível (Jacobucci & Leite 2006). É uma hipótese a ser considerada para *A. ramondi* uma vez que as maiores densidades de *A. ramondi* ocorreram em dezembro de 2007 e fevereiro de 2008 no costão rochoso do Saco do Itapuã, onde as frondes de *S. furcatum* apresentaram menores pesos.

As diferenças nas densidades observadas entre as espécies de ampitoídeos também pode resultar das interações agonísticas entre elas. Dentre os ampitoídeos *C. filosa* e *A. ramondi* são maiores em termos de tamanho e segundo Brawley & Adey (1981) apresentam comportamento agressivo. Interações agressivas entre indivíduos de *C. filosa* já foram identificadas por Siqueira *et al*. (2008), e observações feitas em laboratório revelam que *C. filosa*, *A. ramondi* e *S. pelagica* apresentam comportamento territorialista na alga hospedeira *Sargassum*, interagem agonisticamente entre si e que o tamanho tem um papel fundamental na resolução destas interações (observações pessoais). Assim animais menores como *S. pelagica* ocorreriam em menores densidades nos casos em que *C. filosa* e *A. ramondi* co-ocorrem em maiores densidades e isto pode ser observado no costão rochoso da Praia do

Curral em março de 2007. Situação oposta pode ser observada no mesmo período no costão rochoso da Ponta do Recife.

A sensibilidade do anfípodes ampitoídeos a diferentes níveis de contaminação ambiental, também pode explicar a variação na densidade das espécies desta família. Roberts *et al.* (2006), demonstrou experimentalmente que *Sargassum linearifolium* contaminado com cobre apresenta menor taxa de colonização por *Peramphithoe parmerong* Power & Lowry 1997, outra espécie de ampitoídeo que ocorre na Austrália. Gómez Gesteira & Dauvin (2000) encontraram baixas densidades de anfípodes do gênero *Ampelisca* em regiões contaminadas por petróleo. O Canal de São Sebastião é uma região vulnerável à poluição por petróleo, devido ao trânsito constante do produto na área em função das operações do Dutos e Terminais Centro Sul (DTCS), o que poderia afetar negativamente as densidades das espécies encontradas neste estudo. Comparando os dados de densidades de *A. ramondi, C. filosa* e *S. pelagica* do presente estudo com os trabalhos de Tanaka & Leite (2003) e Jacobucci & Leite (2006) ambos desenvolvidos em costões rochosos fora do Canal no norte do Litoral do Estado de São Paulo e em períodos correspondentes as coletas realizadas no Canal de São Sebastião, nota-se uma grande diferença em termos de densidades destas espécies. No estudo de Tanaka & Leite (2003) as maiores densidades médias foram de 14,1 ind.g^{-1} de *A. ramondi*, 19,1 ind.g^{-1} de *C. filosa* e 18,5 ind.g^{-1} de *S. pelagica*, já no estudo de Jacobucci & Leite (2006) as densidades de *A. ramondi, C. filosa* e *S. pelagica* foram de 35, 12 e 10 inds. g^{-1} respectivamente, enquanto que nos costões rochosos do Canal, a maior densidade de *A. ramondi* foi de 9,74 ind.g^{-1}, de *C. filosa* de 8,95 ind.g^{-1} e *S. pelagica* de 3,35 ind.g^{-1}, esta comparação permite observar que as densidades foram inferiores, adicionalmente análises químicas realizadas na alga *S. furcatum* encontradas nos costões rochosos do Canal de São Sebastião (Capítulo 4) revelaram a presença de hidrocarbonetos de origem petrogênica e uma variação espacial e temporal em termos de concentração na alga, tais poluentes poderiam agir como fator adicional na estruturação da comunidade de anfípodes herbívoros desta região.

Capítulo 3: Biologia populacional de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 associada à alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 dos costões rochosos da Ilha de São Sebastião.

Introdução

Os anfípodes gamarídeos representam um grupo extremamente diverso e numeroso dentre os animais que são encontrados associados à alga parda *Sargassum* (Curvêlo 1998; Dubiaski-Silva 1999; Lima 2002; Leite & Turra 2003), por outro lado também se destacam em termos de abundância e riqueza de espécies em comunidades de outras macrófitas (Mukai 1971; Edgar 1983; Norton & Benson 1983; Gunnill 1985). No Brasil especialmente no litoral norte de São Paulo existem bancos extensos de *Sargassum*, onde já foram encontradas mais de 30 espécies de anfípodes associadas, com abundâncias, modos de vida e hábitos alimentares muitos diversificados (Wakabara *et al*. 1983; Leite *et al*. 2000; Jacobucci et al. 2002; Tanaka & Leite 2003; Leite *et al*. 2007). A diversidade e a distribuição desta fauna associada à *Sargassum* podem estar relacionadas a diferentes aspectos de sua biologia, incluindo diferenças nos períodos reprodutivos, na fecundidade e na duração do desenvolvimento embrionário (Steele & Steele 1975; Leite 1996; Jacobucci & Leite 2006). A duração da estação reprodutiva nos crustáceos está relacionada à distribuição geográfica dos mesmos. Espécies que vivem em regiões de clima temperado tendem a apresentar desovas em sincronia com os períodos de condições ambientais mais favoráveis. Por outro lado, espécies sujeitas a uma sazonalidade climática mais estável, podem produzir desovas durante longos períodos ou mesmo durante todo o ano (Saint-Marie 1991). Estas espécies podem apresentar picos de intensidade na frequência de fêmeas ovígeras, que pode variar em nível específico e ou em escala espacial como resposta às pequenas variações ambientais (Sastry 1983).

O padrão reprodutivo dos anfípodes gamarídeos pode ser classificado em semélparo ou iteróparo e o ciclo de vida em semi-anual, anual, bianual ou perianual (Saint-Marie 1991). Estes

padrões são influenciados pela latitude, profundidade e salinidade e variam de acordo com a família. Sabe-se que os padrões reprodutivos e ciclos de vidas dos gamarídeos são bastante estudados em regiões temperadas enquanto que para o Brasil poucos estudos abordam estes características.

Dentre os anfípodes associados ao S*argassum*, os gamarídeos da família Ampithoidae (*Ampithoe ramondi* Audouin 1816, *Cymadusa filosa* Savigny 1816, *Sunampithoe pelagica* Milne Edwards 1830) representam os indivíduos de maior porte que utilizam a alga para construção de abrigo e para alimentação (Jacobucci 2005), estas características contribuem para forte influência destas espécies na estruturação das comunidades de *Sargassum* (Cruz-Rivera & Hay 2000; Jacobucci 2005). Estudos que permitam aprofundar o conhecimento da biologia das espécies de ampitoídeos são fundamentais para a compreensão do papel desses anfípodes em sistemas complexos como os bancos de *Sargassum* (Jacobucci & Leite 2006). Jacobucci & Leite (2006) desenvolveram um estudo sobre a biologia populacional de três espécies de ampitoídeos no litoral de São Paulo, no entanto características relacionadas à morfologia da alga, hidrodinamismo e presença de inimigos naturais e de co-espécificos, além da presença de contaminantes ambientais podem influenciar os parâmetros populacionais dos anfípodes (Leite 1996b; Borowsky 1983a; Ford *et al.* 2003) e assim gerar diferenças entre populações de uma mesma espécie em uma escala espacial. Assim, este estudo teve como objetivo estudar a biologia populacional de *Cymadusa filosa*, anfípode ampitoídeo mais representativo de quatro costões rochosos do Canal de São Sebastião uma região que está sob influencia de impactos antrópicos.

Materiais e Métodos

1. Área de Estudo

As coletas foram realizadas em costões rochosos da Ilha de São Sebastião. A Ilha delimita o Canal de São Sebastião, onde se localiza o Duto e Terminais Centro Sul (DTCS), antigo Terminal

Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR) (Fig.1).

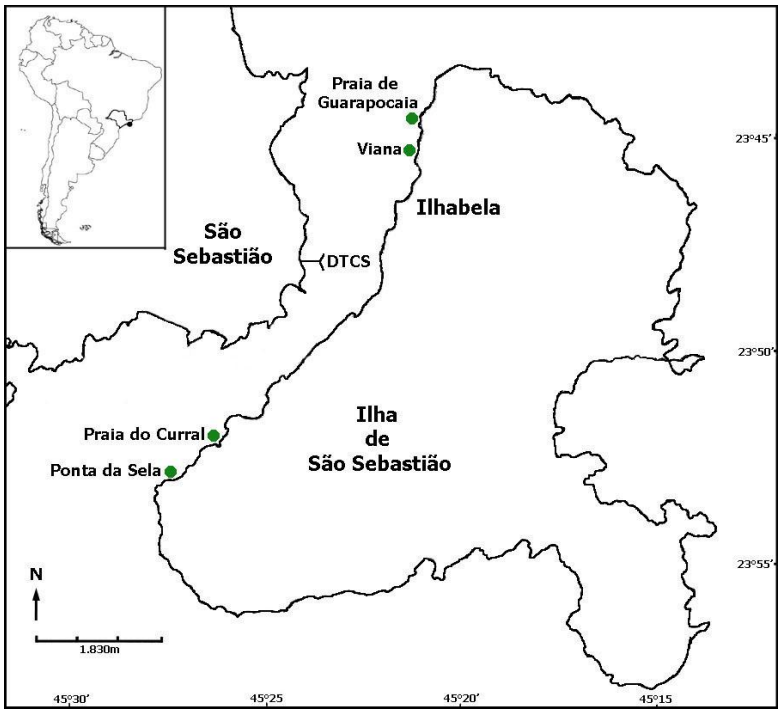


Figura 1: Localização dos **c**ostões rochosos estudados no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo. Modificado de Denadai (2001)

2. Procedimentos de amostragens e tratamento dos dados

Foram realizadas quatro coletas nos períodos de 26 a 30 março de 2007, 2 a 7 setembro de 2007, 9 a 14 dezembro de 2007 e 24 a 28 fevereiro de 2008, em 4 em costões rochosos localizados na Ilha de São Sebastião. Dentre os costões rochosos amostrados, 2 estão localizados a nordeste e a 2 a sudeste do Dutos e Terminais Centro Sul (DTCS) (Fig.1; Anexo 1). Nestes costões rochosos as coletas foram realizadas por meio de incursões embarcadas e a amostragem do material foi feita através de mergulho livre entre 1 e 2 m abaixo da superfície. Desta forma, nos bancos de *Sargassum furcatum* de cada costão, foi delimitado um transecto de 50 m no qual coletou-se aleatoriamente 10 frondes de *Sargassum*. As frondes foram cobertas com sacos de tecidos de malha de 0,2mm, para impedir a fuga dos organismos, e foram transportadas até o laboratório do Centro de Biologia Marinha da

Universidade de São Paulo (CEBIMAR - USP).

No laboratório as algas foram mantidas no freezer até que os animais não apresentassem sinais vitais. Após este resfriamento, as algas foram submetidas a quatro lavagens sucessivas com água do mar e a água resultante desse processo foi filtrada em rede com malha de 0,2 mm para retenção da macrofauna que foi fixada em álcool 70%. Com o auxilio de um microscópio estereoscópico os anfípodes foram separados da macrofauna, contados e identificados em nível específico. Os indivíduos de *Cymadusa filosa* foram separados em: macho, fêmea e jovem. A diferenciação dos sexos foi realizada em função de características sexuais secundárias como tamanho dos gnatópodos e presença de oostégitos. Fêmeas carregando ovos e ou embriões foram consideradas ovígeras (Jacobucci *et al.* 2002) e os indivíduos de tamanho inferior à menor fêmea ovígera identificada foram considerados jovens.

Os ovos das fêmeas foram classificados em quatro estádios de desenvolvimento:

1° - Ovos em formato oval sem indicações de estruturas corporais;

2° – Ovos com formato oval acentuado com aparecimento da fenda caudal e apêndices cefálicos;

3° – Diferenciação e aparecimento de cabeça, segmentos corporais e apêndices encobertos pelo envoltório.

4° – Jovens livres no marsúpio.

Os animais separados foram medidos. Para esta medição eles foram fotografados com auxílio de uma máquina fotográfica (Nikon Coolpix 938 3,1 megapixel) acoplada ao microscópio estereoscópico Zeiss SV11. Cada imagem foi analisada utilizando o programa UTHSESA Image Tool for Windows (Version 3.0), obtendo-se desta forma o comprimento corporal (tamanho), que consiste na distância entre a inserção do primeiro par de antenas e o télson.

3. Análise dos dados

Para a determinação da estrutura de tamanho, as medidas obtidas de *Cymadusa filosa*

(comprimento corporal) foram organizadas em classes de tamanho, com intervalos de 1 mm. Os animais provenientes dos costões rochosos foram agrupado por períodos de coleta.

Diferenças entre os tamanhos de machos e de fêmeas durante o estudo, foram testada por meio de análise de variância (ANOVA) de dois fatores (gênero e período), onde o tamanho dos indivídos foi considerado como variável resposta e conforme foi proposto por Zar (1998), os dados utilizados nesta análises estatística foram avaliados quanto a normalidade e a homogeneidade de variância.

A razão sexual (fêmeas/ machos) da população foi estimada e comparada com a razão 1:1 esperada pela seleção sexual (Fisher 1930) na população através de teste de χ^2 (qui-quadrado) e o período reprodutivo de *C.filosa* foi avaliado por meio de freqüência relativa de fêmeas ovígeras e não ovígeras, adicionalmente, a fecundidade de *C. filosa* foi avaliada por meio da relação entre o número de ovos, classificados no 1° estádio de desenvolvimento e o tamanho das fêmeas (Regressão linear simples).

Resultados

Machos, fêmeas e jovens foram encontrados em todos os meses de amostragem, contudo a população de *C. filosa* do Canal de São Sebastião apresentou flutuações numéricas entre os meses de estudo (Fig. 2). Esta população foi dominada por jovens (< 6mm) em março, setembro de 2007 e fevereiro de 2008, enquanto que em dezembro de 2008 houve um predomínio de indivíduos adultos sobre a população de *C. filosa,* mais especificamente da quantidade de fêmeas encontrada (Fig. 2). Em março e dezembro o tamanho dos indivíduos variou entre 1 e 16 mm, enquanto que nos meses de setembro de 2007 e fevereiro de 2008 foram encontrados os indivíduos de maiores tamanhos, entre 18 a 20 mm, mas em pequeno número. Os maiores machos e fêmeas de *C. filosa* foram encontrados respectivamente em setembro de 2007 e em fevereiro de 2008, mas não houve diferença significativa entre os tamanhos de machos e fêmeas entre os meses de estudo ($F_{3; 429}$= 0,68; p=0,55) e a razão sexual

foi desviada a favor das fêmeas (χ^2 = 11,78; df= 3; p=0, 008) em todos os quatro meses de amostragem (Tab.1).

No total foram encontradas 60 fêmeas ovígeras, 22 ocorrem nos meses de março, 8 em dezembro e 30 em fevereiro quando representou cerca de 30% das fêmeas encontradas neste mês (fig. 3). A menor fêmea ovígera ocorreu no mês de março com 6 mm de tamanho corporal e a maior em fevereiro com 18,76mm. Nota-se que neste período o tamanho médio das fêmeas ovígeras foi maior (14, 25 ± 0,56 mm)(Tab. 2).

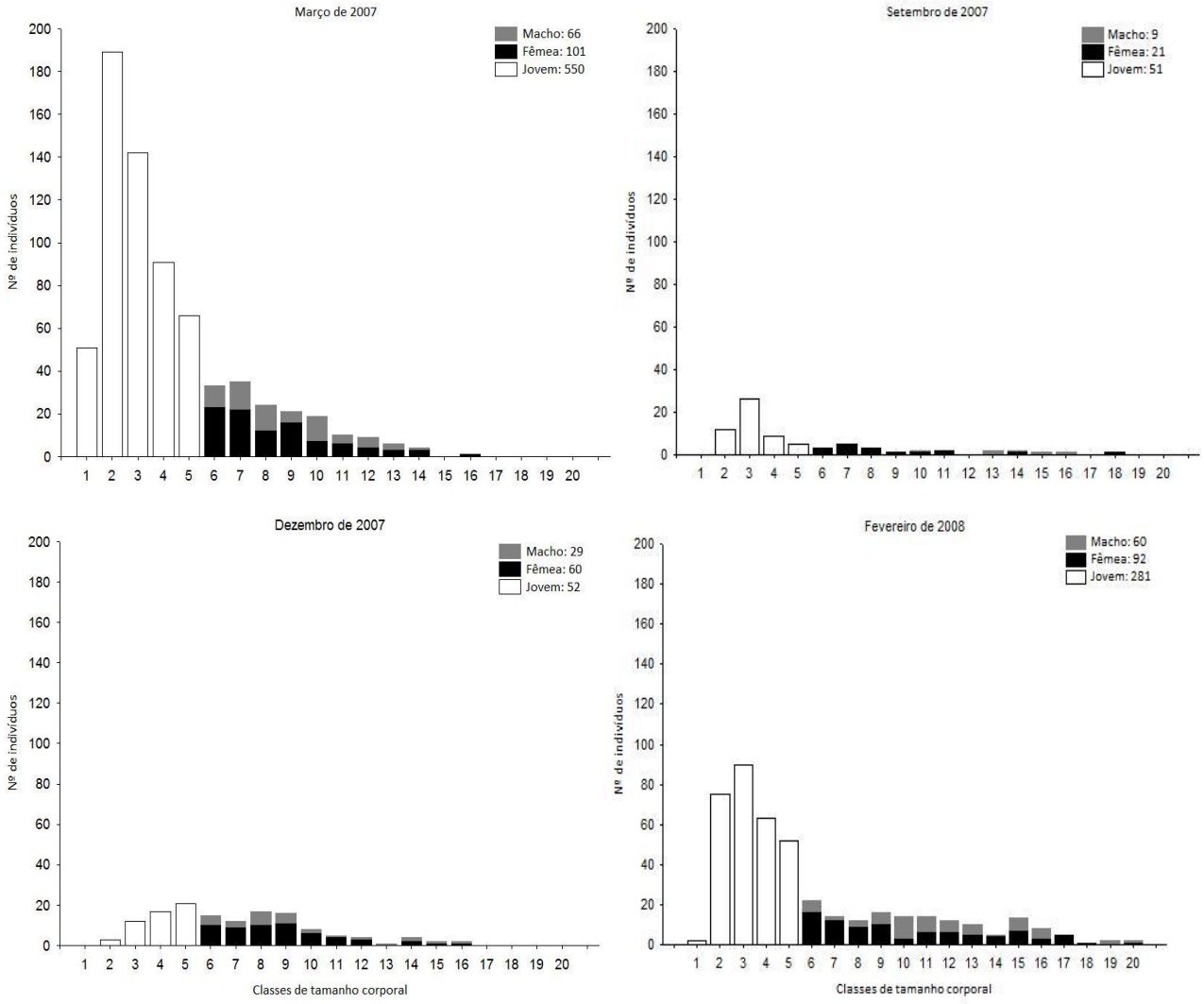


Figura 2: Histogramas de frequência classe de tamanho corporal (mm) de machos, fêmeas e jovens de *Cymadusa filosa* dos meses de amostragem.

Tabela 1: Tamanho médio de machos e fêmeas e razão sexual (macho/fêmea) da população de *C. filosa* do Canal de São Sebastião.

Meses	Macho ($\bar{X}$± erro padrão)	N	Fêmea ($\bar{X}$± erro padrão)	N	Razão sexual
Março	9,2 ± 0,28	66	8,9 ± 0,23	101	0,7: 1
Setembro	11,87 ± 1,24	9	9,8 ± 0,71	21	0,4: 1
Dezembro	9,6 ± 0,53	29	9,09 ± 0,31	60	0,5: 1
Fevereiro	11,70 ± 0,44	60	10,84 ± 0,39	92	0,7: 1

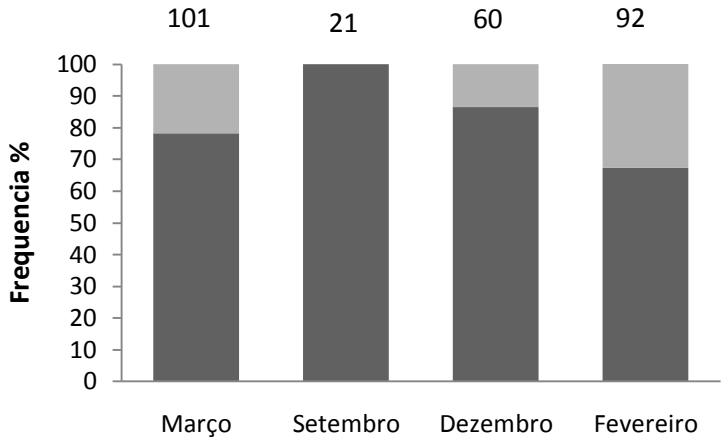


Figura 3: Frequência de fêmeas ovígeras (cinza claro) e não ovígeras (cinza escuro) na população de *C. filosa* do Canal de São Sebastião.

Tabela 2: Comprimentos corporais de fêmeas ovígeras de *C. filosa* do Canal de São Se

bastião.

