

CAROLINA FONSECA MACIEL

Ecotoxicologia comportamental: uma revisão com enfoque na locomoção de invertebrados aquáticos.

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Mendes Lopes

São Paulo
2019

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. A IMPORTÂNCIA DA LOCOMOÇÃO NOS INVERTEBRADOS DE AMBIENTE AQUÁTICO	17
2.1 <i>Locomoção e toxicidade</i>	24
2.2 <i>Endpoints em microcrustáceos aquáticos</i>	28
3. OBSERVAÇÃO DE <i>ENDPOINTS</i> COMPORTAMENTAIS	36
3.1 <i>Sistemas de observação</i>	36
4. A APLICAÇÃO DE <i>ENDPOINTS</i> NOS INVERTEBRADOS AQUÁTICOS	38
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Representação da distribuição temporal dos estudos revisados empregando comportamento de natação de invertebrados aquáticos como *endpoint* de toxicidade no período de 1970-2018.....31
- Gráfico 2.** Distribuição temporal dos estudos empregando comportamento de organismos como *endpoint* de toxicidade de substâncias conforme trabalhos publicados entre 1970-2018 na base de dados do *Google Scholar* e *Web of Science*.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
cm ⁻¹	Centímetros
AChe	Acetilcolinesterase
DDVP	2,2-diclorovinil dimetilfosfato
EC ₅₀	Effect Concentration
IC ₅₀	Immobilization Concentration
LED	Light Emitting Diode
mm ⁻¹	Milímetros
mg.l ⁻¹	Miligramas por litro
MATLAB	Matrix Laboratory
MP	Microesferas de poliestireno
NGDR	Net-to-Gross-Displacement Ratio
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PBDE	Polybrominated diphenyl ethers
PCP	1-(1-phenylcyclohexyl)piperidine
PPB	Partes por bilhão
PPM	Partes por milhão
SDS	Dodecil sulfato de sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

°	Grau
µg	Microgramas
µm	Micrômetros
%	Porcentagem

AGRADECIMENTOS

Aos meus mentores espirituais, que sempre estiveram comigo, me renovando para acreditar no sucesso desta caminhada. Graças à eles fui capaz de aprender com os meus próprios erros e evoluir como ser humano milhares de vezes durante meu caminho até aqui, sem nunca desistir.

Aos meus pais, queridos, por todo o apoio durante essa vida e principalmente durante este ciclo muito importante! A vitória é nossa!

Ao meu noivo muito amado, Rafael Schade, por todo amor e carinho, entendimento e por ser uma grande inspiração para mim. Obrigada pelas palavras durante as fases difíceis. Você é luz!

Ao meu orientador Rubens Mendes Lopes, por permitir que fizesse parte da equipe LAPS, pelas contribuições científicas durante esses anos e pela compreensão. Obrigada!

Ao meu orientador de graduação, Fábio Giordano, por ter me incentivado a me apaixonar pelo plâncton desde o início da graduação. Meu muito, muito obrigada!

À todas as pessoas maravilhosas que encontrei durante a caminhada e todos que puderam contribuir de alguma forma com meu trabalho, com uma conversa, uma palavra, uma aula, uma referência, uma ideia... São tantas formas! E principalmente àqueles que me fizeram, por vezes, perder a esperança durante o mestrado, pois eles foram grandes mestres da minha persistência.

À Rafaella Brasil e Marta Stephan, por serem o ombro amigo nas horas conflitantes e pelo apoio em diversas questões pessoais em minha vida.

Às "LAPS – Girls": Alessandra Colombo e Claudia Guimarães por terem dividido comigo sorrisos sinceros deixando tudo sempre leve; Yonara Garcia por todo o conhecimento, paciência e carinho comigo.

Leandro Ticlia por toda dedicação com a gente. Maia Medeiros por esse jeito doce que me conquistou no primeiro dia que te vi atrás do ZooScan em 2013 e às meninas da graduação por todas risadas.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Andressa Ortega, minha parceira eterna de laboratório e congressos por toda ajuda; à Mariana Andrade e Thomás Banha por serem luz quando tudo era escuridão e às minhas amigas de Santos (Lau, Day, Gabi e Amanda) que sempre acreditaram em mim e me ouviram em todas as horas que precisei. Vocês são minha família e os amo muito!