Meses	N	$\bar{X}$± erro padrão	Mínimo	Máximo
Março	22	11,7 ± 0,46	6	16,87
Dezembro	8	11,8 ± 1,04	6,74	16,12
Fevereiro	30	14,25 ± 0,56	6,02	18,76

As fêmeas ovígeras apresentaram ampla variação na quantidade de ovos encontrados no marsúpio. Foram encontradas fêmeas com os ovos nos quatro estádios de desenvolvimento, entretanto houve maior quantidade de fêmeas com ovos no 1° e 4° estádios de desenvolvimento. Notou-se uma tendência na diminuição do número médio de ovos de um estádio para outro.

A fecundidade (número de ovos produzidos) esteve positivamente relacionada com o tamanho corporal ($p < 0,001$)(Fig. 4).

Tabela 3: Número de fêmeas ovígeras encontradas por estádio de desenvolvimento dos ovos e número médio de ovos em cada estádio.

Estádio	N	$\bar{X}$± erro padrão	Mínimo	Máximo
1°	24	25 ± 3,5	3	56
2°	5	16 ± 4,12	8	32
3°	6	14,5 ± 3,14	2	28
4°	25	13,2 ± 2,05	1	50

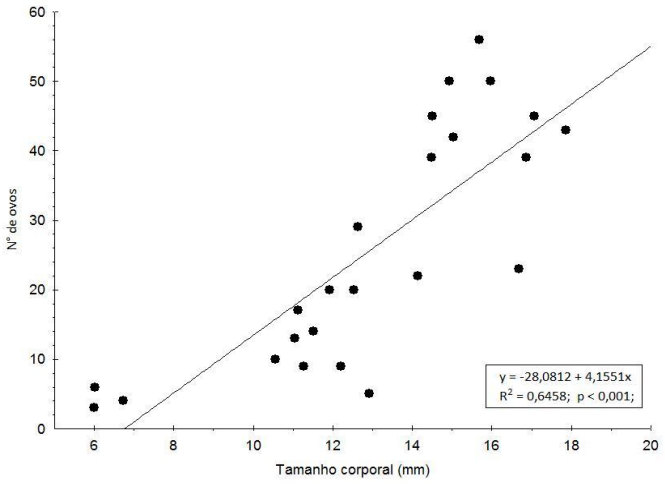


Figura 4: Relação entre o tamanho corporal das fêmeas ovígeras de *C. filosa* e a número de ovos encontrados no marsúpio.

Discussão

Os anfípodes das regiões tropicais são caracterizados por apresentar a reprodução contínua e multivoltinismo (Sainte-Marie 1991). Appadoo & Myers (2004) estudando a história de vida de três anfípodes no Oceano Índico, entre eles a de *Cymadusa filosa,* indicaram que esta espécie apresentava a reprodução contínua e multivoltinismo. O estudo realizado por Jacobucci & Leite (2006) em Ubatuba, Litoral de São Paulo também corrobora esta hipótese. Reprodução contínua e multivoltinismo também foram identificadas no talitrídeo *Pseudorchestoidea brasiliensis* Dana 1853, encontrado no Rio de Janeiro (Cardoso & Veloso 2001) e em *Leucothoe* sp. (Siqueira 2007) no Canal de São Sebastião. Adicionalmente à presença de jovens de *C. filosa* em todos os meses de estudo, a presença de fêmeas ovígeras em três dos quatros meses estudados e a amplitude do tamanho corporal das fêmeas ovígeras, indica que este anfípode segue o padrão observado para espécies tropicais. Contudo, observou-se um pico reprodutivo nos meses de março de 2007 e fevereiro 2008, indicada pela elevada presença de jovens e fêmeas reprodutivas. Picos reprodutivos para *C. filosa* também foi observado por Appadoo & Myers (2004) e segundo Sastry (1983) são frequentes em diferentes espécies e localidades de regiões tropicais como respostas às pequenas variações ambientais.

Uma característica comum entre anfípodes é a diferença existente em termos de tamanhos corporais entre machos e fêmeas. Nos anfípodes *Apohyale media* Bousfield & Hendrycks, 2002 e *Orchestia gammarellus* Pallas 1766, *Ptilohyale crassicornis* Haswell 1879, e em *Cymadusa filosa é* bem visível esta diferenciação (Leite & Wakabara 1989, Dias & Sprung 2003, Tsoi & Chu 2005, Appadoo & Myers 2004). Machos geralmente são maiores que as fêmeas, uma vez que a maior parte da sua energia é alocada pra o crescimento. Fêmeas por outro lado usam grande parte da sua energia para o crescimento e produção de ovos o que diminui sua taxa de crescimento (Cardoso & Veloso 1996). Embora os machos de *C. filosa* tenham apresentado tamanhos corporais médios levemente

maiores que as fêmeas, não foi encontrada diferença significativa entre eles. Este fato pode ser explicado pela pequena quantidade de machos encontrados em relação às fêmeas e que, consequentemente, ocasionou o desvio da razão sexual a favor das fêmeas na população de *C. filosa* do Canal de São Sebastião.

O desvio da proporção 1:1 pode estar relacionado a fatores dependentes do ciclo de vida das espécies (Hamilton 1967), como diferenças na taxa de mortalidade, longevidade, razão de crescimento, comportamento e utilização de habitat entre os sexos (Wenner 1972, Gable & Crooker 1977). Diferenças na taxa de mortalidade podem ocorrer em função de maior susceptibilidade de um dos sexos à predação, devido ao comportamento reprodutivo das espécies (migração diferencial). Borowsky (1983a) estudando experimentalmente o comportamento reprodutivo dos anfípodes *Jassa falcata* Montagu 1808, *Ampithoe valida* Smith 1873, e do tanaidáceo *Tanais cavolini* Milne-Edwards 1829*,* observou que machos são mais ativos que as fêmeas e frequentemente buscam novas fêmeas para se acasalarem. Leite *et al.* (2003) sugerem que machos do tanaidáceo *Kalliapseudes schubarti* Mané-Garzon 1949, em busca de novas oportunidades de cópula, poderiam deixar seus tubos e serem alvo de predadores o que resultaria em um número maior de fêmeas na população. É provável que isto ocorra na população de *C. filosa* uma vez que machos são vistos nadando mais frequentemente que fêmeas em culturas de laboratório (observação pessoal).

Poucos indivíduos de *C.filosa* foram encontrados em classes de tamanhos corporais superiores a 12 mm, da mesma forma que na população de *C. filosa* estudada por Appadoo & Myers (2004) e Jacobucci & Leite (2006), que sugerem a predação seletiva de peixes como fator determinante para estruturação da população de ampitoídeos. De fato os impactos dos peixes herbívoros e visualmente orientados são bem conhecidos sobre a fauna de gamarídeos (Nelson 1979) e podem ser um fator atuante sobre a população de *C. filosa* do Canal de São Sebastião, já que existe uma grande diversidade de peixes nesta região (Avaliação e Ações Prioritárias 2002) e indivíduos criados em

laboratório frequentemente alcançam tamanhos corporais maiores que animais de campo.

A média da quantidade de ovos (26 ovos) produzidos por *C. filosa* encontradas nos costões do Canal de São Sebastião foi semelhante a da população de *C. filosa* (25 ovos) da enseada do Flamengo em Ubatuba (Leite 1996b), e superior ao número médio de ovos produzidos por esta espécie nas Ilhas Mauritius no Oceano Índico (Appadoo & Myers 2004), que foi de 20,6. Contudo Jacobucci & Leite (2006) encontraram fecundidade média levemente maior de 29 ovos por fêmea de *C. filosa* no costão rochoso da Praia de Fortaleza localizado também no munícipio de Ubatuba. De qualquer forma, nota-se que *C. filosa* apresenta elevada fecundidade a qual esteve positivamente relacionada com o tamanho corporal. Esta relação positiva foi encontrada também na população de *C. filosa e*studada por Leite (1996B) na Praia do Lamberto no município de Ubatuba e na população do Oceano Índico (Appadoo & Myers 2004), mas não foi observada por Jacobucci & Leite (2006) para população de *C. filosa* da Praia da Fortaleza devido à pequena quantidade de fêmeas ovígeras coletadas, todavia, é um padrão comum entre os crustáceos malacóstracos (Jensen 1958) e já foi identificado em outras espécies de gamárideos (Borowsky 1986; Cardoso & Veloso 2001; Siqueira 2007).

A maior frequência de fêmeas ovígeras com ovos no primeiro e no quarto estádio de desenvolvimento de *C. filosa* indica um curto período de incubação, com rápido desenvolvimento dos ovos, segundo Leite (1996a), e de acordo com o estudo do comportamento reprodutivo de *C. filosa* esta hipótese é corroborada (capitulo 6). Contudo a diminuição observada em relação ao número médio de ovos ao longo do desenvolvimento pode ser reflexo da remoção ativa dos ovos inviáveis do marsúpio como sugerido para o anfípode *Apherusa jurinei* Milne-Edwards, 1930 (Dick *et al* 2002), uma vez que com o avanço do desenvolvimento dos ovos há um aumento em seus volumes, e desta forma o espaço no marsúpio torna-se restrito, inviabilizando o desenvolvimento de todos os ovos (Cardoso & Veloso 2001) ou pode estar associado aos efeitos da poluição ambiental que segundo Ford *et al.* (2003) pode induzir a má formação dos ovos.

De forma geral a população de *C. filosa* apresentou estrutura populacional semelhante a outras populações de *C. filosa* de locais distintos e as pequenas diferenças observadas podem ser reflexos das características ambientais do Canal de São Sebastião.

Capítulo 4: A relação entre os hidrocarbonetos derivados de petróleo presentes na alga parda *Sargassum furcatum* Kützing, 1843 a densidade e o comprimento corporal de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 (Crustacea, Amphipoda, Ampithoidae).

Introdução

Bancos de macroalgas são considerados ambientes marinhos muito produtivos (Roberts *et al*., 2008a) os quais abrigam uma comunidade diversa de epibiontes como anfípodes, poliquetas, gastrópodes (Edgar 1983; Jacobucci & Leite 2002), sendo os anfípodes os animais mais abundantes desta comunidade (Curvêlo 1998; Dubiaski-Silva 1999; Lima 2002; Leite & Turra 2003).

As algas pardas, macroalgas da família Phaeophyta, possuem a capacidade de acumular metais dissolvidos na água e concentrar em seus tecidos, por possuir elevados níveis de polissacarídeos sulfatados e alginatos em suas paredes celulares, com os quais os metais apresentam forte afinidade (Davis *et al*. 2003). Devido a esta característica e a sua ampla distribuição, elas vêm sendo usadas como bioindicadoras de poluição por metais pesados em várias partes do mundo (Roberts *et al*. 2006). Adicionalmente, as algas pardas *Fucus serratus*, *F. vessiculosus, Chorda filum* e *Ascopphyllum nodosum,* também podem acumular em seus tecidos outros tipos de contaminantes marinhos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Knutzen & Sortland 1982; Kirso & Irha 1998) enquanto que nos tecidos da alga parda *Desmarestia* sp. presentes na Antártica foram encontrados compostos organoclorados (Montone *et al*. 2001).

A capacidade das algas pardas para acumular poluentes ambientais pode afetar a distribuição, abundância e ocorrência da epifauna associada (Roberts *et al*. 2006; 2008b), especialmente os representantes desta epifauna que vivem uma associação muito próxima com sua alga hospedeira por consumir seus tecidos como os anfípodes herbívoros (Brawley 1992; Roberts *et al*. 2006). Estes últimos autores constararam, experimentalmente, que a sobrevivencia do anfípode herbívoro

Peramphithoe parmeron Power & Lowry 1997*,* foi afetada negativamente pela o aumento das concentrações de metais nos tecidos da alga *Sargassum linearfolium*. Segundo Roberts *et al*. (2008b) a ausência dos anfípodes da família Ampithoidae na alga *Padina crassa e*ncontrada na Baia de Woolloomooloo, parte do Porto de Jackson em Sidney na Austrália está relacionado com as elevadas concentrações de metais pesados encontrados na alga. Neste mesmo trabalho, eles observaram que *P. parmerong* preferem colonizar algas não contaminadas por metais.

Enquanto que os efeitos dos metais pesados presentes nas algas pardas sobre a fauna associada vêm sendo estudados (Roberts *et al*. 2006; 2008a; 2008b; Pease *et al*. 2010), nada se conhece sobre os efeitos das concentrações de hidrocarbonetos presentes na algas pardas sobre sua fauna associada. Alguns trabalhos, entretanto, estudaram o efeito da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo de sedimentos sobre a fauna de anfípodes associada (Gómez Gesterira & Dauvin 2000; Nikitik & Kobinson 2003; Guerra-García *et al*. 2003) e constataram que algumas espécies de anfípodes respondem a um gradiente de poluição por hidrocarbonetos de petróleo de maneira a serem encontrados em regiões onde as concentrações destes poluentes nos sedimentos são relativamente mais baixas. Por outro lado, segundo Roberts *et al.* (2006) os anfípodes herbívoros podem ser mais afetados pelos poluentes ambientais por estarem expostos a mais rotas de exposição do que anfípodes encontrados no sedimento. Nas algas a assimilação ocorre por meio de absorção de hidrocarbonetos presentes na coluna da água (Marques *et al*. 2002) enquanto que a fauna associada, por sua vez, pode assimilar os hidrocarbonetos por meio de contato direto ou consumindo partes da alga contaminada, e assim possuir mais de uma via de acumulação de hidrocarbonetos. Consequentemente a fauna de herbívoros de algas expostas à poluição por hidrocarbonetos pode sofrer impactos negativos semelhantes aos que ocorrem com a fauna de herbívoros que vivem associados a algas pardas de regiões poluidas por metais.

Bancos da alga parda *Sargassum furcatum* Kützing184, são comuns em costões rochosos do Canal de São Sebastião (observação pessoal), litoral norte do Estado de São Paulo, e estão sujeitos a

poluição de hidrocarbonetos de petróleo devido às atividades turísticas e do setor petrolífero, responsáveis por lançamentos freqüentes de esgoto, petróleo e derivados nas águas do Canal (Zanardi *et al.* 1999a; CETESB 2008). A presença de hidrocarbonetos de petróleo já foi identificada na água e nos sedimento do Canal São Sebastião (Zanardi *et al*. 1999a, 1999b; Medeiros & Bícego 2004), indicando que a alga parda *Sargassum* da região também pode conter hidrocarbonetos de petróleo dissolvidos na água em seus tecidos. Desta forma o objetivo deste estudo foi quantificar os hidrocarbonetos de petróleo presentes na alga *S. furcatum* em seis costões rochosos no Canal e investigar a relação destes compostos com as densidade e a estrutura populacional de *Cymadusa filosa* anfípodes herbívoro associado mais representativo desta região.

Material e métodos

1. Área de estudo

As coletas foram realizadas em costões localizados no Canal de São Sebastião, a nordeste e a sudeste do Duto e Terminais Centro Sul (DTCS). O Canal sofre influência antrópica devido as atividades turísticas e do setor petroquímico, responsáveis por lançamentos freqüentes de esgoto, petróleo e derivados (Zanardi *et al*. 1999b; CETESB 2008).

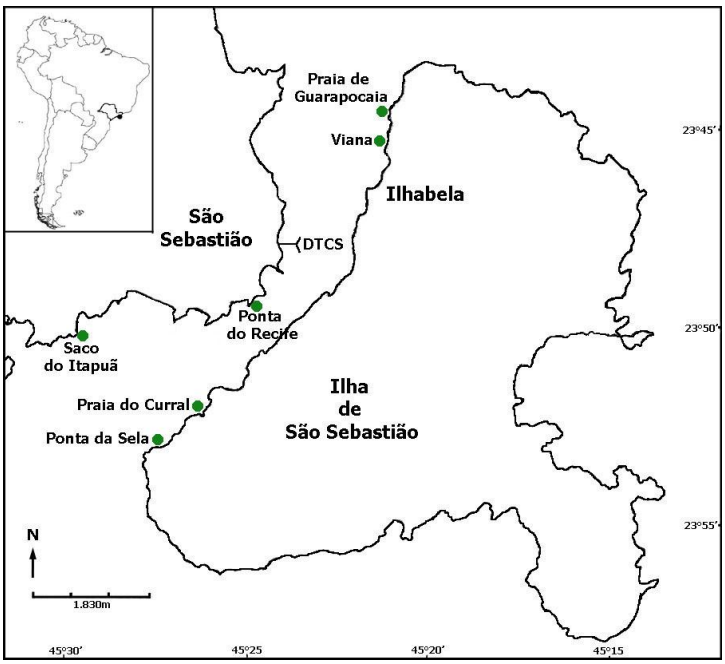


Figura 1: Localização dos **c**ostões rochosos estudados no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo.

2. Procedimentos de amostragens

As amostras foram coletadas em março e dezembro de 2007 e em fevereiro de 2008 em seis em costões rochosos localizados no Canal de São Sebastião (Fig.1). Dentre os costões rochosos amostrados, dois estão localizados a nordeste e quatro a sudeste do Duto e Terminais Centro Sul (DTCS)(Fig.1). Nestes costões rochosos as coletas foram realizadas por meio de incursões embarcadas e a amostragem do material foi feita através de mergulho livre entre 1 e 2 m abaixo da superfície. Desta forma, nos bancos de *Sargassum furcatum* de cada costão, 10 frondes foram coletadas ao longo de um transecto de 50m de extensão. As frondes foram cobertas com sacos de tecidos de malha de 0,2 mm, para impedir a fuga dos organismos e foram transportadas até o laboratório do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar - USP).

No laboratório as algas foram mantidas no freezer até que os animais não apresentassem sinais vitais. Após este resfriamento, as algas foram submetidas a quatro lavagens sucessivas com água do

mar e a água resultante desse processo foi filtrada em rede com malha de 0,2 mm para retenção da macrofauna que foi fixada em álcool 70%. Com o auxilio de um microscópio estereoscópico os anfípodes foram separados da macrofauna, contados e identificados em nível específico. Os indivíduos de *C. filosa* foram separados de acordo com estádio de maturidade sexual em macho, fêmea e jovem. A diferenciação dos sexos foi realizada em função de características sexuais secundárias como tamanho dos gnatópodos e presença de oostégitos nas fêmeas. Fêmeas carregando ovos e ou embriões foram consideradas ovígeras e as demais fêmeas foram consideradas não ovígeras (Jacobucci *et al.* 2002). Indivíduos de tamanho inferior à menor fêmea ovígera identificada foram considerados jovens.

Os animais separados foram medidos. Para esta medição eles foram fotografados com a camera Nikon (Coolpix 938 3,1 megapixel) acoplada ao estereomicroscópio, cada imagem foi analisada através do programa UTHSESA Image Tool for Windows (Version 3.0), obtendo-se desta forma o comprimento dorsal (tamanho corporal), que consiste na distância entre a inserção do primeiro par de antenas e o télson.

Durante os meses de amostragens, frondes extras de *Sargassum furcatum* foram coletadas para quantificação dos hidrocarbonetos de petróleo. Estas frondes foram raspadas do substrato com auxílio de uma espátula e colocadas em sacos de tecido novos, com malha de 0,2 mm e transferidas para bandejas de alumínio previamente calcinadas a 400^{o}C, e acondicionadas em ambiente resfriados. No laboratório do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar) foram separados das frondes 20g de folíolos de *S. furcatum* de cada costão rochoso, as quais foram recolocadas para novas bandejas identificadas e congeladas.

3. Análises químicas

As análises químicas foram as mesmas descritas no capítulo 1.

4. Análises dos dados

Para relacionar os efeitos dos hidrocarbonetos derivados de petróleo presentes na alga *S. furcatum*, os costões rochosos foram considerados como réplicas temporais do Canal de São Sebastião.

Como variáveis ambientais foram designadas: as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (HA), policíclicos aromáticos (HPA) presentes na alga *S. furcatum* e o peso seco médio das frondes (g) coletadas em cada costão rochoso. Para a distinção entre as fontes naturais e petrogênicas de hidrocarbonetos alifáticos, a razão entre Pristano e Fitano e o índice de preferência de carbono (CPI) foram calculados. O CPI confere uma distinção efetiva entre os n-alcanos petrogênicos e aqueles originados a partir das ceras cuticulares de plantas superiores (Guerra-García et al. 2003); pristano (C19) e pitano(C20) são isoprenoides comuns tanto em produtos secundários do petróleo quanto em fontes biogênicas (Le Dréau *et al*. 1997), no entanto, a razão entre estes dois compostos varia de acordo com o tipo de óleo e reflete sua fonte original (Readman *et al*. 2002), em amostras não contaminadas por óleo, a razão é maior que um, normalmente entre 3 e 5 (Steinhauer & Boehm 1992).

Para fins de normalização dos dados, as variáveis ambientais e dados de tamanho corporal e total de indivíduos dos estádios de maturidade sexual de *C. filosa* foram tranformadas log e log (X+1)(Clarke & Warrick 2001) quando necessário. A densidade de jovens, machos, fêmeas não ovígeras, fêmeas ovígeras foi determinada por meio da razão entre o número de indivíduos e o peso seco da fronde de *S. furcatum* onde estes foram encontrados. A densidade, por sua vez, foi transformada em $\sqrt{x}$ ou $\sqrt{x+1}$ para normalização (Underwood 1999).

A relação entre das variáveis ambientais sobre a densidade média, tamanho corporal médio de jovens, fêmeas não ovígeras, fêmeas ovígeras e machos de *C. filosa* e *S. pelagica* em cada periodo de amostrágem foi estimada por meio de regressão linear múltipla executada sobre o modelo "stepwise forward" assumindo um valor de P = 0.15 para a entrada dos termos na análise (Quinn & Keough 2002).