Agradeço aos funcionários da secretária da Pós-Graduação do IO, aos professores que ministraram às disciplinas por todo o conhecimento e à Universidade de São Paulo pelo suporte da minha pesquisa.

Agradeço à banca examinadora pela presença, correções e certamente pelas inúmeras contribuições ao meu trabalho.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida ao longo dos 24 meses de estudo, provendo o investimento necessário em minha formação.

Não menos importante, agradeço ao povo brasileiro, por ter investido em mim e em todos os meus colegas pesquisadores, desejando que a ciência no Brasil esteja em breve no cenário em que ela realmente merece estar: preconizada pelos nossos governantes e que as ciências do mar sejam vistas como fundamentais para a preservação do nosso planeta.

Sou imensamente grata por tudo e todos a todo momento.

RESUMO

A presente revisão teve por objetivo indicar em literatura o uso do comportamento de locomoção de invertebrados aquáticos com indicador de toxicidade. Desde a década de 1960 é sabido que contaminantes tem efeitos deletérios em níveis populacionais e ecossistêmicos. A ecotoxicologia comportamental é um dos ramos da ecotoxicologia clássica que tem como objetivo interpretar os efeitos comportamentais dos contaminantes nos organismos. Esta abordagem tem ganhado espaço em função da continua busca de pesquisadores por *endpoints* que expressem efeitos populacionais relevantes. Além da importância econômica, os crustáceos aquáticos têm importância em cadeias alimentares e na aquicultura. Microcrustáceos são tidos pela ecotoxicologia como espécies-modelo, também utilizados para observações comportamentais em razão da sua participação em processos ecossistêmicos como as alças microbianas, ocupando posições intermediárias na cadeia trófica e sustentando níveis tróficos mais elevados. A locomoção de microcrustáceos aquáticos é o comportamento fundamental que garante a sobrevivência destes organismos no ambiente. Diversos processos vitais estão estritamente ligados à locomoção (e.g.: reprodução e alimentação). Sabe-se que compostos tóxicos tem a capacidade de alterar funções fisiológicas dos organismos, entre elas a locomoção. Atualmente, a quantificação do comportamento (*endpoints* comportamentais) tem sido utilizada para indicar mudanças induzidas por compostos orgânicos ou inorgânicos, favorecendo um panorama mais amplo sobre os efeitos adversos da contaminação aquática.

Palavras-chave: revisão, ecotoxicologia comportamental, *endpoints* comportamentais; microcrustáceos aquáticos, comportamento natatório.

ABSTRACT

The present review aimed to indicate in literature the use of aquatic invertebrate swimming behavior as model to assess contaminants toxicity. Since the 1960s it has been known that toxicants have deleterious effects at population and ecosystem levels. Behavioral ecotoxicology is one of the approaches of classical ecotoxicology that aims to interpret the behavioral effects of toxicants on organisms. This approach has gained space due to the continuous researchers' investigation about endpoints that allow to find the ecological relevance. Besides economic importance, aquatic crustaceans are important in food chains and aquaculture. Microcrustaceans are considered by ecotoxicology as model species, also used for behavioral observations because of their participation in ecosystem processes such as the microbial loops, occupying intermediate positions in the trophic chain and sustaining higher trophic levels. The locomotion of aquatic microcrustaceans is the fundamental behavior that guarantees the survival of these organisms in the environment. Several vital processes are strictly linked to locomotion (e.g.: reproduction and feeding). It is known that toxic compounds can alter the physiological functions of organisms, including locomotion. Currently, behavioral quantification (*behavioral endpoints*) has been used to indicate changes induced by organic or inorganic toxic compounds, favoring a broader picture of the adverse effects of aquatic contamination.

Keywords: review; behavioral ecotoxicology; behavioral endpoints; aquatic microcrustaceans; swimming behavior.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

Maciel, Carolina Fonseca

Ecotoxicologia comportamental: uma revisão com enfoque na locomoção de invertebrados aquáticos.