Para verificar se houve variação nas densidades e nos tamanhos corporais médios de machos, fêmeas não ovígeras, fêmeas ovígeras e jovens de *C. filosa* entre os períodos de amostragem no Canal de São Sebastião foi realizada análise de variância (ANOVA) de um fator (período de amostragem), para estrutura de tamanho e analise de Kruskall Wallis para as densidades dos estádios de desenvolvimento de *C. filosa*.

Resultados

Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos

As concentrações de hidrocarbonetos alifáticos encontradas na alga *S. furcatum* apresentaram variação temporal e espacial (Tab. 1, 2 e 3). As maiores concentrações destes hidrocabonetos foram encontradas em março se destacando a concentração de 245 µg g-1 encontrada no *Sargassum furcatum* da Ponta da Sela (Tab.1), por outro lado a alga coletada no costão rochoso da Praia de Guarapocaia obteve a menor concentração de hidrocarbonetos alifáticos em dezembro de 2007 (10,6 µg g-1 –Tab.2).

Tabela 1: Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (µg g-1 peso seco) em amostras de algas coletadas no costões rochosos do Canal de São Sebastião em março de 2007.

Localização	Ponta da Sela	Praia do Curral	Saco do Itapuã	Ponta do Recife	Praia de Guarapocaia	Viana
Pristano	1,022	0,064	0,027	0,038	0,022	0,041
Fitano	0,856	0,061	0,032	0,007	0,016	0,109
n-alcanos totais	23,5	16,5	7,52	13,3	6,64	25,8
Alifáticos resolvidos	107	87,3	64,4	102	59,8	83,1
UCM*	138	21,7	53,1	52,3	33,9	80,9
Alifáticos totais	245	109	117,5	154,3	93,7	164
Pristano/fitano	1,2	1,0	0,8	5,6	1,4	0,4
CPI	1,8	1,4	1,2	1,0	0,2	1,1

*Mistura Complexa Não Resolvida

abela 2: Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (µg g-1 peso seco) em amostras de algas coletadas no costões rochosos do Canal de São Sebastião em dezembro de 2007.

Localização	Ponta da Sela	Praia do Curral	Saco do Itapuã	Ponta do Recife	Praia de Guarapocaia	Viana
Pristano	0,319	0,053	0,036	0,135	0,153	0,145
Fitano	0,094	0,027	0,005	0,020	0,027	0,047
n-alcanos totais	3,06	5,96	6,83	4,96	2,70	4,94
Alifáticos resolvidos	80,3	33,4	53,6	87,4	10,6	67,4
UCM*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alifáticos totais	80,3	33,4	53,6	87,4	10,6	67,4
pristano/fitano	3,4	1,9	7,2	6,7	5,6	3.
CPI	0,7	0,0	1,9	0,0	0,0	1,6

*Mistura Complexa Não Resolvida; n.d. – abaixo do limite de detecção

Os n-alcanos totais em março apresentam concentrações variando de 6,64 a 25,8 µg g-1 de peso seco em março, de 2,7 a 5,96 de peso seco em dezembro e de 10,6 a 24,1 µg g^{-1} de peso seco em fevereiro de 2008.

Tabela 3: Concentrações de hidrocarbonetos alifáticos (µg g-1 peso seco) em amostras de algas coletadas no costões rochosos do Canal de São Sebastião em fevereiro de 2008.

Localização	Ponta da Sela	Praia do Curral	Saco do Itapuã	Ponta do Recife	Praia de Guarapocaia	Viana
Pristano	0,272	0,460	0,326	n.d.	0,374	0,144
Fitano	n.d.	0,190	0,270	0,189	0,221	0,182
n-alcanos totais	15,7	17,3	21,1	24,1	13,9	10,6
Alifáticos resolvidos	77,1	62,8	76,7	119	65,9	59,6
UCM*	65,2	n.d.	59,4	n.d.	55,7	64,6
Alifáticos totais	142	62,8	136	119	122	124
pristano/fitano	n.c.	2,42	1,21	n.c.	1,69	0,79
CPI	1,79	2,79	1,78	1,73	3,46	2,37

*Mistura Complexa Não Resolvida ; n.d. – abaixo do limite de detecção; n.c.- não calculado

As estimativas utilizadas para a distinção das fontes de hidrocarbonetos petrogênicos, a razão

entre pristano e fitano e a UCM, variaram tanto temporal quanto espacialmente. A UCM apresentou valores altos em março (138,0 μg g-1 peso seco) e esteve presente em algumas amostras em fevereiro, contudo este parâmetro esteve abaixo do limite de detecção do método nas amostras de dezembro.

A razão pristano/fitano oscilou entre valores abaixo ou próximo a um, nos seis costões rochosos em março. No entanto, foi encontrado um valor de 5,6 para esta razão em uma das amostras de *Sargassum* (Ponta do Recife). Para este período, o intervalo de variação foi de 0,4 a 5,6. Em dezembro a extensão da razão pristano/fitano foi de 1,96 a 7,2 enquanto que em fevereiro foi de 0,79 a 2,42.

Apesar de os valores do CPI terem apresentado um comportamento variável dentre os três períodos, a maioria das estações amostrais apresentou valores próximos a um. Em março este valor variou entre 0,2 a 1,18, em dezembro entre 0,0 a 1,9. No entanto, valores maiores do que um (1) foram encontrados nas amostras de fevereiro (de 1,73 a 3,46).

Uma pequena variação temporal pode ser notada nas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Tab.4). Nos meses de março e de dezembro as maiores concentrações encontradas foram de 245 e 74,2 ng g^{-1} de peso seco na Ponta da Sela, enquanto que em fevereiro a maior concentração foi de 115 ng g^{-1} de peso seco no costão rochoso da Praia de Guarapocaia.

Tabela 4: Concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) (ng g-1 peso seco) encontradas nas amostras de *Sargassum furcatum* nos costões rochoos do Canal de São Sebastião em março e dezembro de 2007 e fevereiro de 2008.

Localização	Ponta da Sela	Praia do Curral	Saco do Itapuã	Ponta do Recife	Praia de Guarapocaia	Viana
Março	243	36,8	29,2	65,0	62,0	34,5
Dezembro	74,7	58,1	47,8	22,9	67,2	86,1
Fevereiro	72,8	77,3	68,1	73,5	115	95,5

Tamanho corporal e densidade de *Cymadusa filosa*

Houve variação significativa do tamanho corporal médio de jovens de *C. filosa* entre os períodos de amostragens ($F_{2;968}$=15,344; p<0,001). Os menores jovens foram encontrados em março de 2007 (Tab.5). e o tamanho corporal médio das fêmeas não ovígeras por outro lado não variou durante os períodos de amostragem ($F_{2;266}$=2,837; p=0,06)(Tab.5).

As fêmeas ovígeras de *C. filosa* coletadas em fevereiro de 2008 apresentaram tamanho corporal médio maiores que as demais fêmeas coletadas em outros períodos ($F_{2;65}$=5,480; p=0,006) o mesmo ocorreu com machos ($F_{2;212}$=14,177; p<0,001)(Tab.5).

As densidades de jovens ($H_{2;108}$=33,30; p<0,001), fêmeas não ovígeras ($H_{2;100}$=6,61; p=0,03) e machos ($H_{2;80}$=8,45; p=0,01) foram maiores em março, enquanto que não houve variação nas densidades de fêmeas ovígeras desta espécie entre os três meses estudados ($H_{2;40}$=3,264; p=0,19)(Tab.6).

Tabela 5: Tamanho corporal médio em mm (± erro padrão) de jovens, fêmeas, fêmeas ovígeras e machos de *Cymadusa filosa* dos costões rochosos do Canal de são Sebastião nos três períodos estudados. O número entre parentese representa o total de indivíduos.

	Março-2007	**Dezembro -2007**	**Fevereiro- 2008**
Jovem	(588) 3,37±0,04	(81) 3,87±0,12	(302) 3,73±0,06
Fêmea	(101) 7,69±0,17	(73) 8,03±0,24	(95) 8,42±0,26
Fêmea ovada	(25) 11,42±0,46	(9) 11,43±0,99	(34) 13,79±0,38
Macho	(83) 8,88±0,24	(51) 8,53±0,36	(81)10,86+0,38

Tabela 6: Densidade média (nº inds/g de peso seco de *Sargassum*)(± erro padrão) de jovem, fêmeas, fêmeas ovígeras e machos de *Cymadusa filosa* dos costões rochosos do Canal de São Sebastião nos três períodos estudados.

	Março-2007	Dezembro -2007	Fevereiro- 2008
Jovem	4,50±0,92	0,61±0,16	1,46±0,23
Fêmea	0,68±0,10	0,45±0,08	0,62±0,13
Fêmea ovigeras	0,13±0,03	0,04±0,01	0,12±0,03
Macho	0,74±0,18	0,36±0,08	0,33±0,06

Efeito dos hidrocarbonetos sobre a estrutura de tamanho e densidade de *Cymadusa filosa*

Os resultados da regressão múltipla revelaram que as variáveis ambientais pristano/fitano e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram significativamente relacionadas com tamanho corporal dos estádios de maturidade sexual de *C.filosa*.

O tamanho corporal de jovens (R^2=0,75; p< 0,001) e de fêmeas não ovígeras de *C. filosa* (R^2=0,57;p=006) estiveram relacionados negativamente pela razão Pristano/Fitano e positivamente pelas concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)(Tab.7). O peso seco das frondes de *S. furcatum* foi à única variável que relacionou-se positivamente com tamanho corporal de fêmeas ovígeras (R^2=0,48; p= 0,005)(Tab.7) e não foi constatada nenhuma influência das variáveis ambientais sobre tamanho dos machos (R^2=0,37; p=0,11).

A Mistura Complexa Não Resolvida (UCM), a razão pristano/fitano e os HPA foram às variáveis que exerceram influência sobre as densidades de jovens, fêmeas e machos de *C. filosa* (Tab.7) e não houve efeito sobre as densidades das fêmeas ovígeras (R^2 = 0,37; p = 0,08). A densidade de jovens esteve negativamente relacionada com as concentrações de UCM (R^2 = 0,47; p = 0,008) e as das fêmeas não ovígeras foram influenciadas negaticamente pela razão pristano/fitano (R^2 = 0,67; p=0,007)(Tab.7), enquanto que densidadade média dos machos esteve relacionada negativamente com

as concentrações de HPA (R^2 = 0,55; p = 0,002)(Tab.7).

Tabela 7: Resultados da regressão múltipla (stepwise-forward) quanto à avaliação dos efeitos das variáveis ambientais sobre o total e tamanho corporal e a densidade de jovens, fêmeas, fêmeas ovígeras e machos de *Cymadusa filosa.* Apenas dados significativos estão presentes.

Variável dependente	Variável de efeito	Coeficiente	Erro Padão	t	P
Tamanho corporal					
Jovens	Pristano/Fitano	-0,620	0,13	-4,49	>0,001
R^2=0,75; p<0,001	HPA	0,360	0,13	2,70	0,01
Fêmeas não ovígeras	Pristano/Fitano	-0,543	0,18	-3,00	0,009
R^2=0,57; p=0,006	HPA	0,419	0,17	2,39	0,03
Fêmeas ovígeras R^2=0,48; p= 0,005	Peso das Frondes	0,667	0,20	3,25	0,005
Densidade					
Jovens R^2=0,47; p=0,008	UCM	-0,615	0,19	-3,20	0,005
Fêmeas não ovigeras R^2=0,63; p=0,007	Pristano/Fitano	-0,415	0,17	-2,35	0,034
Machos R^2=0,55; p=0,002	HPA	-0,602	0,20	-2,93	0,011

Discussão

O sedimento e a água do Canal São Sebastião indicam que esta área apresenta contaminação por derivados hidrocarbonetos de petróleo (Zanardi *et al*. 1999a, 1999b; Medeiros & Bícego 2004), enquanto o sedimento é um compartimento mais estável e conserva os hidrocarbonetos não degradados por longo período de tempo (Weber *et al.* 1998), a água por outro lado é um compartimento muito variável e dinâmico, dissolvendo as hidrocarbonetos, por um prazo curto, tornando-os de difícil detecção, assim a utilização de organismos como as algas permite o reconhecimento destas substâncias porque esses organismos acumulam substâncias presentes na coluna d'água (Taniguchi 2002). A alga

parda *Sargassum furcatum* assim refletiu as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos derivados de petróleo disponíveis na água para cada período de coleta e foi possível notar uma relevante variação espacial nas concentrações destes poluentes (Tab. 1 -4). Variação temporal e espacial das concentrações metais pesados e de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foi encontrada nos tecidos do bivalve *Perna perna* Linnaeus, 1758 no Canal de São Sebastião (Pereira *et al.* 2010). Elevadas concentrações de HPA, acima de 100ng g^{-1}, foram encontrados no verão e no inverno em diferentes localidades do Canal. Os autores atribuíram à variação espacial das concentrações de HPA a proximidade do TEBAR e a variação temporal ao aumento do trafego marítimo principalmente no verão, aumentando o aporte de poluição para região e desta forma contribuindo para elevação da concentração de poluentes nos tecidos dos bivalves, no verão e no inverno. Pereira *et al*. (2011), concluíram que a região do Canal de São Sebastião está sujeita a diferentes fontes de poluição em diferentes períodos causando variação espacial e temporal nas concentrações de poluentes nos tecidos de *P. perna*, da mesma forma estes fatores podem estar definido as concentrações de hidrocarbonetos na alga parda *S. furcatum,* nos costões desta região.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) já foram encontrados em algas bênticas coletadas em uma região moderadamente poluída da Costa da Noruega (Knutzen & Sortland 1982) e as concentrações encontradas de HPA totais foram de 284 a 4665 ng g-1 para *Fucus vessiculosus*, 445 a 2204 ng g-1 para *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus)Le Jolis, 1863, e 456 a 2964 ng g-1 para *Fucus serratus* Linnaeus, 1753. Estas concentrações foram maiores que as concentrações encontradas na alga parda *S. furcatum* nos costões rochosos do Canal de São Sebastião. Segundo Pereira *et al.*(2007) o Canal de São Sebastião esta sobre moderado grau de impacto ambiental, desta forma a diferença observada entre as algas da Costa da Noruegua e o *S. furcatum* esteja relacionada com a eficiência de espécies em acumular hidrocarbonetos em suas frondes que pode diferir.

Outros compostos encontrados na alga parda *Sargassum* também podem indicar a poluição da

região por derivados de petróleo como o índice de preferência de carbono (CPI), UCM (Mistura complexa Não Resolvida) e razão pristano/fitano. O CPI aponta para fontes naturais de hidrocarbonetos quando apresenta valores ≥4 e o valores encontrados no *Sargassum* foram inferiores a quatro, o que indica a presença de fontes antrópicas de hidrocarbonetos (Guerra-García *et al*. 2003). Adicionalmente a presença de UCM nas amostras de *Sargassum* coletadas em março de 2007 e fevereiro de 2008, confirmam a presença de derivados de petróleo no Canal de São Sebastião e uma variação temporal e espacial na ocorrência de poluentes derivados de petróleo dentre os costões rochosos, uma vez que a presença desta mistura relaciona-se aos compostos do óleo que são resistentes à degradação (Farrington *et al.* 1977).

O pristano (C19) e o fitano (C20) são os isoprenóides mais comuns na maioria dos sedimentos marinhos, pois estão presentes em todos os petróleos e também em fontes naturais. O pristano é mais comum entre os hidrocarbonetos biogênicos, enquanto que o fitano raramente é biossintetizado (Medeiros & Bícego 2004). Desta forma pode-se utilizar a razão pristano/fitano para diferenciar a origem dos hidrocarbonetos nos sedimentos. Em amostras não contaminadas por óleo, a razão é maior que um, normalmente entre 3 e 5 (Steinhauer & Boehm 1992). No presente estudo valores ≤ 1 foram encontrados nas amostras de *S. furcatum* nos três períodos de amostragem, sugerindo uma possível contaminação por petróleo e também uma variação espaço-temporal da poluição no Canal de São Sebastião.

As respostas dos organismos a poluição de ambiental podem ocorrer de diferentes formas e intensidade, como por exemplo, o poluente tributilestanho (TBT), é responsável pelo aumento do número de indíviduos psedohermafroditas na população do caramujo *Ilyanassa obsoleta* Say 1822 (Godoi *et al*. *2003*). Adicionalmente, a poluição por TBT também pode levar a redução da fertilidade no ermitão *Clibanarius vittatus* Bosc 1802, por atrofiar os ovários das fêmeas (Sant'anna 2011). A redução da fecundidade também foi observada no anfípode *Echinogammarus marinus* Leach 1815,

encontrados em um gradiente de poluição por organoclorados (Ford *et al.* 2003). Outros poluentes ambientais, como os metais pesados, também podem interferir nos processos reprodutivos. O sistema de acasalamento de caranguejo *Carcinus maena* Linnaes 1758, é afetado negativamente pela contaminação por cobre por diminuir a capacidade dos machos em detectar as fêmeas receptivas (Krang & Ekerholm 2006). A poluição ambiental por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), por sua vez, pode levar alterações morfológicas de estruturas corporais que podem diminuir a aptidão de um organismo. Borowsky *et al*. (1997) observou alterações morfológicas nos oostégitos de *Melita nítida* Smith1873, cultivada em sedimentos contaminados por HPA, e sugere que estas alterações podem diminuir a fecundidade desta espécie. Krang (2007) observou que o naftaleno interfere no acasalamento entre machos e fêmeas de *Corophium volutator* Pallas 1766*,* machos expostos a este contaminante não reconhecem o feromônio liberado pelas fêmeas que indicam a sua receptividade, este estudo sugere que o naftaleno pode atuar negativamente no sucesso reprodutivo desta espécie e assim podendo afetar a distribuição do anfípode no sedimento.

No presente estudo a distribuição de machos de *C. filosa* pareceu ter sido afetada pelas concentrações de HPA encontradas no *S. furcatum* dos seis costões rochosos, uma vez que houve uma relação negativa entre as concentrações destas substâncias e densidades dos machos, o que pode indicar que estes animais são mais sensíveis a estes poluentes, sendo o naftaleno um dos mais representativos HPA encontrados nas algas e anfípodes (capítulo 1). Segundo Ohji *et al.* (2002) os machos de *Caprella danilevskii* Czerniavskii 1868, tem elevada sensibilidade ao TBT, resultando em elevada mortalidade dos machos e consequentemente no desvio da razão sexual a favor das fêmeas. De fato a densidade das fêmeas de não ovígeras não foi afetada pelos hidrocarbonetos encontrados, adicionalmente o número de fêmeas encontradas nos três meses estudados foi maior que o dos machos (Tab.5). A maior sensibilidade dos machos aos HPA pode ser uma hipótese alternativa para explicar a sua baixa densidade em relação às fêmeas, contudo a baixa densidade de machos de *C. filosa* também pode ser

explicada por migração diferencial. Jovens de tamanhos pequenos de *C. filosa* também podem ser mais sensíveis aos HPA, uma vez que houve um efeito positivo entre os tamanhos dos jovens e as concentrações de HPA. Assim, jovens muito pequenos são afetados negativamente, restando um grupo de jovens com tamanhos maiores onde as concentrações de HPA são elevadas nas algas. A relação negativa entre tamanho de jovens e a razão Pristano/fitano também corrobora com esta hipótese, uma vez que quanto menor a razão, ou seja, mais próxima a 1, maiores são os jovens. Quando a razão entre pristano e fitano é próxima a 1, indica a presença de compostos derivados de petróleo como os HPA (Steinhauer & Boehm 1992).

As concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos também exerceram um efeito positivo sobre o tamanho corporal de fêmeas não ovígeras de *C.filosa,* neste caso é provável que concentrações mais altas de HPA causem um retardamento na reprodução, uma vez que as fêmeas ovígeras apresentaram tamanhos médios superiores aos tamanhos dos machos ou induza a alterações morfológicas nos oostégitos, que são estruturas que formam a bolsa incubatória dos ovos (marsúpio), assim como foi observado em *M. nitida* por Borowsky *et al*. (1997), e desta maneira as fêmeas de *C. filosa* falhariam na manutenção dos ovos em seus marsúpios. Outra explicação possível seria a remoção ativa de ovos inviáveis dos marsúpios pelas fêmeas ovígeras de anfípodes, vista por Dick *et al*. (1998). Em laboratório as fêmeas de *C. filosa* removem ovos não fecundados de seus marsúpios (observação pessoal) e de acordo com Ford *et al.* (2003), a poluição de sedimentos por organoclorados pode provocar falhas no processo de desenvolvimento dos ovos de *E. marinus* levado a uma reduzida fecundidade. Consequentemente, a presença de fêmeas não ovígeras *C. filosa* de tamanhos maiores em algas com concentrações maiores de HPA seria resultado da total remoção de ovos não viáveis de seus marsúpios.

A Mistura Complexa Não Resolvida teve um leve efeito negativo sobre a densidade de jovens de *C. filosa* indicando que as concentrações de hidrocarbonetos derivados de petróleo na alga *S.*

furcatum podem atuar na estruturação da população de *C.filosa* de diferentes formas. Para Pease *et al.* (2010) a contaminação ambiental atua no sentido de selecionar genótipos dentro de uma população que são tolerantes a poluição. Os custos desta tolerância, contudo, são caracterizados pela baixa taxa de crescimento, diminuição na fecundidade e consequentemente na redução da abundância. Estes autores indicam que este processo está acontecendo com *Peramphithoe parmerong*, um herbívoro que vive e se alimenta das algas pardas *Padina crassa* e *Sargassum linearifolium* que acumulam metais presentes na água de áreas apresentam gradientes de poluição do Porto de Sydney na Austrália. Os resultados deste trabalho sugerem que as populações *C. filosa* também podem esta passando este processo. Adicionalmente, quando se compara a densidade máxima de *C. filosa* (março= 8,95 ind. g^{-1}- capítulo 2) associada ao *S. furcatum* do Canal de São Sebastião, com as densidades desta encontradas no costão rochoso da Praia da Fortaleza, região mais ao norte do Estado de São Paulo (Jacobucci & Leite 2006) observa-se uma clara diferença, uma vez que a densidades neste estudo atingem valores próximos a 12 ind. g^{-1}.

Diferentes fatores ambientais e ecológicos podem influenciar a densidades dos anfípodes associados ao *Sargassum* como: hidrodinamismo (Leite *et al*. 2000; Leite *et al*. 2007); presença de predadores (Nelson 1979; Martin-Smith 1993), variação estrutural da alga (Leite *et al*. 2007), interações competitivas (Siqueira *et al*. 2008) e adicionalmente o presente estudo indica que a estrutura de tamanho e a densidade *C. filosa* podem ser influenciadas pela presença de hidrocarbonetos de petróleo na alga parda *S. furcatum* encontradas nos costões rochosos do Canal de São Sebastião e assim estes xenobióticos afetam negativamente a distribuição deste anfípode herbívoro principalmente por que tem um caráter crônico na região de São Sebastião (Pereira *et al.* 2007; 2010).

Capítulo 5: Comportamento reprodutivo, cuidado parental e maturidade sexual de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816.

Introdução

O comportamento reprodutivo engloba um conjunto de estratégias que visa maximizar a aptidão de um animal, sejam elas relacionadas com a forma de adquirir uma parceira ou com a forma do cuidado parental (Alcock 2009). Os crustáceos anfípodes, por exemplo, dispõe de diferentes estratégias para alcançar o sucesso reprodutivo. Espécies de anfípodes epibiontes como hialídeos e *Gammarus* apresentam o comportamento de guarda de fêmeas ou amplexo, onde os machos se predem as fêmeas um período anterior a muda reprodutiva (Borowsky 1991; Leite 1996a; Tsoi & Chu 2005), já anfípode tubícola *Megalorchestia californiana* Brandt, 1851 monopolizam buracos na areia, compartilhados por várias fêmeas caracterizando um sistema de acasalamento poligênico (Iyengar & Starks 2008).

Quanto ao cuidado parental em anfípodes ele pode ser dividido em dois tipos: cuidado parental pré- liberação dos filhotes do marsúpio, como observado em *Crangonyx pseudogracilis* Bousfield, 1958, onde as fêmeas aumentam o fluxo de oxigênio no marsúpio promovendo uma melhor sobrevivência dos filhotes (Dick *et al*. 1998) ou cuidado parental expandido (pós-liberação), no qual consiste na tolerância dos filhotes em seus corpos ou hospedeiros (Thiel 1999, 2000). A construção de pequenos abrigos próximos ou até mesmo em cima de abrigos da fêmea de *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 (Appadoo & Myers 2003) por filhotes, pode ser uma forma de cuidado parental expandido, contudo devido a carência de informações sobre o comportamento reprodutivo desta espécies maiores afirmações não são possíveis.

Cymadusa filosa é um representante da família Ampithoidae, encontrado associado a macroalgas dos costões rochosos do litoral paulista (Wakabara *et al*. 1983; Leite *et al*. 2000; Jacobucci et al. 2002; Tanaka & Leite 2003; Leite *et al*. 2007; Barreto 1998; Ferreira 2008) e apresenta ampla

distribuição geográfica (Peart 2004). Como as demais espécies de ampitoídeos, *C. filosa* se alimenta da alga hospedeira e constrói abrigos em formas tubos utilizando partes da alga (Conlan 1981; Appadoo & Myers 2003) e desta desempenha um importante papel na estrutura comunidade de *Sargassum* (Jacobucci 2005; Jacobucci & Leite 2006; Jacobucci *et al*. 2008, Jacobucci & Leite 2008) bem como na composição das demais espécies ampitoídeos associados, visto que apresenta comportamento agressivo (Siqueira *et al.* 2008).

O conhecimento do comportamento reprodutivo de *C. filosa* pode fornecer informações adicionais para o entendimento das relações compléxicas desenvolvidas pelos anfípodes em na fauna associada a bancos de *Sargassum* (Jacobucci & Leite 2006). Além disso pode possibilitar o uso destes animais como bioindicadores em experimentos de ecotoxicidade, já que são expressivos em termos abundância nas comunidades de anfípodes associadas a bancos de *Sargassum furcatum* do Canal de São Sebastião, uma região que esta sobre efeitos moderados de poluição ambiental (Pereira *et al.* 2007). Desta forma, o objetivo deste estudo foi descrever o comportamento reprodutivo de *C. filosa* e acompanhar o desenvolvimento deste crustáceo até a identificação de sua maturidade sexual. Como esta espécie ocorrem preferencialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Peart 2004) é esperado que o período de incubação e o tempo de desenvolvimento dos indivíduos sejam curtos quando comparados com espécies de Zonas Temperadas, conforme proe Sainte-Marie (1991).

Material e métodos

1.Área de estudo

Foram coletadas frondes de *Sargassum furcatum* Kürtz, 1843, no costão rochoso da Praia de Guarapocaia localizada na cidade de Ilhabela na Ilha de São Sebastião em abril de 2010 (Fig.1)

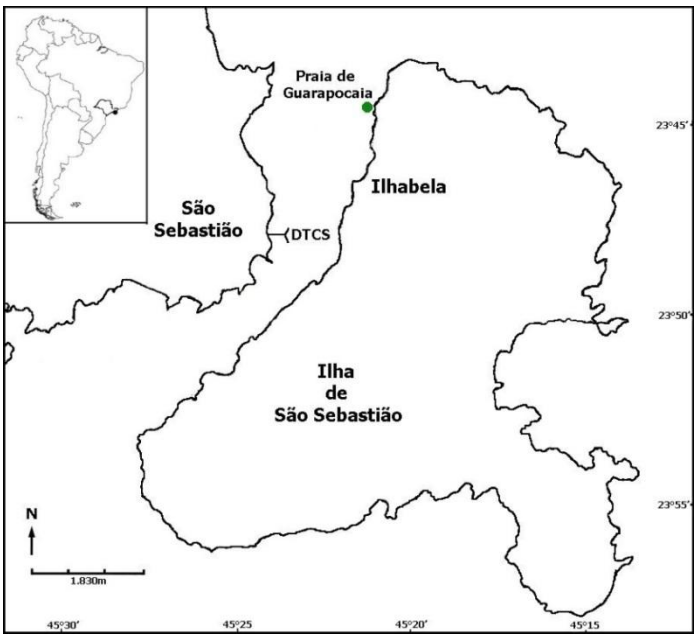


Figura 1: Localização do costão rochoso no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo. Modificado de Denadai (2001).

2.Procedimento de amostragem

As frondes de *S. furcatum* foram cobertas com sacos de tecidos de malha de 0,2mm, para impedir a fuga dos organismos, e foram transportadas até o laboratório do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar - USP). No laboratório 50 indivíduos adultos de *Cymadusa filosa* foram removidos das algas agitando-se as frondes em bandejas com água do mar. Estes animais foram acondicionados em dois pequenos aquários e levados para laboratório de cultivo no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Os anfípodes foram transferidos para um aquário maior (aquário de cultura) com 20L de água do mar, este sistema foi mantido a temperatura média de 24°C com fotoperíodo de 12 horas de luz e sob aeração constante por duas semanas para aclimatação dos anfípodes antes do início das observações sobre o comportamento de reprodutivo de *C. filosa*. A cada semana, cerca de 75 % da água do aquário foi trocada e mais frondes de *S. furcatum*. foram adicionadas para alimentação e abrigo dos animais. Após

o período de aclimatação 10 machos e 10 fêmeas foram individualizados em pequenos aquários com 300 mL de água do mar e folíolos de *S. furcatum* para alimentação e construção de abrigo.

3. *Observações do comportamento reprodutivo*

Para obter informações a cerca do comportamento reprodutivo os animais foram separados em dois grupos.

- Grupo 1: Cinco machos foram adicionados em cinco aquários com uma fêmea em cada um deles.
- Grupo 2: Cinco fêmeas foram adicionadas em cinco aquários com um em cada um deles.

A separação em dois grupos foi feita com intuito de se observar em qual abrigo ocorre a cópula.

Os animais foram mantidos sob temperatura média do ar de 24°C com fotoperíodo de 12 horas de luz, sendo que metade da água dos aquários dos casais de *C. filosa* foi substituída a cada 48 h e novos folíolos de *S. furcatum* foram adicionados. As observações foram realizadas diariamente entre 14:00 as 16:00h e os comportamentos foram registrados.

Com a identificação do aumento do volume da região do marsúpio das fêmeas, indicativo de houve ovulação, as fêmeas foram anestesiadas com água do mar a temperatura de 10°C e foram examinadas quanto à presença de ovos por meio de microscópio estereoscópico.

As fêmeas ovígeras foram transferidas para aquários com 300mL de água do mar e observações diárias foram feitas até a saída dos filhotes do marsúpio. Para estas observações também foi utilizado o microscópio estereoscópico.

4.Maturidade sexual

Para saber quanto tempo leva para *C. filosa* se tornar madura sexualmente, os filhotes foram individualizados em pequenos aquários com 300 mL de água do mar e foram fornecidos folíolos de *Sargassum* para alimentação e construção de abrigo. Dados referentes à presença de exúvias até a observação da maturidade sexual, visualização das gônadas na região dorsal por meio de transparência em fêmeas (Sheader & Chia 1970) e identificação de características secundárias em machos sob o microscópio estereoscópico, foram registrados diariamente.

Foi avaliado se a quantidade de exúvias diminui de a acordo com o desenvolvimento dos filhotes por meio de ANOVA de um fator (semana de vida) e após a diferenciação destes filhotes em machos e fêmeas foi verificado se existe diferença entre a quantidade de mudas ocorridas entre eles utilizado o teste **t** de Student.

Resultados

Comportamento reprodutivo

Foram observados e identificados os comportamentos de interações agressivas entre machos e fêmeas, construção de tubos por ambos e a ocorrência de tubos conjugais. As interações agressivas eram caracterizadas pelo contato físico entre os casais, onde o macho e fêmea investiam seus gnatópodos um contra o outro.

As interações agressivas entre machos e fêmeas foram observadas logo no início do estudo, machos, pertencentes ao grupo 2(n=3), os quais investiram seus gnatópodos contra fêmeas, quando as elas tentaram ocupar seus abrigos. Por outro lado, as fêmeas do grupo 1 não reagiram agressivamente contra os machos, permitindo a entrada em seus abrigos (n=2). Entretanto, em seguida abandonaram estes abrigos e começaram a construir novos.

Não foi observado cópula, contudo notou-se a formação de quatro tubos conjugais (Fig.2), ou

seja, são tubos compartilhados por ambos os sexos os quais foram construídos inicialmente pelas fêmeas. Esta formação permaneceu estável por um período de até dois dias por casal e foi possível observar que os machos monitoravam as entradas do tubo durante este período. Todas as fêmeas que formaram tubos conjugais realizaram ecdise, em virtude de ter sido notada a presença de exúvia feminina nos aquários.

Após sete dias de observação apenas nas fêmeas que formaram abrigos conjugais continham ovos em seus marsúpios. Estes ovos eclodiram em média 5,75 dias (± 0,5 devio padrão) depois da formação dos tubos conjugais e permaneceram no marsúpio por um período de até 3 dias (Fig. 3). Contudo, os filhotes de uma mesma fêmea não saiam sincrônicamente do marsúpio, eles deixavam o marsúpio aos poucos.

Durante a permanência dos filhotes no marsúpio observou-se que duas fêmeas alimentavam seus filhotes. Estas fêmeas utilizando seus aparelhos bucais, cortavam fragmentos dos folíolos de *S. furcatum* que formavam seus tubos e os trituravam e com os gnatápodos direcionavam estes fragmentos para o marsúpio onde foram disputados pelos filhotes.

Os filhotes após deixarem os marsúpios de suas fêmeas, construíram abrigos com pelotas fecais de suas progenitoras e também com suas próprias pelotas fecais (Fig. 4-A). As fêmeas sofreram ecdise em 2,5 ± 1,0 ($\bar{X}$± desvio padrão) dias após o início da construção do abrigo pelos filhotes (Fig. 3-B).

Maturidade sexual

No total foram gerados 54 filhotes e durante o desenvolvimento houve uma redução 38 % em seu número, e desta forma 32 filhotes chegaram à maturidade sexual.

A quantidade de exúvias observada foi diferente entre as setes semanas de vida ($F_{6, 261} = 96,5$; $p < 0,01$), sendo que os filhotes sofrem mais mudas nas duas primeiras semanas de vida (Fig.5) e a medida que se desenvolviam o número de mudas diminuiram.

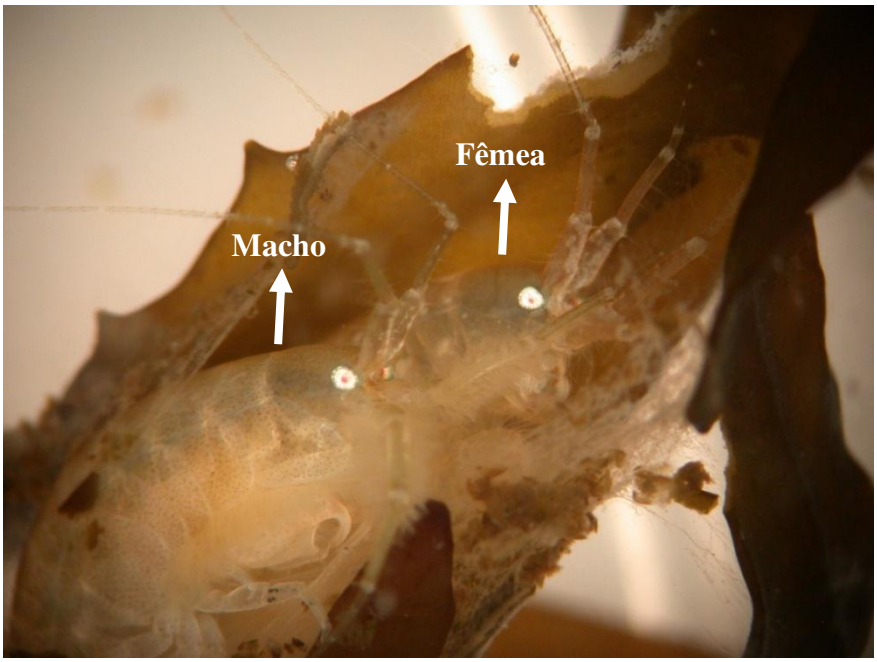


Figura 2: Tubo conjugal: nota-se a presença do macho e fêmea ambos ocupando a mesma abertura.

Figura 3: Fêmea de *Cymadusa filosa* com filhotes no marsúpio

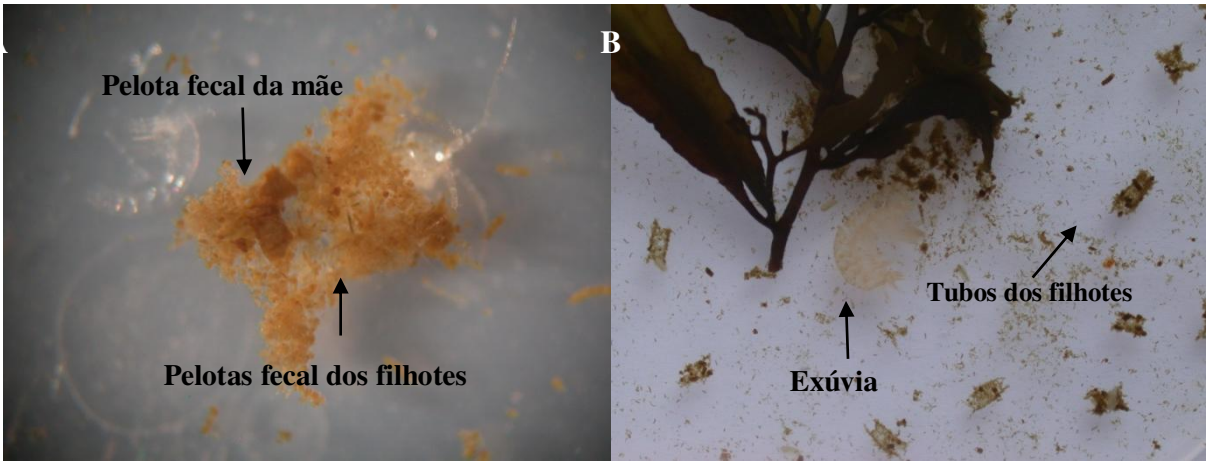


Figura 4: A- Tubo construído por um filhote de *C. filosa.* B- Exúvia da fêmea e vários tubos dos seus filhotes.

A presença de gônadas em fêmeas e a identificação dos machos foi possível entre 6 a 7 semanas vida. Assim dos 32 filhotes que sobreviveram até a 7ª semana, 16 se desenvolveram em machos e os outros 16 em fêmeas. Também foi registrado a presença de ovos não fecundados em duas fêmeas em com seis semanas de vida.

Verificou-se que as fêmeas apresentaram maior número de mudas 11,5 ± 0,91 ($\bar{X}$± desvio padrão) que os machos, 9,6 ± 0,73 ($\bar{X}$± desvio padrão). O resultado do teste t revelou que as fêmeas sofrem significativamente mais mudas que machos ($t = 6,01$; $gl = 30$; $p < 0,001$).

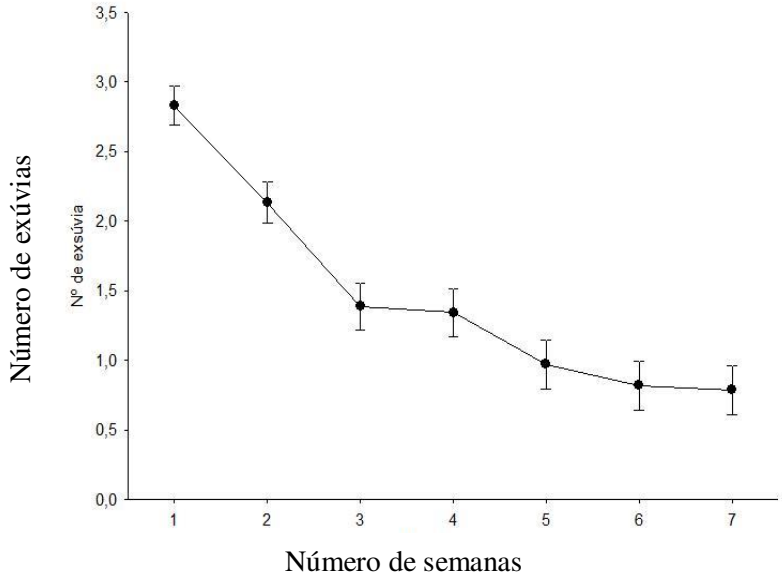


Figura 5: Número médio de exúvias observados durante sete semanas de vida dos filhotes.

Discussão

Comportamento reprodutivo

O comportamento reprodutivo dos anfípodes gamarídeos está fortemente relacionado com seus hábitos de vida (Borowsky 1983a), por exemplo, as espécies epibiontes do gênero *Gammarus,* apresentam comportamento de guarda de fêmeas pelos machos (Prender et al. 2006) que utilizam os gnatópodos 2 para se prenderem as fêmeas. O casal se mantêm desta forma até que elas passem pelo processo de muda (muda reprodutiva) quando se tornam receptivas ao acasalamento, ocorrendo neste momento à cópula (Borowsky 1984; Borowsky & Borowsky 1987). Comportamento semelhante foi observado nas espécies de hialídeos (Leite 1996a; Tsoi & Chu 2005) que também são epibiontes. Por outro lado este tipo de comportamento não é observado entre as espécies construtoras de tubos ou abrigos (tubícolas) (Borowsky 1983a) e pode não permitir a visualização da cópula. Segundo esta autora a formação de tubos conjugais consiste em um comportamento análogo a guarda da fêmea de anfípodes epibiontes, sendo que a cópula ocorre no interior do tubo. Tubos conjugais já foram

observados em *Ampithoe valida* Smith, 1873*, Jassa falcata* Montagu, 1808 (Borowsky 1983a, 1986) *e Casco bigelowi* Blake 1929 (Thiel 1998) e também foi observado no presente estudo com *C. filosa.* A cópula ocorre imediatamente após a muda reprodutiva (Leite 1996a). Neste momento as fêmeas depositam seus ovos no marsúpio e são fertilizados pelos machos (Sheader & Chia 1970; Borowsky 1983a, 1983b; Leite 1996a). A presença de exúvias femininas do lado dos abrigos conjugais de *C. filosa* confirma, portanto, que houve cópula e consequente a fecundação dos óvulos.

A formação de abrigos conjugais indica a receptividade da fêmea para a cópula, uma vez que é induzida pela liberação de feromônios femininos (Borowsky 1990) desta forma, a não formação de tubos conjugais em seis casais de *C. filosa* sugere que as fêmeas poderiam não estar receptivas sexualmente. Consequentemente, as interações agonísticas entre machos e fêmeas também podem ser indicativas já que os machos não deixaram as fêmeas entrarem em seus tubos.