Carolina Fonseca Maciel; orientador, Rubens Mendes Lopes. – 2019

72 f. + 1 CD

Dissertação (Mestrado em Oceanografia) – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Versão Original

Número de catálogo

1. INTRODUÇÃO

No ambiente aquático poluentes tóxicos geralmente são encontrados em concentrações suficientes para provocar danos expressos através das respostas *letais* (mortalidade) e *subletais* (alimentação, reprodução e imobilidade), frequentemente estudadas pela ecotoxicologia, ciência dedicada a interpretar como os agentes potencialmente tóxicos afetam os organismos (SPARLING, 2016). A natureza desafiadora das questões encontradas pela ecotoxicologia necessitam que se integrem os frutos de conhecimento de outras áreas que não somente a toxicologia, mas também a química, biologia molecular, evolução, matemática, antropologia e também o comportamento (BANKS, STARK, 1998).

Apesar de sua relevância na tradução dos efeitos de contaminantes em níveis populacionais (BANKS; STARK, 1998), as respostas subletais refletidas no comportamento dos organismos são, geralmente, observadas com certa dificuldade, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias sensíveis que permitam observá-las e quantificá-las. Inicialmente, a utilização de parâmetros comportamentais para indicar toxicidade foi sugerida por Warner et al. (1966), sugerindo as vantagens o uso do comportamento na ligação da bioquímica e fisiológica de resultados comportamentais, em razão de sua sensibilidade aos efeitos subletais.

O interesse no conhecimento de efeitos consideráveis dos contaminantes sobre o comportamento de organismos aquáticos e terrestres na década de 1970 foi sugerido por Little (1990) e Rand (1995), publicou uma das mais relevantes revisões sobre toxicologia comportamental aquática, evidenciando os efeitos destes e comentando sobre as avaliações de risco ambiental.

Assim como respostas de crescimento, sobrevivência e anomalias morfológicas, as mudanças no comportamento de organismos são demonstradas como aspectos sensíveis, sendo propostas como indicadores de concentrações subletais de contaminantes no ambiente (WARNER,1966). Este tipo de resposta comportamental também é classificada como um *endpoint*. denominação derivada da ecotoxicologia clássica, referindo-se às alterações de padrões considerados normais provocadas pela exposição aos contaminantes em um período de tempo.

Deste modo, as respostas acessadas através dos *endpoints* observáveis podem ser quantificadas (i.e.: indivíduos mortos e vivos, responsivos ou não a estímulos, imóveis ou móveis) (NEWMAN, 2013).

Entre as décadas de 1970 e 1980, a ecotoxicologia era dependente da interpretação dos testes laboratoriais provindos da toxicologia e farmacologia (BARTHALMUS; RAND, 1980) e, mesmo com a menção à visão ecossistêmica (“eco”) em relação aos efeitos de contaminantes nos organismos, continuava a realizar as mesmas abordagens da toxicologia clássica (CAIRNS, 1992).

Este panorama pode ser alterado pela preocupação da década de 1990 em entender as implicações do uso de diversos compostos tóxicos (principalmente os organoclorados, metais e pesticidas) nas funções endócrinas, abrindo a possibilidade de tratar os efeitos dos poluentes ambientais de maneira diferente ao tratamento dado às respostas toxicológicas dos convencionais compostos farmacêuticos (NELSON, 1994).

A consolidação da ecotoxicologia comportamental foi favorecida pelo cenário onde testes foram necessários para esclarecer efeitos deletérios e sinérgicos de compostos no ambiente por meio de abordagens ecologicamente relevantes, favorecendo o uso do comportamento animal como indicador de toxicidade (DOURISH et al., 1995; NEEDLMAN, 1995).

O desenvolvimento da ecotoxicologia comportamental pode ser atribuído também a procura por técnicas menos invasivas com maior relevância ambiental, recorrendo à metodologias que tivessem resultados diferentes do que apenas concentrações letais e subletais de compostos, como resultados obtidos em testes de ecotoxicologia clássicos (FOSSI; LEONZIO, 1994).

Assim, no passado, ecotoxicologistas procuraram por testes que abrangessem as alterações de um ou mais processos fisiológicos e metabólicos dos organismos (FAIMALI et al., 2017), e, uma vez que o comportamento é reflexo de uma cadeia complexa destes processos, pode complementar os resultados para além da taxa de mortalidade e letalidade.