Os machos de anfípodes buscam continuamente outras oportunidades de se acasalar, assim a migração diferencial pode ser uma das estratégias utilizadas por eles para aumentar seu sucesso reprodutivo, uma vez que machos tendem a deixar a casas das fêmeas após a cópula (Borowsky 1983a) e como a reprodução não é sincrônica para espécies de anfípodes que ocorrem em regiões tropicais (Sainte-Marie 1991), os machos de *C. filosa* poderiam deixar os abrigos conjugais s em busca novas fêmeas receptivas e na ausência das mesmas há construção de um novo abrigo, como observado neste estudo.

O período de incubação dos ovos de *C. filosa* foi cerca de seis dias, o mesmo período encontrado para Apoh*yale media* Bousfield & Hendrycks, 2002 (Leite 1996a), no entanto, Sheader & Chia (1970) observaram que o tempo de incubação para *Marinogammmarus obtusatus* Dahl, 1938, foi de 14 dias. Estas diferenças podem ser atribuídas à temperatura da água onde foram cultivados os organismos. Para *M. obtusatus* a temperatura foi de 9°C enquanto que para *C. filosa* e *A. media* foi de 24°C e quanto menor a temperatura maior é o período de desenvolvimento do ovo (Sheader 1996).

Cuidado parental é uma estratégia utilizada para uma série de animais que buscam aumentar a sua aptidão. Os anfípodes apresentam cuidado parental já que as fêmeas carregam seus ovos ou filhotes no marsúpio protegendo-os contra predadores (Thiel 1999), entretanto algumas espécies também aumentam a sobrevivência dos ovos ou embriões aumentando a oxigenação no marsúpio e removendo ovos inviáveis deste local (Dick *et al.* 1998, 2002). Outras espécies de anfípodes promovem cuidado parental após a os filhotes deixarem seus marsúpios tais como *Leptocheirus pinguis* Stimpson*,* 1853, *Casco bigelowi* e *Leucothoe* comportamento é conhecido como cuidado parental expandido, onde os parentes podem alimentá-los ou tolera-los em seu corpo ou em seus hospedeiros (Thiel 1999, 2000). O comportamento de prover alimento enquanto os embriões estão no marsúpio constitui outra forma de aumentar a sobrevivência dos filhotes, caracterizando o cuidado parental de *C. filosa* o qual ainda não havia sido descrito.

Maturidade sexual

Os crustáceos para crescer e se desenvolver precisam passar pelo processo de ecdíse ou muda (Hartnoll 1982), assim o crescimento de *C. filosa* é bem intenso nas três primeiras semanas de vida, já que a periodicidade das mudas foi maior e intervalo entre elas foi menor. Por outro lado este processo requer energia e é considerando um período crítico para os crustáceos deixando-os bastante vulneráveis a predadores e a qualquer alteração ambiental (Hartnoll 1982) e isto pode explicar a elevada mortalidade dos filhotes de *C. filosa* durante estas três semanas.

A construção de abrigos com pelotas fecais pelos jovens de *C. filosa* também foi observado por Appadoo & Myers (2003) e o uso deste material provalvelmente ocorre pela incapacidade dos filhotes em fragmentar e aglutinar os folíolos de *Sargassum,* mas à medida que crescem, começam a utilizar adequadamente a alga para construção de abrigos.

Fêmeas de *C. filosa* sofreram mais mudas do que os machos, de acordo com Borowsky (1983a)

esta característica é comum para fêmeas de gamarídeos, já que a maturidade ocorre quando ostégitos estão completamente desenvolvidos. A reprodução está relacionada com o processo de muda e fêmeas realizam mais mudas que os machos para desenvolvimento do oostégitos e assim alcançarem a maturidade sexual (Borowsky 1983a), tendo o mesmo tempo de vida que os machos (Tsoi & Chu 2005).

A maturidade sexual de *C. filosa* foi observada entre 36 a 42 dias de vida (6 a 7 semanas). Em *Apohyale crassicornis* Haswell 1879, a maturidade foi observada entre 38 a 53 dias (Tsoi & Chu 2005) enquanto que para de *Hyalella pleoacuta e H. castroi* ,Gonzalez, Bond-Buckup & Araujo 2006, foi em torno de 52 dias (Silva-Castiglioni *et al.* 2007). Esta variação observada em termos de idade de maturidade sexual pode estar relacionada ao ambiente e as diferentes condições de culturas de laboratórios que estas espécies foram expostas (Silva-Castiglioni *et al.* 2007). O crescimento e o desenvolvimento das espécies de anfípodes são afetados pela disponibilidade de alimento e a temperatura (Steele & Steele 1991). Anfípodes que vivem em regiões mais frias demoram mais tempo para se tornarem sexualmente maduros e atingem tamanhos corporais maiores que anfípodes das regiões tropicais (Sainte-Marie 1991). *Cymadusa filosa* e *A. crassicornis* foram mantidas em condições de temperaturas semelhantes (24°C) enquanto que *H. pleoacuta e H. castroi* foram mantidas a 19°C, desta forma a variação da temperatura pode explicar em parte a variação em termos de maturidade sexual entre as espécies, um vez que o suplemento de alimento foi mantido contínuo.

De forma geral as observações sobre o comportamento reprodutivo de *C. filosa* demonstram que esta espécie tem período de incubação curto, rápido desenvolvimento e com a maturidade sexual sendo alcançanda em poucas semanas, características previstas para as espécies de anfípodes de regiões tropicais (Sainte-Marie 1991). Estas características também favorecem o uso de *Cymadusa filosa* em experimentos de ecotoxicidade crônica e aguda, uma vez que possibilitam respostas comportamentais em um período de tempo relativamente curto.

Capítulo 6: *Cymadusa filosa* Savigny, 1816 (Amphipoda: Ampithoidae) uma nova proposta de organismo para ensaios ecotoxicológicos marinhos.

Introdução

A degradação dos ambientes marinhos e estuarinos decorrente da presença de efluentes domésticos e industriais, de petróleo e seus derivados torna necessária a tomada de medidas preventivas e corretivas, que venham a salvaguardar esses ecossistemas (Badaró-Pedroso 1999), visto que introduzem uma grande quantidade de substâncias que podem ter efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos sobre os organismos nestes ambientes (Reynier 1996). A preocupação com a qualidade das águas costeiras tem motivado a criação de programas de gestão e manejo nestas áreas (Vieira 2004). Neste sentido vários países vêm reunindo esforços para desenvolver uma forma de avaliar os ecossistemas baseando-se em suas propriedades físico-químicas, diversidade ecológica e ou caracterização química para definir qualidade ecológica de ambientes aquáticos e desta forma poder criar politicas que visam o controle da qualidade ambiental ou minimizam os efeitos dos xenobióticos sobre ambientes marinhos (Hellou 2011).

As agências ambientais como a Agência de Proteção Ambiental (EPA) e NOAA nos Estados Unidos, a Agencia Ambiental do Canadá (Environment Canada) e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) no Brasil são alguns dos exemplos de agências responsáveis pelo controle dos impactos antrópicos e a qualidade ambiental nos estuários e ambientes costeiros destes países.

Uma das formas utilizadas para avaliar a qualidade ambiental de ambientes marinhos, é por meio de estudos ecotoxicológicos. A ecotoxicologia é uma ciência que compreende a interação entre a ecologia e a toxicologia (Chapman 1995; Baird *et al*. 1996), tendo como objetivo principal compreender e predizer os efeitos de substâncias químicas em comunidades biológicas, sob circunstâncias reais de exposição. Tornando-se uma importante ferramenta na avaliação de como

substâncias químicas afetam diferentes organismos e populações, fornecendo subsídios para avaliar e proteger adequadamente a qualidade ambiental (Chapman 2002; Calow 1996).

Os testes ecotoxicológicos consistem em expor os organismos aquáticos representativos do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, durante um determinado período de tempo, avaliando os efeitos causados nos organismos- teste (CETESB, 1990). A escolha das espécies a serem utilizadas em testes de ecotoxicologia deve basear-se em critérios, tais como a disponibilidade e abundância na natureza, a capacidade de adaptação a condições de laboratório, tamanho conveniente para manipulação e observação, além de informações relativas à biologia das espécies, como a duração do ciclo de vida, hábitos alimentares, longevidade e mortalidade natural (Brendolan & Gomes 2003; Shafir *et al.* 2003). Segundo Thomas (1993), os anfípodes apresentam características que os qualificam como potenciais bioindicadores ambientais devido a sua importância ecológica, abundância e a sensibilidade a uma variedade de poluentes, desta forma, algumas espécies de anfípodes são amplamente usadas em testes ecotoxicológica para avaliar a qualidade ambiental, principalmente em sedimentos marinhos como: *Amphiporeia virginiana* Shoemaker 1933, *Corophium volutator* Pallas 1766, *C. areanarium* Crawford 1937, *C. orientale* Schellenberg 1928, *Gammarus locusta* Linnaeus 1758, *Ampelisca abdita* Millis 1964, *Leptocheirus plumulosus* Shoemaker 1932, *Tiburonella viscana* Barnard 1964, *Monoporeia affinis* Lindström 1855, *Eohaustorius estuarius* Bosworth 1973, *E. washingtonianus* Thorsteinson 1941, *Rhepoxynius abronius* Barnard 1960, *Grandidierella japônica* Stephensen 1938, e *Ampelisca abdita* Millis 1964 (ABNT NBR 15638: 2008). Como a maioria destes anfípodes não ocorre na costa brasileira os estudos de avaliação ambiental por meio de ecotoxicologia marinha no Brasil são realizados com *T. viscana* (Abessa & Sousa 2003; Seriani *et al*. 2008; Maranho *et al*. 2009) e principalmente avaliam a poluição nos sedimentos. Entretanto, devido às dimensões da costa brasileira e a crescente preocupação de preservar e acessar a qualidade ambiental, vários estudos de ecotoxicologia estão sendo desenvolvidos no Brasil com intuito de se obter um número maior de

espécies sensíveis que possam ser utilizadas como bioindicadoras de qualidade ambiental marinha tanto quanto se referem ao sedimento como da coluna d'água. Assim novos estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar a eficiência de espécies representativas do ambiente marinho como bioindicadoras, como por exemplo *Apohyale media* (Valério-Berardo & Domingos 2008).

Cymadusa filosa Savigny 1819, representante da família Ampithoidae é um anfípode que possui ampla distribuição geográfica ocorrendo associada a diferentes espécies de algas (Barnard & Karaman 199; Peart 2004). No Brasil, especialmente no litoral de São Paulo, é frequentemente encontrada associada à alga parda *Sargassum* spp., com expressiva representação numérica (Jacobucci & Leite 2006) e no Canal de São Sebastião, um ambiente que sofre forte impacto antrópico devido às atividades turísticas, ao lançamento de esgotos e a operação do Duto e Terminais Centro Sul (DTCS) (Zanardi *et al.* 1999b, CETESB 2008), *C. filosa* pode ser encontrada associada a diferentes bancos de *Sargassum furcatum* Kürting1843. Este anfípode apresenta elevada taxa de fecundidade, curto período de incubação e alcança a maturidade sexual entre cinco a seis semanas de vida (Capítulo 4) e pode ser facilmente mantida em laboratório, assim *C. filosa* possui características biológicas consideradas favoráveis à sua adoção como organismo-teste potencial em ensaios ecotoxicológicos. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi testar a sensibilidade de *C. filosa* a três xenobióticos: o sulfato de cobre como substância de referência, naftaleno e fração solúvel de petróleo em água (FSA), poluentes ambientais que podem estar disponíveis na região de ocorrência de *C. filosa*, por meio de experimentos de ecotoxicidade aguda de 48h e avaliar a eficiência desta espécie para acessar a qualidade ambiental de ambientes marinhos.

Material e métodos

Foram coletadas frondes de *Sargassum furcatum* no costão rochoso da Praia de Guarapocaia (S 23º44.972' WO 45º 20.945') localizada na cidade de Ilhabela na Ilha de São Sebastião em dezembro de

2010, janeiro, março e maio de 2011 (Fig.1).

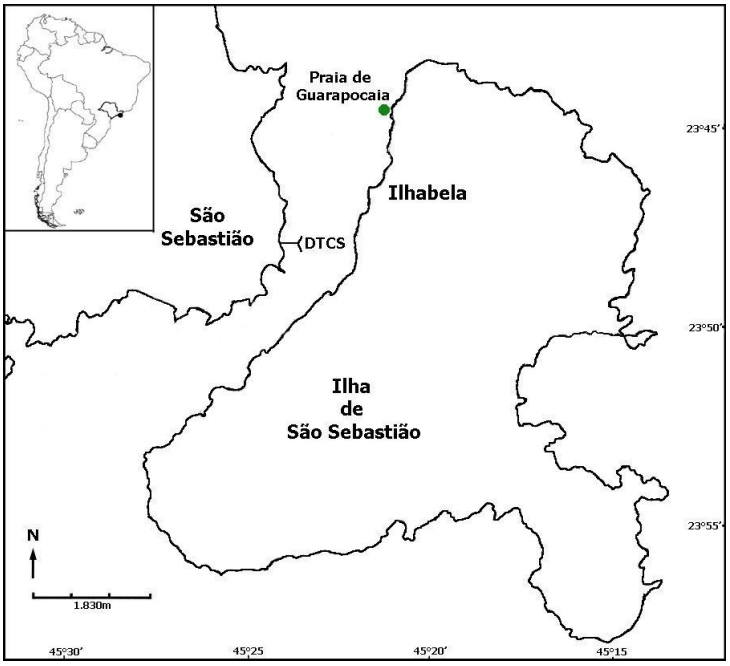


Figura 1: Localização do costoão rochoso no Canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo. Modificado de Denadai (2001).

1.Procedimento de amostragem

Obtenção de *Cymadusa filosa*

Por meio de mergulho livre em cada coleta, as frondes de *Sargassum furcatum* foram cobertas com sacos de tecidos de malha de 0,2mm para impedir a fuga dos organismos e destacadas do substrato. Em seguida este material coletado foi acondicionado em caixa térmica com água do mar e transportado até o laboratório do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar - USP). No laboratório cerca de 15 fêmeas ovígeras *Cymadusa filosa* foram removidas das algas agitando-se as frondes em bandejas com água do mar. Estes animais foram acondicionados em dois aquários de volume igual a 2L, mantidos em ambiente resfriado e levados para laboratório de aquários no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

As fêmeas ovígeras foram individualizadas em pequenos aquários com 300 mL de água do mar

reconstituída a 34‰ com folíolos de *Sargassum furcatum* para alimentação e construção do abrigo, a água foi trocada a cada 48h e novos folíolos de *Sargassum* foram acrescentados. À medida que os filhotes foram saindo dos marsúpios das fêmeas, foram transferidos para um cristalizador com 2 litros de água do mar reconstituída. Este sistema foi mantido sob aeração constante, fotoperíodo de 12h/luz no qual a água foi substituída em 48h e novos folíolos de *Sargassum* foram adicionados para alimentação dos filhotes até a realização dos experimentos de toxidade aguda de 48h. Nestes experimentos foi observada a sobrevivência dos filhotes de *C. filosa* com idade entre 7 a 10 dias conforme sugere a norma da ABNT NBR 15470 (2007), expostos a três xenobióticos: cobre, naftaleno e fração solúvel de petróleo em água (FSA) durante o período de 48h.

Preparação das soluções os para os textes de toxidade

As soluções utilizadas para realização dos experimentos foram preparadas no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Biologia Animal-IB/UNICAMP.

A solução estoque de cobre 1000mg/L foi obtida da mistura de 1,9645g de sulfato de cobre ($CuSO_4$ $5H_2O$) diluída em água destilada em balão volumétrico de 0,5L. A partir desta solução por meio de diluição em água do mar recostitída a 34‰ foram obtidas as concentrações testes de 0,5L: 0,0001; 0,001;0,01; 0,10; 1,00 mg/L de cobre.

Para obteção de seis concentrações dilferentes de naftaleno ($C_{10}H_8$): 0,01; 0,10; 1,00; 5,00; 10,00 mg/L, 10g de naftaleno foram diluídos em 0,5L de acetona PA, devido à baixa solubilidade desta substância em água do mar (Eganhouse & Calder 1976). Desta solução foi retiradoa 1 mL e diluido em água do mar reconstituída até se prefazer um volume total de 1000mL. Desta forma a solução estoque de naftaleno teve concentração de 20 mg/L a qual foi utilizada para preparar as concentrações testes de volume igual a 0,5L. A quantidade de acetona PA presente na maior concentração de naftaleno utilizada para realização dos testes (10,00 mg/L) foi de 125µL/L, o qual não afeta a sobrevivência de

anfípodes em testes de toxidade aguda (Ohji *et al.* 2002).

A fração solúvel de petróleo em água (FSA) foi obtida adicionado 1g de petróleo (Mistura MSSI/MSMS D= 0,9199, provinente da Bacia de Campos, RJ) em água do mar reconstituída até prefazer um volume de 1000 mL em um frasco com capacidade de 2L, neste sistema foi colocado uma barra magnética de 6 cm de comprimento. O frasco foi fechado e agitado com agitador magnético a uma velocidade de 100 RPM por um período de 24h a temperatura de 22°C, após este período a solução foi colocada para descansar por 1h (Anderson *et al*. 1974) e no fim deste processo apenas a fase aquosa da solução foi utilizada para preparação das concentrações testes: 1 ppm; 10 ppm; 100 ppm e 1000 ppm de FSA.

Descrição dos experimentos de ecotoxicidade

Para cada substância foram realizados três experimentos de toxicidade. O sistema dos testes foi estático, ou seja, não houve renovação do volume das diferentes concentrações utilizadas e sem aeração. O fotoperíodo foi de 12h de luz, a temperatura média de 24,5± 0,6 °C, enquanto que a salinidade das soluções teste foi de 34%. Os filhotes de *C. filosa* utilizados nos experimentos foram alimentados previamente com folíolos de *Sargassum*, assim, eles não foram alimentados durante a realização dos testes.

Em cada teste e para as diferentes concentrações das soluções de cobre, naftaleno e FSA, foram expostos 10 filhotes de *C.filosa*, os quais foram individualizados em beckers, de volume total de 50 mL, com 20 mL das soluções. Para diminuir a evaporação, cada becker foi tampado com placa petri.

Nos experimentos de toxicidade com o naftaleno foi utilizado dois tipos de controle: o controle 1 com apenas água do mar reconstituída (Red Sea Salt) e no controle 2 no qual foi adicionado 125µL de acetona PA em água do mar reconstituída até se obter o volume de 1000 mL, este segundo controle foi realizado para ver o possível efeito da acetona sobre a sobrevivência dos filhotes de *C. filosa*. Para

os experimentos com o cobre e a FSA foi realizado apenas um tipo de controle, onde 10 filhotes foram expostos separadadamente a 20 mL de água do mar reconstituída em beckers de 50 mL.

2. Análise dos dados

A sobrevivência dos filhotes de *C.filosa* foi observada após as 48h e para cada teste foi estimada pelo método de Trimmed Spearman-Karber com a correção de Abbott (Hamilton *et al*., 1977) a CL50-48h, ou seja a concentração do xenobiótico capaz de provocar a mortalidade de 50% da população do organismo teste, após o periodo de 48h (Costa *et al.* 2008).

Resultados

A sobrevivência dos filhotes de *Cymadusa filosa* nos experimentos de ecotoxicologia com o cobre, o naftaleno e a FSA de forma geral foi elevada nas concentrações mais baixas testadas, variando entre 100 a 80% e baixa ou nula em concentrações maiores (Figs. 2-4). Entretanto nota-se uma redução brusca da sobrevivência dos filhotes entre as concentrações de 0,001 e 0,01mg/L de cobre (80 para 30%) e de 100 e 1000ppm de FSA (70 para 20%) (Figs. 1 e 4). A redução da sobrevivência dos filhotes expostos ao naftaleno diminui de forma mais gradativa de acordo com o aumento da concentração desta substância, contudo observa-se uma variação em termos de sobrevivência dos indivíduos expostos as concentrações de 1 e 5mg/L de naftaleno (Fig, 3).