Estudar mudanças no comportamento devido à exposição aos contaminantes é, portanto, uma parte essencial da ciência comportamental,

(GEHARDT, 2007), sugerindo os efeitos de contaminantes em organismos encontrados no ambiente e analisando como as rotas de exposição influenciam as respostas comportamentais (GEHARDT, 2006).

Estes estudos também foram motivados pela tentativa de incorporá-los em rotinas de monitoramento de qualidade de água, avaliando os organismos atingidos, a dimensão dos efeitos e os seus modos de ação quando os organismos encontram-se em condições tóxicas (SHIRER; CAIRNS; TALLER, 1968; DRUMMOND; SPOOR; OLSON, 1973; MORGAN, 1974; CAIRNS; GRUBER, 1980; KRAMER; BOTTERWEG, 1991; van der SCHALIE et al., 2001; BAE; PARK, 2014).

Por ser uma ciência interdisciplinar, a ecotoxicologia comportamental recebe crescente reconhecimento de toxicologistas e biólogos comportamentais (ZALA; PENN, 2004), elucidando questões ecossistêmicas importantes (DELL'OMO, 2002) e estimando de forma mais precisa os reais efeitos do risco ambiental de contaminantes à níveis populacionais.

Como exemplos em literatura, tem-se a (1) redução da taxa de crescimento (ALLAN AND DANIELS, 1982; DODSON; HANAZATO., 1995; SCHMIDT et al., 2005), (2) interferências nas relações de predação (PRESTON; SNELL; DUSENBERY, 1999), (3) alterações reprodutivas (WIBE; ROSENQVIST; JENSSEN, 2002; BOYD, 2010) e (4) alimentares (ZINKL et al., 1991; GRIPPO; HEATH, 2003), eventos que podem afetar significativamente o equilíbrio ecossistêmico geral.

Desde 1970, os estudos em ecotoxicologia comportamental são mais evidentes, empregando um número maior de espécies, aumentando o número de respostas avaliadas (FAIMALI, 2017), viabilizando o desenvolvimento de metodologias e análise de dados e promovendo o crescimento das tecnologias para observações das alterações comportamentais (LV et al., 2013).

Diversos estudos apontam a utilidade nas metodologias comportamentais quando comparadas às demais metodologias, acessando os efeitos ambientais de contaminantes nos organismos de maneira acurada (MELVIN; WILSON, 2013; FAIMALI et al., 2017).

Os estudos comportamentais realizados entre as décadas de 1970 e 1980 envolviam comumente organismos vertebrados como peixes, seguidos da inserção de outros organismos invertebrados, como crustáceos e moluscos.

As alterações em fases larvais de invertebrados aquáticos vêm sendo utilizadas em uma série de estudos ecotoxicológicos, demonstrando ser importante para indicar qualidade da água e efeitos de substâncias tóxicas (VAN LEEUWEN; LUTTMER; GREFIOEN, 1985; NAIMO, 1995; WEDDERBURN et al., 2000; BEIRAS et al., 2003, SINGH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Na ecotoxicologia aquática de vertebrados, os peixes representam o organismo em maior utilização nos testes devido à sua posição ecológica dentro da cadeia trófica, bem como a relativa facilidade na manipulação em laboratório, produzindo resultados relevantes (MCKIM, 1977; BRAUNBECK; HINTON, STREIT, 1998; SCHOLZ et al., 2008; EMBRY et al., 2010; ULLAH; ZORRIEHZAHRA, 2015).

Os peixes tiveram seus comportamentos alterados após exposição à contaminantes orgânicos e inorgânicos como pesticidas, metais e fármacos. Foram respostas comuns encontradas (1) o aumento da atividade natatória, (2) saltos, (3) perda de direção, (4) maior vulnerabilidade à predação e (5) alterações respiratórias como o aumento da frequência de abertura opercular (ARUNACHALAM; JEYALAKSHMI; ABOOBUCKER, 1980; BROWN et al., 1985; ATCHISON; HENRY; SANDHEINRICH, 1987; LITTLE et al., 1990 apud ELLGAARD et al., 1977; LITTLE et al., 1990; ELLGAARD et al., 1995; WEIS; SMITH; ZHOU, 1999; GERHARDT, 1998; PANDEY et al., 2004; EISSA; SALIBIÁN; FERRARI, 2006; KÖPRÜCÜ et al., 2006; RAO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010; BRODIN et al., 2017).