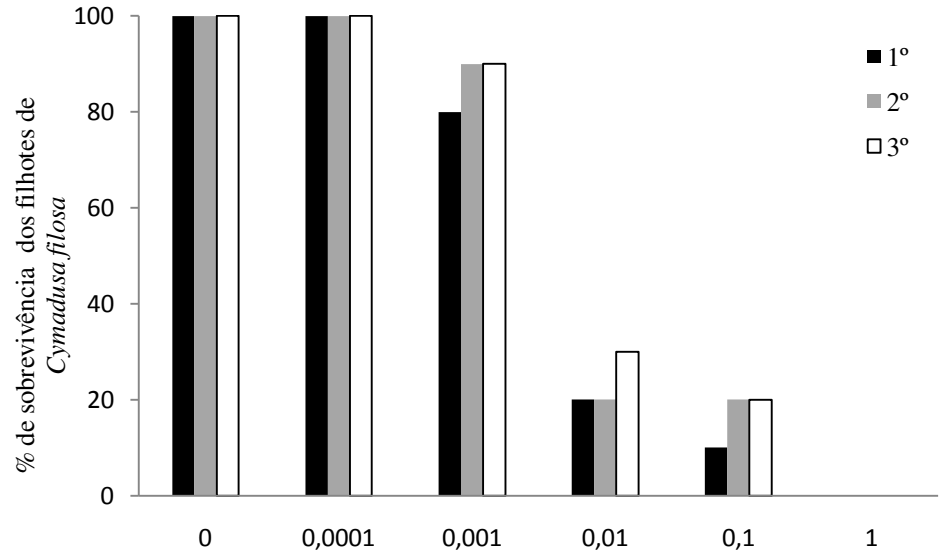


Figura 2: Sobrevivência em porcentagem dos filhotes de *Cymadusa filosa* expostos a 6 concentrações de cobre (mg/L) nos três testes. N=10 para cada concentração

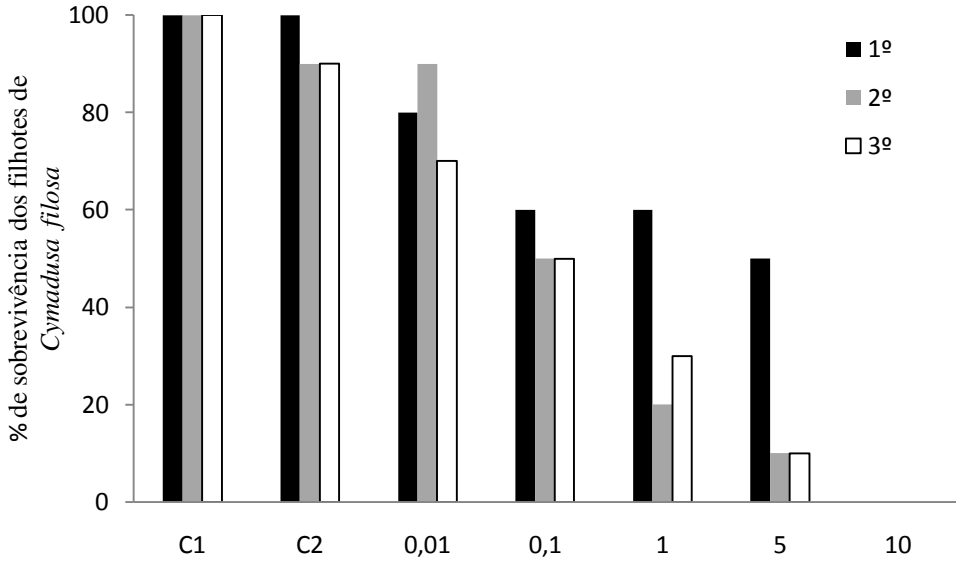


Figura 3: Sobrevivência média em porcentagem dos filhotes de *Cymadusa filosa* expostos a 7 concentrações de naftaleno (mg/L). C1- Controle sem acetona; C2- Controle com acetona. N=10 para cada concentração.

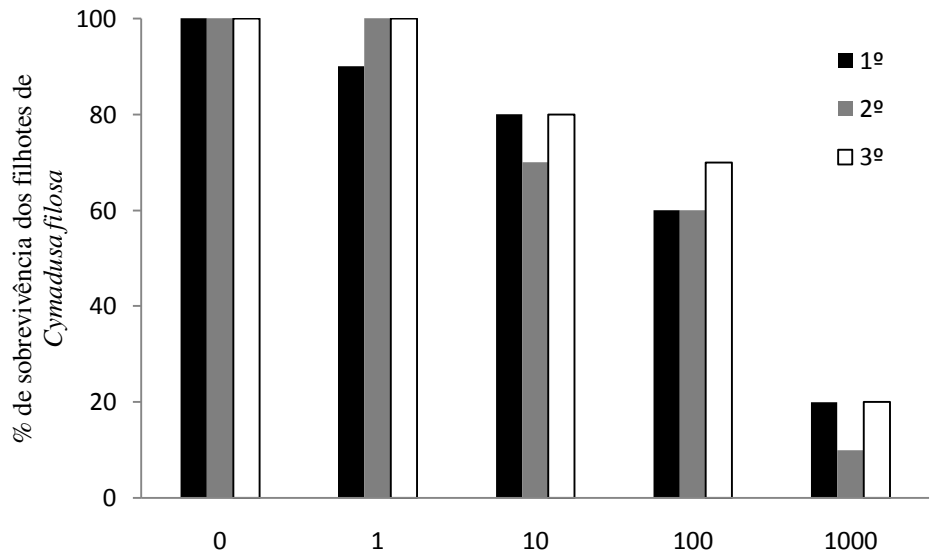


Figura 3: Sobrevivência média em porcentagem dos filhotes de *Cymadusa filosa* expostos a 5 concentrações da Fração Soluvél em água (FSA) de petróleo (ppm). Barras representam os desvios.

A CL50-48h média obtida nos três testes ecotoxicologia foi de 0,01 mg/L, enquanto que para naftaleno a CL50-48h média foi de 0,08mg/L e a concentração média da fração solúvel de petróleo em água para causar a morte de 50% da população de filhotes de *C. filosa* foi de 148,50 ppm.

Tabela 1: Resultados da CL50-48h obtidos nos 3 testes agudos com cobre, naftaleno e a fração soluvél do petróleo em água (FSA) conduzidos com filhotes de *Cymadusa filosa.* O intervalo de confiança é apresentado entre parênteses. DP- Desvio padrão.

Testes	Cobre (mg/L)	Naftaleno (mg/L)	FSA (ppm)
1	0,01 (0,001-0,02)	0,05 (0,01-0,29)	146,78 (37,19-579,36)
2	0,01 (0,001-0,02)	0,21(0,09-0,51)	82,54 (24,35-279,83)
3	0,01 (0,001-0,01)	0,08 (0,01-0,57)	215,44 (58,30-796,12)
$\bar{X}$	0,01	0,11	148,50
DP	-	0,08	66,45

Discussão

Diversas espécies de anfípodes são amplamente usadas em testes de ecotoxicologia marinha para avaliar a qualidade ambiental de sedimentos e água em ambientes costeiros em várias partes do mundo (Cesar *et al.* 2004). No Brasil o anfípode *Tiburonella viscana* vem sendo usados para caracterizar os sedimentos de diferentes ambientes estuarinos (Abessa & Souza 2003; Maranho *et al.* 2009), enquanto que qualidade da água mar, por outro lado, é investigada por meio de testes ecotoxicologicos com a espécie de *Mysidopsis juniae* Silva 1979 (Nipper *et al. 1993*; Badaró-Pedroso 1999; Marques 2008), outro peracarida pertencente ordem Mysidacea que possui norma padronizada pela CETESB (L5.251 1992) e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15308(2005). O sucesso do uso desta espécie nestes experimentos está associado as suas características biológicas como a facilidade de obtenção e manutenção em laboratório, seu potencial reprodutivo e a sua sensibilidade a uma variedade de xenobióticos (Kleine *et al.* 2010). A espécie *C. filos*a do presente estudo apresenta característica biológicas semelhantes a *M. juniae* como elevada fecundidade, facilidade de obtenção e manutenção em laboratório. Adicionalmente os resultados obtidos com experimentos de ecotoxicidade aguda com a substância de referência sulfato de cobre sugerem sensibilidade elevada de *C. filosa* ao cobre (CL50-48h: 0,01 mg/L), uma vez que este valor foi 20x menor que o encontrado para *M. juniae* , 60 x menor que a CL50 encontrada para *Corophium insidiosum* Crawford 1937, 25x menor que CL50 de *Elasmopus bampo* Barnard 1979, (Reish 1993) e 8x menor que CL50 de cobre para *Leptocheirus plumulosus* (Burton *et al.* 2011).

A sensibilidade de *C. filosa* ao naftaleno também foi bastante expressiva. O naftaleno de acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environment Protection Agency) é um dos 16 tipos de hidrocarbonetos aromáticos considerados importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários (EPA 1986). O naftaleno, mesmo apresentando baixa solubilidade

em água do mar, 22mg/L a 35‰ (Eganhouse & Calder 1976), tem um grande efeito tóxico em diversos organismos marinhos (Lee & Nicol 1978; Landrum *et al.* 2003). A CL50-48h de naftaleno encontrada para *Elasmopus pectenicrus* Bate 1853, foi de 2,8mg/L enquanto que em *Parhyale hawaiensis* Dana 1853, foi de 5mg/L (Lee & Nicol 1978 a e b), estes valores também foram superiores a CL50-48 média de *C. filosa* para naftaleno, contudo no presente estudo para aumentar a solubilidade do naftaleno foi utilizado acetona PA, e a acetona em pequenas concentrações pode agido sinergicamente com naftaleno, ocasionando a CL50 média de 0,11mg/L para *C. filosa.* Efeitos sinérgicos de outros poluentes ambientais com o naftaleno foram encontrados no trabalho de Lee & Nicol (1978a) de forma que a presença de naftaleno no sistema estudado aumenta a toxidade da outra substância. A utilização de acetona como solvente de naftaleno foi realizada no estudo de Landrum *et al.* (2003) que encontraram o valor de CL50 média de 1,75mg/L para o naftaleno, após 10 dias de exposição do anfípode *Diporeia* spp, entretanto há a necessidade de se testar a existência ou não de efeitos sinérgicos da acetona com o naftaleno já que no tratamento controle com acetona, do presente estudo, a sobrevivência dos filhotes de *C. filosa* foi em torno de 93%, valor aceitável para sobrevivência de anfípodes expostos ao controle (ABNT NBR 15470 2007; NBR 15638 2008), adicionalmente, Ohji *et al*. (2002) observaram que concentrações de acetona inferiores a 125µL/L não causaram nenhuma resposta negativa a várias espécies de anfípodes estudadas.

A toxidade da fração solúvel de petróleo em Água (FSA) depende do tipo de óleo o qual ela foi obtida (Tsvetnenko & Evans 2002). O petróleo leve, com maior quantidade de hidrocarbonetos aromáticos, tende a ser muito mais tóxico que petróleo pesado (Ottway 1971) uma vez que estes hidrocarbonetos apresentam de baixo peso molecular e são relativamente solúveis em água (Anderson *et al.* 1974), porém são muito voláteis. O óleo utilizado para realização dos testes de ecotoxidade da FSA apresenta densidade em torno de 0,92 sendo classificado como óleo pesado (ITOPF 2005), ou seja, apresenta uma toxicidade potencial teoricamente menor. Tal característica provavelmente

explique a CL50 média de FSA para *C. filosa* de 148,50 que foi elevada quando comparada com a CL50 de outros crustáceos como *Mysidopsis almyra* Bowman 1964 (CL50-48h: 37,5 ppm), *Misidium gracile* Dana 1852 (CL50-96h: 9,16 ppm) (Reynier 1996). A variação observada entre os valores de CL50 de FSA entre os teses podem ocorre em função de pequenas variações relacionadas com a preparação da FSA, a diluição, por exemplo, nem sempre é considerada o melhor caminho para se obter as diferentes concentrações de FSA para uso em experimentos de ecotoxicologia (Hokstd *et al*. 1999; Singer *et al*. 2000; Tsvetnenko & Evans 2002) ou em função do número pequeno de réplicas do experimento.

Os resultados deste estudo indicam em princípio que *C. filosa* tem um potencial como organismo-teste para estudos de ecotoxicologia e assim ser usado para atestar a qualidade da água em ambientes marinhos expostos a fontes de poluição ambiental, uma vez que no Brasil a ecotoxicologia marinha é relativamente recente de forma que são poucas as espécies nativas que apresentam ensaios ecotoxicológicos padronizados e protocolados (Ihara *et al*. 2010). Por outro lado, estudos adicionais avaliando os efeitos letais e subletais, crônicos de diferentes xenobióticos tanto em níveis populacionais, bioquímicos, celulares e fisiológicos podem fornecer dados mais detalhados acerca da sensibilidade de uma espécie bem como da qualidade ambiental (Pereira *et al*. 2007), os quais são necessários para validar o seu uso como bioindicador.

Considerações finais

Os resultados obtidos indicam que tanto a alga parda *Sargassum furcatum* e os anfípodes ampitoídeos encontrados nos costões rochosos do Canal de São Sebastião apresentam concentrações mensuráveis de hidrocarbonetos alifáticos (HA) e policíclicos aromáticos (HPA) de origem petrogênica. As algas podem refletir as concentrações destes compostos que estão disponíveis por um curto período de tempo, uma vez que os hidrocarbonetos são hidrofóbicas, se adsorvendo rapidamente a matéria orgânica. Os ampitoídeos, por sua vez, podem acumular estas substâncias por diferentes vias, pelo contato direto ou pelo consumo da alga contaminada, contudo estudos mais detalhados são necessários para entender qual é o tempo de depuração destes hidrocarbonetos tanto na alga como nos anfípodes e qual é a principal via de assimilação dos hidrocarbonetos pelos anfípodes e quais são os efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento nos animais e nas algas e assim poder usá-los em programas de biomonitoramento da poluição por petróleo. Contudo o fato dos anfípodes ter níveis mais altos que as algas sugerem transferência por via trófica.

A identificação de seis espécies de ampitoídeos: *Ampithoe ramondi*, *A. divisura*, *A. marcurzzi*, *Ampithoe sp*., *Cymadusa filosa* e *Sunampithoe pelagica* das quais duas são consideradas novas ocorrências (*A. divisura e A. marcuzzi*) e um espécie nova (*Ampithoe sp*.), indica o potencial dos costões rochosos do Canal de São Sebastião de abrigar uma diversidade grande de anfípodes já que a região é pouco estudada em relação a fauna de anfípodes associada a algas. Porem esta diversidade está ameaçada pela poluição, devido a expansão das atividades portuárias e petrolífera e o crescimento desordenado do município de São Sebastião, adicionalmente trabalhos realizados no Canal já informam sobre níveis moderados de poluição e neste trabalho foi observado bioacumulação nas algas e nos anfípodes.

Não foi observado um padrão único em termos de variação temporal e espacial das espécies de ampitoídeos, isto já foi observado em outros estudos e pode ser resultado da interação de diversos fatores como a história de vida de cada espécie, características estruturais da alga hospedeira, interações entraespecíficas e interespecíficas e adicionalmente relacionadas com a poluição por derivados de petróleo da região que pode ocasionar uma redução nas densidades destas espécies, como sugerido por alguns estudos.

Cymadusa filosa foi à espécie de ampitoídeo mais frequente nos costões rochosos onde sua população foi dominada por jovens e demonstrou desvio da razão sexual a favor das fêmeas, tal fato pode ser explicado pela predação diferencial dos machos o qual apresenta comportamento migratório, devido à reprodução ou por meio de uma maior suscetibilidade deste gênero a presença de hidrocarbonetos na alga. As fêmeas produziram uma grande quantidade de ovos e observou-se uma relação positiva entre o tamanho e o número de ovos produzidos da mesma forma que ocorre com outras espécies de anfípodes, contudo comparando com outras populações de *C. filosa* de diferentes locais observa-se que a fecundidade da população do Canal de São Sebastião é levemente menor, o que também pode está relacionado com os teores de hidrocarbonetos presentes na alga uma vez que tais compostos podem induzir a má formação de ovos como já foi constatado em estudos pretéritos.

O curto período de incubação, o cuidado parental e o rápido desenvolvimento sexual caracterizaram o comportamento reprodutivo de *C. filosa*. Estas caracteristicas somadas aos dados de campo sobre elevada fecundidade, representatividade numérica, sensibilidade expresiva a cobre e naftaleno torna esta espécie uma candidata a uso como organismo- teste para experimentos de ecotoxicidade marinha.

Referências bibliográficas

ABNT. NBR 15308: 2005. Ecotoxicologia aquática -Toxicidade de aguda -Método de ensaio com misidáceos (Crustacea). Rio de Janeiro-RJ.

ABNT. NBR 15470: 2007. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade em sedimento- Método de ensaio com Hyalella spp (Amphipoda). Rio de Janeiro-RJ.

ABNT. NBR 15638: 2008. Qualidade da água – Determinação da toxicidade aguda de sedimentos marinhos ou estuarino com anfípodos. Rio de Janeiro-RJ.

Abessa, D. M. S. & Sousa, E. C. P. M. 2003. Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* to K_2Cr_2O. Brazilian Archives Biology and Technology 46(1): 3-55p.

Alcock, J. 2009. Animal behavior: An Evolutionary Approach. 9thEd. Sinauer Associates. Sunderland: 606p.

Aleixo, L. A .G.; Tachibana, T. I. & Casagrande, D. 2007. Poluição por óleo: formas de introduçãode petróleo e derivados no ambiente. *Revista Integração: Ensino, Pesquisa, Extensão*, 49:159-166p. Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, SP, Brasil. Disponível em ftp://ftp.usjt.br/pub/revint/159_49.pdf

Anderson, J. W.; Neff, J. M.; Cox, B. A.; Tatem, H. E. & Hightower, G. M. 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine

crustaceans and fish. Marine Biology 27: 75–88p.

Appadoo, C. & Myers, A. A. 2003. Observations on the tube-building behavior of the marine amphipod *Cymadusa filosa* Savigny (Crustacea; Ampithoidae). Journal of Natural History 37(18): 2151-2164.

Appadoo, C. & Myers, A. A. 2004. Reproductive bionomics and life history traits of three gammaridean amphipods, *Cymadusa filosa* Savigny, *Ampithoe laxipodus* Appadoo and Myers and *Mallacoota schellenbergi* Ledoyer from the tropical Indian Ocean (Mauritius). Acta Oecologica 26: 227-238.

Arasaki, E.; Muniz, P. & Pires-Vanin, A. S. 2004. A functional analysis of the benthic macrofauna of the São Sebastião Channel (Southeastern Brazil). Marine Ecology 25 (4): 249-263p.

Avaliação e Ações Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade das Zonas Costeira e Marinha 2002. Fundação Bio-Rio, SECTAM/PA, IDEMA/RN, SNE/PB, SMA/SP, FEPAM/RS, MMA, 2002.

Badaró-Pedroso, C. 1999. Avaliação dos efeitos e identificação da toxicidade da água de produção de petróleo sobre algumas espécies marinhas. Tese de Dourado. Universidade de São Paulo, São Carlos-SP.

Baird, D. J.; Maltby, L.; Greig-Smith, P. W. & Douben, P. E. T. (Eds.). 1996. Ecotoxicology: Ecological Dimensions. Chapman and Hall, London.

Barnard, J. L. & Karamam, G. S. 1991. The families and genera of marine Amphipoda (except marine gammaroids). Records of the Australian Museum, Supplement 13, part 1- 2: 1-866.

Barreto, C. C. 1998. Heterogeneidade estrutural de três espécies de macroalgas marinhas bentônicas e estruturação das comunidades fitais associadas. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Baumard P, Budzinsky H, Garrigues P. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Mediterranean Sea. Environmental Toxicology and Chemistry 17:765–776p.

Bícego, M. C. 1988. Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP,

Bícego, M. C.; Zanardi-Lamardo, E. & Weber, R. R. 2008. Distribuição dos hidrocarbonetos *In*: Oceanografia de um ecossistema subtropical: Plataforma de São Sebastião,SP. Pires- Vanin, A. M. S. (Org), São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo: 123-140.

Bishop, P. L. 1983. Marine pollution and its control. McGraw-Hill Book Company. 387 p.

Bonsdorff, E.; Bakke, T. & Pedersen, A. 1990. Colonization of amphipods and polychaetes to sediments experimentally exposed to oil hydrocarbons. Marine Pollution Bulletin 21(7): 355-358p.

Borowsky, B. 1983a. Reproductive behavior of three tube-building peracarid crustaceans: the amphipods *Jassa falcata* and *Ampithoe valida* and the tanaid *Tanais cavolinii*. Marine Biology 77: 257-263.

Borowsky, B. 1983b. Behaviors associated with tube-Sharing in *Microdeutopus gryllotalpa* (Costa) (Crustacea: Amphipoda). Journal of Experimental Marine biology and Ecology 68: 39-51.

Borowsky, B. 1984. The use of the males' gnathopods during precopulation in some gammaridean amphipods. Crustaceana 47(3): 245-250p.

Borowsky, B. 1986. Laboratory observations of the pattern of reproduction of *Elasmopus levis* (Crustacea: Amphipoda). Marine Behaviour Physiology (12): 245-256p.

Borowsky B. 1990. Patterns of reproduction of some amphipod crustaceans and insights into the nature of their stimuli. *In* RT Bauer, JW Martin, eds. Crustacean sexual biology. New York: Columbia Univ. Press: 33-49p.

Borowsky, P. B.; Aitken-Ander, P. & Tanacredi, J. T. 1997. Changes in reproductive morphology and physiology observed in the amphipod crustacean, *Melita nitida* Smith, maintained in the laboratory on polluted estuarine sediments. Journal of Experimental Marine biology and Ecology 214: 85-95p.

Borowsky, B. & Borowsky, R. 1987. The reproductive behaviors of the amphipod crustacean *Gammarus palustris* (Bousfield) and some insights into the nature of their stimuli. Journal of Experimental Marine biology and Ecology 107: 131-144p.

Bouloubassi, I.; Lipiatou, E.; Saliot, A.; Tolosa, I.; Bayona, J.M. & Albaigés, J. 1997. Carbon sources and cycle in the western Mediterranean – the use of molecular markers to determine the origin of organic matter. Deep-Sea Research II, 44 (3-4): 781-799p.

Brawley, S. H. & W. H. Adey. 1981. The effect of micrograzers on algal community structure in a coral reef microcosm. Marine Biology 61: 167-177p.

Brawley, S. H. 1992. Mesoherbivores. *In*: Plant-animal interactions in the marine benthos. John, D. M.; Hawkins, S. J.; Prince, J.H. (eds). Clarendon Press, Oxford: 235-263p.

Brasil, Ministério da Marinha. 1993. Roteiro costa sul. Diretoria de Hidrografia e Navegação. Rio de Janeiro, 170 p.

Brendolan, R. A. & Gomes A. S. 2003. Uso do psamobentos em estudos de ecotoxicologia marinha no Brasil: Revisão BIBLIOGRÁFICA com ênfase em substâncias de petróleo In: 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás. Rio de Janeiro, RJ.

Burton, G. A.; Chadwick, B.; Rosen, G. & Greenberg M. 2011. Sediment Ecosystem Assessment Protocol (SEAP): An Accurate and Integrated Weight-of-Evidence Based System SERDP Project ER-1550. Disponível: http://www.serdp.org/Program-Areas/Environmental-Restoration/Contaminated-Sediments/ER-1550/ER-155

Cairns, J. & Buikema, A. L. 1982. Restoration of habitats impacted by oil spills. London: Butter Worth: 182p.

Calow, P. 1996. Ecology in ecotoxicology: Some possible 'rules of thumb' *In*: Baird, D.J., Maltby, L., Greig-Smith, P.W., Douben, P.E.T. (Eds.), Ecotoxicology: Ecological Dimensions. Chapman and Hall, London: 5–12p.

Cardoso, R. S. & Veloso V. G. 1996. Embryonic development and reproductive strategy of *Pseudorchestoidea brasiliensis* (Amphipoda: Talitridae) at Prainha Beach, Brazil. Journal of Natural History 35: 201–211p.

Castro, B. M.; Miranda, L. B.; Silva, L. S.; Fontes, R. F. C.; Pereira, A. F. & Coelho A. L. 2008. Processos físicos: hidrografia, circulação e transporte, *In*: Oceanografia de um sistema subtropical: Plataforma de São Sebastião, SP. Org. Pires-Vanin, A. M. Editora da Universidade de São Paulo, 59-122p.

Cesar, A.; Marín; A.; Marín-Guirao, L. & Vita, R. 2004. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: The case of Portmán Bay. Scientia Marina 68 (1): 205-213p.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) 1990. Implementação de testes de toxicidade no controle de líquidos efluentes. Séries Manuais, São Paulo.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental); Norma técnica L5.021: 1992, Água do mar – teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* Silva,1979 (Crustacea: Mysidacea), São Paulo.

Chapman, P. M. & Long, E. R. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to

marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin* 14(3):81-84p.

Chapman, P. M. 1995. Ecotoxicology and pollution-key issues. Marine Pollution Bulletin, 31: 167–177p.

Clark, R. B.; Frid, C. & Atrill, M. 1997. Marine Pollution. 4th ed. New York: Clarendon Press - Oxford.

Clarke, K. R. & Warwick, R. M. 2001. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation. 2nd ed. PRIMER E Limited. Plymouth, UK.

Colan, K. L. 1982. Revision of the gammaridean amphipod family Ampithoidae using numerical analytical methods. Canadian Journal of Zoology 60: 2015-2027p.

Colombo, J. C.; Barreda, A.; Bilos, C.; CappellettI, N.; Demichelis, S.; Lombardi, P.; Mogoya, M. C.; Skorupka, C. & Surez, G. 2005. Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. Environmental Pollution 134:.277-289p.

Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R. & Epindola, E. L. G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova 31(7): 1820-1830p.

Crespo, P. M. O. & Yusty, I. M. A. 2004. Determination of aliphatic hydrocarbons in algae *Himanthalia elongate*. Ecotoxicology and Environmental *Safety* 57: 226-230.

Cruz-Riviera, E. & Hay, M. E. 2001. Macroalgal traits and the feeding and fitness of an herbivorous amphipod: the roles of selectivity, mixing, and compensation. Marine Ecology Progress Series 218: 249-266p.

Curvêlo, R. 1998. **A** meiofauna vágil associada a *Sargassum cymosum* C. Agardh, na praia do Lázaro, Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Davis, T. A.; Volesky, B. & Mucci, A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosortion by brown algae. Water Research 37: 4311-4330p.

Dauvin, J. C. & Gentil, F. 1990. Conditions of the peracarid populations of subtidal communities in northern Britain ten years after the Amoco Cadiz oil spill. Marine Pollution Bulletin 21(3): 123-130p.

Denadai, M. R. 2001. Moluscos de praias arenosas do Canal de São Sebastião, SP. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP.

Dias, N. & Sprung, M. 2003. Population dynamics of the amphipod *Orchestia gammarellus* (Talitridade) in a Rio Formosa saltmarsh (Southern Portugal). Crustaceana 76 (9): 1124-1141p.

Dick, J. T. A.; Faloon, S. E. & Elwood, R. W. 1998. Active brood care in an amphipod: influences of embryonic development, temperature and oxygen. Animal Behaviour 56 (3): 663-672p.

Dick, J. T. A.; Bailey, R. J. E. & Elwood, R. W. 2002. Maternal care in the rockpool amphipod

Apherusa jurinei: developmental and environmental cues. Animal Behaviour 63**:** 707–713p

Dubiaski-Silva, J. 1999. O fital de *Sargassum cymosum* C. Agardh, 1820 (Phaeophyta - Fucales) e seu papel na dieta de peixes e braquiúros na ponta das Garoupas, Bombinhas, Santa Catarina. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.

Edgar, G. J. 1983.The ecology of south-east Tasmanian phytal animal communities. II. Seasonal change in plant and animal populations. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 70: 159-179p.

Eganhouse, R. P. & Calder, J. A. 1976. The solubility of medium molecular weight aromatic hydrocarbons and the effects of hydrocarbon co-solutes and salinity. Geochimica et Cosmochimica Acta 40: 555-561p.

Environment Protection Agency - EPA 1986. Quality criteria for water 1986. EPA 440/5-86-001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Esteves, J. P.; Valdman E. & Leite, S. G. F. 2000. Repeated removal of cadmium and zinc from an industrial effluent by waste biomass *Sargassum* sp. Biotechnology Letters 22**:** 499–502p.

Eston, V. R.; Migoto, A. E.; Oliveira-Filho, E. C.; Rodrigues, S. A. & Freitas, J. C. 1986. Vertical distribution of benthic marine organisms on rocky coasts of Fernando de Noronha Archipelago (Brazil). Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo 34:. 37-53p.

Eston, V. R. & Bussab, W. O. 1990. An experimental analysis of ecological dominance in a rocky subtidal macroalgal community. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 136: 170-195p.

Evans, D. R. & Rice, S. D. 1974. Effects of oil on marine ecosystems: a review for administrators and policy makers. Fisheries Bulletin 72(3): 625-638p.

Farrington, J. W.; Frew, N.M.; Geshwend, P.M. & Tripp, R.W. 1977. Hydrocarbons in cores of northwestern Atlantic coastal and continental margin sediments. Estuarine and Coastal Marine Science 5: 793-808p.

Ferreira, D. R. J. 2008. Fauna de anfípodes associada à *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh, 1872, em duas Praias do litoral norte do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Instuto Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

Filho, G. M. F.; Andrande, L. R.; Karez, C. S.; Farina, M. & Pfeiffer, W. C. 1999. Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd at Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. Marine Environnmental Research 48:213-224p.

Fisher, R. A. 1930. The general theory of natural selection. 2nd rev. (ed), Doven, New York, USA, 291p.

Ford A. T.; Fernandes, T. F.; Rider, S. A.; Read, P. A.; Robinson, C.D. & Davies, I. M. 2003. Measuring sublethal impacts of pollution on reproductive output of marine Crustacea. Marine Ecology Progress Series 265: 303-309p.

FUNDESPA 2009. Avaliação da biota aquática, consolidação de dados secundários e modelagem hidrodinâmica para subsidiar o licenciamento da expansão do Porto em São Sebastião. 243p.

Gable, M.F. & R.A. Crooker. 1977. The salt marsh amphipod *Gammarus palustris* Bousfield, 1969 at the northern limit of its distribution. I. Ecology and life cycle. Estuarine, Coastal and Shelf Science, Amsterdam, **5** (1): 123-134p.

Gerlach, S. A. 1976. Marine Pollution: diagnosis and therapy. Berlin: Springer Verlag,

Giordano, F. 1986. Ouriços do sublitoral rochoso da região de São Sebastião, São Paulo - uma abordagem ecológica. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

Godoi, A.F.L.; Favoreto, R.; Santiago-Silva, M. 2003. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. Química Nova 26: 708-716p

Gómez Gesteira, J. L. & Dauvin, J. C. 2000. Amphipods are good bioindicators of the impact of oil spills on soft-bottom macrobenthic communities. Marine Pollution Bulletin 40 (11): 1027-2000p.

Guerra-García, J. M., Gonzáles-Vila, F. J. & García-Gómez, J. C. 2003. Aliphatic hydrocarbon pollution and macrobenthic assembalges in Ceuta harbour: a multivariate approach. Marine Ecology Progress Series 263: 127-138p.

Grimmer, G.; Jacob, J. & Naujack, K.W. 1983. Profile of the polycyclic aromatic compounds from

crude oils-inventory by GC GC/MS.PAH in environmental materials: part 3. Fresenius Zeitschrift fuer Analytische Chemie 316: 29–36p.

Gunnill, F. C. 1985. Growth, morphology and microherbivore faunas of *Pelvetia fastigiata* (Phaeophyta, Fucaceae) at La Jolla, California, USA. Botanical Marina 28: 187-199p.

Guth, A. Z. & Leite, F. P. P. 1998. Anfípodos associados à alga parda *Sargassum* sp. de praias com difente hidrodinamismo, no litoral norte do Estado de São Paulo *In*: XXII Congresso Brasileiro de Zoologia, UFPE. SBZ, Recife.

Guth, A. Z. 2004. A comunidade fital: Variação espacial e nictemeral da epifauna, especialmente anfípodos, associada à alga parda *Sargassum* spp. em quatro praias de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Hamilton, M. A., Russo, R. C. & Thurston, R. V. 1977. Trimmed SpearmanKarber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science and Technology 11:714-719p.

Hartnoll, R. G. 1982. Growth. *In* D. E. Bliss (ed). The biology of Crustacean, Embryology, Morphology, and Genetics. New York: Academic Press Inc 11-116p.

Hay, M. E. & Duffy, E. J. 1990. Host-plant specialization decreases predation on a marine amphipod: an herbivore in plant's clothing. Ecology 71 (2): 733-743p.

Hokstad, J. N.; DALING, P. S.; Buffagnià, M. & Johnsen, S. 1999. Chemical and ecotoxicological characterisation of oil -water systems. Spill Science & Technology Bulletin 5 (1): 75-80p.

Hellou, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. Environmental Science and Pollution Research 18:1–11p.

Ihara, P. M.; G. L. L. Pinho & Fillmann, G. 2010. Avaliação do Copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como organismo-teste para ensaios de toxicidade crônica. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology 5 (1): 27-32p.

IMW – International Mussel Watch Committee 1995. International Mussel Watch Project: Initial Implementation Phase, final report, Farrington, J. W.; Tripp, B. W. (eds). Woods Hole. Oceanographic Institution, Coastal Research Center, Woods Hole, MA.

IPEICA, 2000. Biological impacts of oil pollution: rock shores. Report series 7: 24p.

IPEICA, 2008. Oil spill preparedness and response. Report series summary: 48p.

ITOPF, 2005. Historical data-Statistics. Disponível em: http://www.itopf.com/stats.html.

ITOPF, 2011. New horizon? Dealing with Major Oil Spill from Non-Tanker Soucer. Disponível em: www.iotpf.com.information-services/publications/papers/documents/PAJA2011_000pdf.

ITOPF, 2011/12. Hanboock.

Jacobucci, G. B. 2000. Distribuição vertical e flutuação sazonal da macrofauna vágil associada a *Sargassum cymosum* C. Agardh, em uma praia do litoral norte do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Jacobucci, G. B. 2005. Interações *Sargassum*-epífitas-anfípodes herbívoros na região de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Jacobucci, G. B. & Leite, F. P. P. 2006. Biologia populacional das espécies de Ampithoidae (Crustacea,Amphipoda) associadas a *Sargassum filipendula* (Phaeophyta, Fucales) na Praia da Fortaleza, Ubatuba, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 23 (4): 1207–1216p.

Jacobucci, G. B. ; Güth, A. Z. & Leite, F. P. P. 2008. Experimental evaluation of amphipod grazing over biomass of *Sargassum filipendula* (Phaeophyta) and its dominant epiphyte. Nauplius 16 (2): 65-71p.

Jacobucci, G. B. ; Güth, A. Z. ; Turra, A. & Leite, F. P. P. 2010. Influence of a narrow depth gradiente and season on the morphology, phenology, epibiosis of the brown alga *Sargassum cymosum*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom: 1-10p.

Jacobucci, G. B. & Leite, F. P. P. 2008. Effect of temporal variation and size of herbivorous amphipods on consumption levels of *Sargassum filipendula* (Phaeophyta) and their main epiphyte, *Hypnea musciformis.* Neotropical Biology and Conservation 3(2): 78-85p.

Kleine, T.; Tornelli, T. S.; Oliveira, T. M. N.; Vaz, C.; Bohn, R. F. S.; Matias, W. G. & Pinto, C. R. S. C. 2010. Taxa de natalidade e sensibilidade do cultivo do microcrustáceo Mysidopsis juniae (Silva, 1979) para ensaios de toxicidade crônica em ambiente marinho *In*: XIII Simpósio de Biologia Marinha, Santos –SP.

Kelly, J. R.; Rudnick, D. T.; Morton, R. D.; Buttel, L. A., Levine, S. N. & Carr, K. A. 1990. Tributyltin and invertebrates of seagrass ecosystem: exposure and response of different species. Marine Environmental Reseaech 29: 245-276p.

Krang, A. S. 2007. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). Aquatic Toxicology 85: 9-18p.

Krang, A. S. & Ekerholm, M. 2006. Copper reduced mating behaviour in male shore crabs (Carcinus maenas (L.)). Aquatic Toxicology 80 (1): 60-69p.

Kirso, U. & Irha, N. 1998. Role of Algae of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 41:83-89p.

Knutzen, J. & Sortland, B. 1982. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in some algae and invertebrates from moderately polluted parts of the Coast of Norway. Water Research, 16(4): 421-428p.

Landrum, P. F.; Lotufo, G. R.; Gossiaux, D. C.; Gedeon, M. L. & Lee, J. H. 2003. Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod *Diporeia* spp.: additional evidence to support

toxicity additivity for PAH mixtures. Chemosphere 51: 481–489p.

Laquia, V. D. 2006. Estrutura de comunidade de algas marinhas bêntônicas no Canal de São Sebastião, SP e presença dos hidrocarbonetos de petróleo.Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, SP.

LeCroy, Sara E. 2002. An Illustrated Identification Guide to the Nearshore Marine and Estuarine Amphipoda of Florida, Volume 2: Families Ampeliscidae, Amphilochidae, Ampithoidae, Aoridae, Argissidae and Haustoriidae. Ocean Springs, Mississipi USA: 251p.

Lee, W. Y. & Nicol, J. A. C. 1978a. The effect of naphthalene on survival and activity of the amphipod *Parhyale*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 20: 233-240p.

Lee, W. Y. & Nicol, J. A. C. 1978b. Individual and combined toxicity of some petroleum aromatics to the marine amphipod Elasmopus pectenicrus. Marine Biology 48: 215–222p.

Le Dréau, T.; Jacquot, F.; Doumenq, P.; Guiliano, P.; Bertrand, J.C. & Mille, G., 1997. Hydrocarbon balance of a site which had been highly and chronically contaminated by petroleum wasres of a refinery from 1956 to 1992. Marine Pollution Bulletin 34: 456-468p.

Leite, F. P. P. 1996a. Crescimento e reprodução de *Hyale media* Dana (Amphipoda, Gammaridae, Hyalidae) associada à *Sargassum cymosum* C. Agardh. Revista Brasileira de Zoologia 13(3): 597-606p.

Leite, F. P. P. 1996b. Fecundidade de sete espécies de anfípodes gamarídeos associados à alga *Sargassum cymosum* C. Agardh do litoral norte do Estado de São Paulo. Iheringia. Série Zoologia, BRASIL, 80: 39-45p

Leite, F. P. P. 2011. Amphipoda *In*: Biodiversidade e Ecossistemas Bentônicos Marinhos do Litoral Norte de São Paulo Susteste do Brasil: Antonia Cecília Zacagnini Amaral & Silvana Aparecida Henrique Nallin Org.Campinas, SP, Unicamp/IB: 171-181p. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000812694&opt=1

Leite, F. P. P.; Jacobucci, G. B. & Güth, A. Z. 2000. Temporal comparison of gammaridean amphipods of *Sargassum cymosum* on two rocky shores in southeastern Brazil. Nauplius 8(2): 227-236p.

Leite, F. P. P.*;* Siqueira. S. G. L.; Oliveira, D. A.; Hoff, C.; Requel, A. C.; Brumatt, P. N. & Corbo, M. C. 2011. Peracáridos dos substrátos biológicos de costões rochosos *In*: Biodiversidade e Ecossistemas Bentônicos Marinhos do Litoral Norte de São Paulo Susteste do Brasil: Antonia Cecília Zacagnini Amaral & Silvana Aparecida Henrique Nallin Org.Campinas, SP, Unicamp/IB: 327-333p. Disponivel em: http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000812694&opt=1

Leite, F. P. P.; Tanaka, M. O. & Gebara, R. S. 2007. Structural variation of the brown alga Sargassum cymosum and its effects on associated amphipod assemblages. Brazilian Journal of Biology 67(2): 215-221p.

Leite, F. P .P.; Turra, A. & Souza, E. C. F. 2003. Population biology and distribution of the tanaid *Kalliapseudes schubarti* Mañé-Garzon, 1949, in an intertidal flat in southeastern Brazil. Brazilian

Journal of Biology, São Carlos, 63 (3): 469-479.

Leite, F. P. P & Wakabara, Y. 1989. Aspects of marsupial and post- marsupial development of *Hyale media* (Dana) 1853 (Hyalidae, Amphipoda). Bulletin of Marine Science 45 (1): 85-97p.

Lima, L. H. 2002. Comunidades associadas a duas espécies de Sargassum no Canal de São Sebastião, SP - Fatores determinantes. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP.

Lytle, J. S.; Lytle, T. F.; Gearing, J. N.; Gearing, P. J. 1979. Hydrocarbons in benthic algae from the eastern Gulf of Mexico. Marine Biology 51**(3)**: 279 – 288.

MacLeod, W.D.; Brown, D.W.; Friedman, A.J.; Burrows, D.G.; Maynes, O.; Pearce, R.W.; Pearce, R.W.; Wigren, C.A. & Bogar, R.G., 1985. Standard Analytical Procedures of the NOAA National Analytical Facility, 1985-1986. Extractable Toxic Organic Components. Second edition, U. S. Department of Commerce, NOAA/NMFS. NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-92, 121p.

Maranho L. A.; Abreu, I.; Santelli, R.; Cordeiro, R. C.; Soares-Gomes, A.; Moreira, L. B.; Morais, R. D. & Abessa, D. M. S. 2009. Sediment toxicity assessment of Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Coastal Research Special 56: 851-855p.

Marques, A. N. J. R.; Moraes, R. B. C. & Maurat, M. C. 2002. Poluição Marinha. *In*: Pereira, R. C.; Soares-Gomes, A. (eds.) Biologia Marinha. Rio de Janeiro: Interciência.

Marques, B. F. 2008. Avaliação da Toxicidade Aguda de Organoestânicos sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* Silva, 1979. Monografia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Martin-Smith, K. M. 1993. Abundance of mobile epifauna: the role of habitat complexity and predation by fishes. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 23: 135-150p.

Maurat, M. C. S.1996. Efeito crônico do óleo bruto, de dispersante de petróleo e da mistura óleo/dispersante na espécie *Champia parvula* (C. Agardh) Harvey - macroalga. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

Medeiros, P. M. 2000. Avaliação da origem de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos de Santos e São Sebastião, utilizando-se hidrocarbonetos marcadores geoquímicos. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

Medeiros, P. M. & Bícego, M. C. 2004. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers II São Sebastião, SP-Brazil. Marine Pollution Bulletin 49: 892-899p.

Meire, R. O.; Azeredo, A. & Torres J. P. M. 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos Oecologia Brasileira 11 (2): 188-201p.

Milanelli, J. C. C. 1994. Efeitos do petróleo e da limpeza por jateamento em um costão rochoso da praia de Barequeçaba, São Sebastião, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Milanelli, J. C. C. 2003. Biomonitoramento de costões rochosos no Canal de São Sebastião: instrumento para avaliação de impactos ambientais gerados por derrames de petróleo. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Montone, R. C., Taniguchi, S., Sericano, J., Weber, R. R. & Lara, W. H. 2001. Determintion of polychlorinated biphenyis in Antarctic macroalgae *Desmarestia* sp. Science of the Total Environment 277: 181-186p.

Mukai, H. 1971. The phytal animals on the thalli of *Sargassum serratifolium* in the *Sargassum* region, with reference to their seasonal fluctuations. Marine Biology 8: 170-182p.

Nassar, C. A. G.; Lavrado, H. P. & Yoneshigue-Valentin, Y. 2002. Effects of iron-ore particles on propagule release, growth and photosynthetic performance of *Sargassum vulgare* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales). Revista Brasileira de Botânica 25 (4): 459-468p.

Nelson, W. G. 1979. Experimental study of selective predation on amphipods: consequences for amphipod distribution and abundance. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 38: 225-245p.

Nikitik, C. C. S. & Robinson, A. W. 2003. Patterns in benthic populations in the Milford haven waterway following the “Sea Empress” oil spill with special reference to amphipods. Marine Pollution Bulletin 46: 1125-1141p.

Nipper, M. G.; Badaró-Pedroso, C.; Jose, V. F. & Melo, S. L. R. 1993. Toxicity Testing with Coastal

Species of Southeastern Brazil, Mysids and Copepods. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 51: 99-106p.

Norton, T. A. & Benson, M. R. 1983. Ecological interactions between the brown seaweed *Sargassum muticum* and its associated fauna. Marine Biology 75: 169-177p.

NRC (National Research Council). 1985. Oil in the sea, inputs, fates and effects. Washington. D.C., National Academy Press. 602p.

Ohji, M.; Takeuchi, I.; Takahashi, S.; Tanabe, S. & Miyazaki, N. 2002. Differences in the acute toxicities of tributyltin between the Caprellidea and the Gammaridea (Crustacea: Amphipoda). Marine Pollution Bulletin 44: 16-24p.

Ortiz, M. 1978. Invertebrates marinos bentósicos de Cuba. I. Crustacea Amphipoda. Gammaridea. Ciencias, Serie 8. Investigaciones Marinas 38:3-10p.

Ottway, S. 1971. The comparative toxicities of crude oils. In: COWELL, E. B. (ed.) Ecological effects of oil on littoral communities. Applied Science Publishers.

Pastorinho, M. R.; Telfer,T. C. & Soares, A. M. V. M. 2009. Amphipod susceptibility to metals: Cautionary tales. Chemosphere 75: 1423-1428p.

Paula, E. J.; Oliveira-Filho, E. C. 1980. Phenology of two populations of *Sargassum cymosum* (Phaeophyta - Fucales) of São Paulo State coast, Brazil. Boletim de Botânica 8: 21-39p.

Paula, E. J.& Eston, V. R. 1897. Are there other *Sargassum* species potentially as invasive as *S. muticum*? Botanica Marina 30 (5): 405-410.

Peart, R. A. 2004. A revision of the *Cymadusa filosa* complex (Crustacea: Amphipoda: Corophioidea: Ampithoidae). Journal of Natural History 38: 301-336p.

Peart, R. A. 2007. A review of the Australian species of *Ampithoe* Leach, 1814 (Crustacea: Amphipoda: Ampithoidae) with descriptions of seventeen new species. Zootaxa 1566: 95p

Pease, C. J.; Johnston, E. L. & Poore, A.G. B. 2010. Genetic variability in tolerance to copper contamination in a herbivorous marine invertebrate. Aquatic Toxicology 99(1):10-16p.

Pereira, C. D. S.,Abessa,D.M.T, Bainy A.C.D, Zaroni,L.P., Gasparro, M.R., Bícego, M.C., Taniguchi, S., Furley. T.H.& Sousa, E. C. P. 2007. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. Environmental Toxicology and Chemistry 26 (3): 462–469p.

Pereira, C. D. S; Martim-Diaz, M. L; Catharino, M. G.; Cesar, A.; Choueri, R. B.; Tanigushi, S.; Abessa, D. M. S.; Bícego, M. C.; Vasconcelos, M. B. A.; Bainy, A. C. D.; Sousa, E. C. P. M.; Del Valls, T.A. 2010. Chronic contamination assessment integrating biomarkers responses in transplanted mussels – A seasonal monitoring. Environmental Toxicology. 14th International Symposium on Toxicity Assessment.

Pereira, C. D. S.; Martin-Díaz, M.L.; Zanette, J.; Cesar A.; Choueri, R.B.; Abessa, D.M.; Catharino,

M.G.; Vasconcellos, M. B.; Bainy, A. C.; Sousa, E. C. P. M. & Del Valls, T. A. 2011. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). Ecotoxicology and Environmental Safety 74 (5):1257-1264p.

Philp, R.P. 1985. Fossil fuel biomarkers. Methods in Geochemistry and Geophysics, 23. Elsevier, New York. N.Y. 292p.

Pires-Vanin, A. M. S 2008. Megafauna e macrofauna *In*: Oceanografia de um ecossistema subtropical: Plataforma de São Sebastião,SP. Pires- Vanin, A. M. S. (Org), São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo: 311- 350p.

Poore, A. G. B.; Hill, N. A. & Sotka, E. E. 2008. Phylogenetic and geographic variation in host breadth and composition by herbivorous amphipods in the family Ampithoidae. Evolution 62(1): 21–38p.

Prenter, J.; Elwood, R. W. & Taylor, P. W. 2006. Self-assessment by males during energetically costly contests over precopula females in amphipods. Animal Behaviour 72: 861-868p.

Quinn, G. P. & Keough, M. J., 2002. Experimental Deign and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Readman, J.W.; Fillmann, G.; Tolosa, I.; Bartocci, J.; Villeneuve, J.P.; Catinni, C. & Mee, L.D., 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. Marine Pollutin Bulletin 44: 414-429p.

Reish, D. J. 1993. Effects of metal and organic compounds an survival and bioaccumulation in two

species of marine gammaridean amphipod, together with a summary of toxicological research on this group. Journal of Natural History 27: 781-794p.

Reynier, M. V. 1996. Aspectos do ciclo de vida *Mysidium gracile* (Dana, 1852)(Crustacea-Mysidacea) e um estudo a sua adequação para testes de toxicidade com hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado,Universidade de São Paulo, São Carlos –SP.

Rocha, R. M. 1988. Ascídias coloniais do Canal de São Sebastião. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

Roberts, D. A.; Poore, A.G. B. & Johnston, E. L. 2006. Ecological consequences of copper contamination in macroalgae: effects on epifauna and associated herbivores. Environmental Toxicology and Chemistry 25 (9): 2470-2479p.

Roberts, D. A.; Johnston, E. L. & Poore, A.G. B. 2008a. Biomonitors and the assessment of ecological impacts: distribution of herbivorous epifauna in contaminated macroalgal beds. Environmental Pollution, 156(2): 489-503.

Roberts, D. A.; Johnston, E. L. & Poore, A.G. B. 2008b. Contamination of marine biogenic habitats and effects upon associated epifauna. Marine Pollution bulletin 56:1057-1065.

Ruffo, S. 1954. Nuovi anfipoda racoti nel Venezuela dal Prof. G. Marcuzzi. Memorie del Museo Civico di Storia Naturale, Verona 4: 117-125p.

Sainte-Marie, B. 1991. A review of the productive bionomics of aquatic gammaridean amphipods: variation of life history traits with latitude, depth, salinity and superfamily. Hydrobiologia 223: 189-227p.

Sant´anna, B. S. 2011. Assimilação, depuração e contaminação do ermitão *Clibanarius vittatus* pelo poluente tributilestanho (TBT) e sua relação com a intersexualidade em ermitões. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Rio Claro, SP.

Sanders, H. L.; Grassle, J. F.; Hampson, G. R.; Morse, L. S.; Garner-Price, S. & Jones, C. C. 1980. Anatomy of an oil spill: long-term effects from the grounding of the Barge Florida off West Falmouth, Massachusetts. Journal of Marine Research 38(2): 265-280p.

Santos, T. C. C, & Câmara, J. B. D. 2002. Geo Brasil 2002: Perspectivas do meio ambiente no Brasil. Brasília: IBAMA: 447p.

Santos, K. C. & Pires-Vanin, A. M. S. 2002. Ecology and distribution of Peracarida (Crustacea) in the continental shelf of São Paulo (SP), with emphasis on the amphipod community. Nauplius 8 (1): 35-53p.

SÃO PAULO. Decreto n°49.215, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Zoneamento Ecológico-Econômico do Setor do Litoral Norte, prevê usos e atividades para as diferentes zonas, estabelece diretrizes, metas ambientais e sócio-econômicas e dá outras providências, nos termos etabelecidos pela Lei n°10.019, de 3 de julho de 1998. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, dezembro de 2004.

Sastry, A. N. 1983. Ecological aspects of reproduction,.*In*: Vernberg, FJ & W.B.Vernberg (Eds.). The Biology of Crustacea: Enviromental adaptations. Vol.8. Academic Press, New York:179-270p.

Secretaria do Meio Ambiente (SMA), 2006. -. Emissários submarinos:projeto, avaliação de impacto ambientale monitoramento = Submarine outfalls : design, compliance and environmental monitoring / Editores: Cláudia Condé Lamparelli & Jayme Pinto Ortiz. São Paulo (Estado). Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes-/-relatorios.

Seriani, R.; Abessa, D. M. S.; Romano, P.; Pinna, P. V.; Magni, C. & Silveira, F. L. 2008. Using bioassays and benthic community to evaluate the sediment quality at the estuary of Itanhaém river, SP, Brazil. O Mundo da Saúde 32(3): 294-301p.

Serejo, C. S. & Licínio, M. V. S 2002. The genus *Ampithoe* (Crustacea, Amphipoda, Ampithoidae) from the Brazilian coast. Arquivos do Museu Nacional, Brasil, Rio de Janeiro 60: 41-50p.

Shafir, S., Van Rjin, J., Rinkevich, B., 2003. The use of coral nubbins in coral reef ecotoxicology testing. Biomolecular Engineering. 20: 401–406.

Sheader, M. & Chia, F. 1970. Development, fecundity and brooding behaviour of the amphipod, *Marinogammarus obtusatus*. Journal Marine Biology Association of the United Kingdom 50: 1079 – 1099p.

Sheader, M. 1996. Factors influencing egg size in the gammarid amphipod *Gammarus insensibilis*. Marine Biology 124: 519-526p.

Silva, L. S. 1995. Condições oceanográficas no Canal de São Sebastião e na região costeira adjacente: Variações sazonais entre fevereiro de 1994 a março de 1995. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

Silva, D. A. M. & Bícego, M. C. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum biomarkers in São Sebastião Channel, Brazil: Assessment of petroleum contamination. Marine Environmental Research 69: 277-286p.

Silva-Castiglioni, D.; Garcia-Schroeder, D.; Barcelos, D. F.; & Bond-Buckup, G. 2007. Intermolt duration and postembryonic growth of two sympatric species of *Hyalella* (Amphipoda, Dogielinotidae) in laboratory conditions. Nauplius 15(2): 57-64p.

Simoneit, B. R. T. 1993. Hydrotermal alteration of organic matter in marine and terrestrial systems. *In*: Organic Geochemistry – Principles and Applications (M. H. Engel and S. A. Macko, eds.), Topics in Geobiology 11, Plenum Press, New York: 397-418p.

Singer, M. M.; Aurand, D.; Bragin, G. E.; Clark, J. R.; Coelho, G. M.; Sowby, M. L. & Tjeerdema, R. S.. 2000. Standardization of thepreparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. Marine Pollution Bulletin 40: 1007–1016p.

Siqueira, S. G. L. 2007. Biologia populacional e fecundidade do endobionte *Leucothoe* sp. (Crustacea, Amphipoda, Leucothoidae) associado a *Phallusia nigra* (Chordata, Tunicata) do Canal de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Siqueira, S. G. L.; Peixoto, P. E. C.; Leite, F. P. P. 2008. A influência do tamanho corporal e da residência prévia nas interações agonísticas entre machos de *Cymadusa filosa* (Crustacea, Amphipoda, Ampithoidae). *In*: XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, Curitiba-PR.

Soliman, Y.S. & Wade, T.L. 2008. Estimates of PAHs burdens in a population of ampeliscid amphipods at the head of the Mississipi Canyon (N. Gulf of Mexico**).** Deep-Sea Research II (55): 2577-2584p.

Souza Filho, J. F. 2007. Amphipoda (Crustacea: Peracarida) da plataforma continental e bancos oceânicos da região nordeste do BRASIL: Programa REVIZEE – NE III E IV. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

Steele, D.H. & V.J. Steele. 1975. The biology of *Gammarus* (Crustacea, Amphipoda) in the northwestern Atlantic. XI. Comparison and discussion. Canadian Journal of Zoology, Ottawa, 53: 1116-1126p.

Steinhauer, M. S. & Boehm, P.D. 1992. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediment, river sediments, and coastal peat of the Alaskan Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbon inputs. Marine Environmental Research 33: 223-253p.

Széchy, M. T. M. & Paula, E. J. 2000. Padrões estruturais quantitativos em bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 23(2): 121-132p.

Takeuchi, I.; Takahashi, S.; Tanabe, S. & Miyazaki, M. 2001. *Caprella* watch: a new approach for monitoring butyltin residues in the ocean. Marine Environmental Research 52: 97-113p.

Tanaka, M. O. & Leite, F. P. P. 2003. Spatial scaling in the distribution of macrofauna associated with Sargassum stenophyllum (Mertens) Martius: analyses of faunal groups, gammarid life habits, and assemblage structure. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 293(1): 1-22p.

Taniguchi, S. 2002. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e organoclorados em diferentes compartimentos do ambiente marinho do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Instituto de Química - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Tararam, A. S. & Wakabara, Y. 1981. The mobile fauna-especially Gammaridea of *Sargassum cymosum*. Marine Ecology Progress Series 5: 157-163p.

Thiel, M. 1999. Duration of extended parental care in marine amphipods. Journal of Crustacean Biology 19 (1): 60-71p.

Thiel, M. 2000. Population and reproductive biology of two sibling amphipod species from ascidians and sponges. Marine Biology 137: 661-674p.

Thomas, J. D. 1993. Biological monitoring and tropical diversity in marine environments: a critique with recommendations, and comments on the use of amphipods as bioindicators. Journal of Natural History 27: 795-806p.

Torres, M. A.; Barros, M. P.; Campos, S. C. G.; Pinto, E.; Rajamani; Sayre, R. T. & Colepicolo, P. 2008. Biochimical biomarkers in algae and marine pollution: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety 71:1-15p.

Tsoi, K. & Chu, K. 2005. Sexual Dimorphism and Reproduction of the Amphipod *Hyale crassicornis* Haswell (Gammaridea: Hyalidae). Zoological Studies 44(3): 382-392p.

Tsvetnenko, Y. & Evans, L. 2002. Improved approaches to ecotoxicity testing of petroleum products Marine Pollution Bulletin 45: 148–156p.

United Nations Environment Programme (UNEP) 1990. Contaminant monitoring programmes using marine organisms: quality assurance and good laboratory practice. Reference methods for marine pollution studies n^{o} 57.

Underwood, A. J. 1997. Experiments in ecology: They logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Underwood, A. J.& Peterson, C. H. 1988. Towards an ecological framework for investigating pollution. Marine Ecology Progress Series 46: 227-234p.

Valério-Berardo, M. T. & Domingos, R. F. 2008. Avaliação da eficiência da espécie *Apohyale media* (Crustacea: Amphipoda) como bioindicador em ensaios toxicológicos para o metal pesado Cobre *In*: V Congresso Brasileiro sobre Crustáceo, Gramado-RS.

Vasquez, J. A. & Guerra, N. 1996. The use of seaweeds as bioindicators of natural and anthropogenic contaminants in northern Chile. Hydrobiologia 326/327: 327-333p.

Vieira, F. C. S. 2004. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea). Dissertação de Mestrado. Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

Viganò, L.; Farkas, A.; Guzzella, L.; Roscioli, C. & Erratico, C. 2007. The accumulation levels of PAHs, PCBs and DDTs are related in an inverse way to the size of a benthic amphipod (*Echinogammarus stammeri* Karaman) in the River Po. Science of the Total Environment 372: 131-145p.

Volkman, J. K.; Holdsworth, D. G.; Neill, G. P. & Bavor JR., H. J. 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediment. Science of the Total Environment 112: 203-219p.

Wakabara, Y.; Tararam, A. S. & Takeda, A. M. 1983. Comparative study of the amphipod fauna living on *Sargassum* of two Itanhaém shores, Brazil. Journal of Crustacean Biology 3: 602-607p.

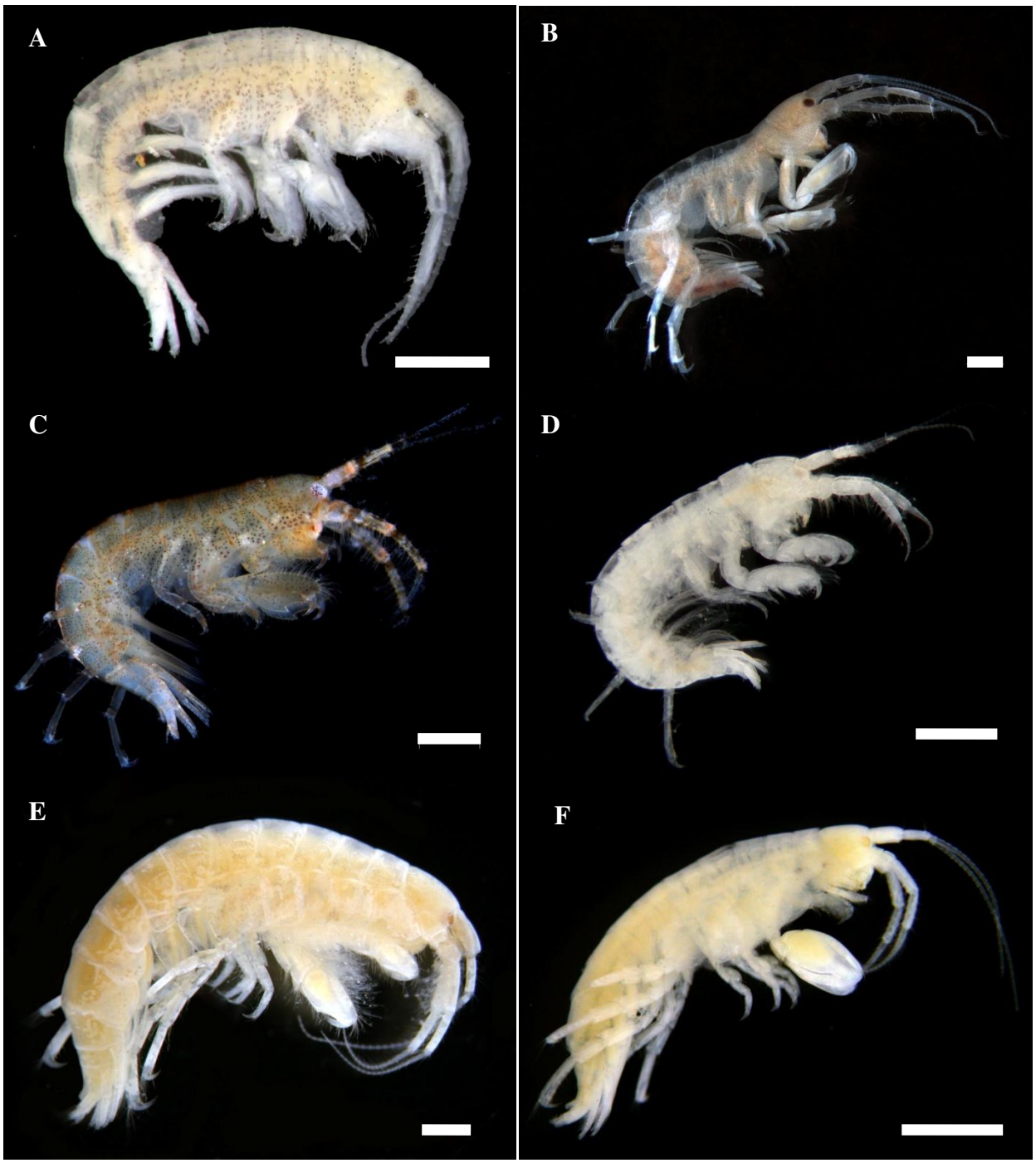
Weber, R. R.; Zanardi, E. & Bícego, M. C. 1998. Distribuição e ocorrência dos hidrocarbonetos biogênicos e de petróleo na água do mar superficial e nos sedimentos de superfície da região da Plataforma Interna do Canal de São Sebastião, SP, Brasil. Relatório Técnico do Instituto Oceanográfico 43: 1-14p.

Wenner, A. M. 1972. Sex ratio as a function of size in marine Crustacea. The American Naturalist 106 (949): 321-350p.

Zanardi, E.; Bícego, M. C. & Weber, R. R. 1999a. Dissolved/dispersed petroleum aromatic hydrocarbon in the São Sebastião Channel, SP, Brazil. Marine Pollution Bulletin 38(5): 410-413p.

Zanardi, E.; Bícego, M. C.; Weber, R. R. & Miranda, L. B. 1999b. Distribution of petroleum aromatic hydrocarbons in seawater and sediments of the São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil. Marine Pollution Bulletin 38(4): 262-267p.

Ziolli, R. L. 2002. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por prtróleo.Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal 3 (2): 32-41p.

Zar, J. H. 1998. Biostatistical Analysis. New Jersey, Prentice-Hall, Inc., 4th ed.

Anexo 1**:** Espécies de anfípodes ampitoídeos encontrados nos costões rochosos do Canal de São Sebastião: A - *Ampithoe divisura;* B - *Ampithoe marcuzzi;* C - *Ampithoe ramondi*; D - *Ampithoe* sp.; E - *Cymadusa filosa*; F - *Sunampithoe pelagica*. (Escala= 1mm)