Em crustáceos e moluscos, as principais alterações comportamentais provocadas por contaminantes foram monitoradas, sendo semelhantes às encontradas em vertebrados. São alterações na (1) locomoção, (2) escape, (3) alimentação, (4) reprodutivas e (5) em demais relações intraespecíficas (ATEMA, 1976; WEIS; PERLMUTTER, 1987; ZHADAN et al., 1992; PYNNÖNEN, 1996; SÁLANKI et al., 2003; MACFARLANE; REID; ESGUERRA, 2004; KAMBLE; KAMBLE, 2014; DHARA; SAHA; MAITI, 2017) que afirmam o sucesso da relevância ecológica da ecotoxicologia comportamental.

Destaca-se que os resultados de alterações comportamentais podem ser utilizados como predições de efeitos tóxicos à níveis populacionais, como o exemplo de Hebel, Jones e Depledge (1997): a exposição de caranguejos ao cobre promoveu inicialmente uma resposta de escape, precedida de reduções alimentares e hormonais, levando à danos celulares e morte dos organismos. Se antes observadas, estas respostas adversas iniciais poderiam fornecer informações sobre maiores prejuízos à biota em um curto espaço de tempo.

O comportamento também pode intermediar o entendimento de distribuição de espécies em ambientes naturais impactados, conforme demonstrado por Hansen et al. (1999) em espécies de trutas. O notável desaparecimento de *Oncorhynchus mykiss* em um lago contaminado por metais pode ser associado às alterações comportamentais de escape frente aos contaminantes presentes naquele ambiente.

A dificuldade na extrapolação dos comportamentos em níveis organizacionais em campo, bem como a quantificação de efeitos de maneira significativa considerando a possível variabilidade dos dados são desafios à serem enfrentados dentro da ecotoxicologia comportamental aquática (NEWMAN, 2014).

A validação dos dados comportamentais em campo e o estabelecimento de relações com outras respostas biológicas e ecológicas encontradas nas demais áreas da biologia são também desafios para sua implementação (GEHARDT, 2007).

Contudo, Hecker e Hollert (2009) recomendam que a mensuração de níveis químicos no ambiente e nos organismos testados quanto ao seu comportamento sejam feitas, aumentando a confiabilidade da interpretação dos efeitos e validando as respostas comportamentais através da integração com outras modalidades de testes ecotoxicológicos, como, por exemplo, testes de mortalidade.

No entanto, a amplamente utilizada taxa de mortalidade de organismos aquáticos, de acordo com Scott e Sloman (2004), não abrange a “morte ecológica” provocada por exposições à pequenas concentrações de estressores. Ainda que os organismos não estejam notoriamente prejudicados, podem estar inaptos a exercer suas funções ecológicas no ecossistema, podendo reduzir o *fitness* das espécies em questão e por este motivo, a integração do comportamento juntamente aos índices convencionais é uma das formas mais completas para avaliações de risco.

Segundo autores, testes agudos que empregam a mortalidade como avaliação não são, geralmente, adequados para demonstrar os efeitos reais dos poluentes quando em ecossistemas naturais, pois as concentrações empregadas muitas vezes se afastam das encontradas no ambiente (RAND; PETROCELLI, 1985; ROAST; WIDDOWS, JONES., 2000; KANE; SALIERNO; BREWER, 2004; SCOTT; SLOMAN, 2004).

Por outro lado, segundo Faimali et al. (2017), ensaios comportamentais são capazes de fornecer o entendimento mais amplo das consequências de contaminantes em relação às taxas de letalidade, especialmente quando as concentrações de substâncias empregadas nos testes se aproximam às mensuradas em campo.

Os testes crônicos seriam uma das alternativas apontadas de acompanhamento dos efeitos subletais de contaminantes, mas uma de suas desvantagens é o maior tempo de exposição dos organismos para se obter respostas passíveis de comparação aos efeitos comportamentais. A exemplo, o pesticida Carbaryl aumentou a frequência de abertura opercular em *Mystus vittat* em apenas 90 minutos de observação, já a taxa de mortalidade de organismos só foi obtida após 72 horas de experimento (ARUNACHALAM, JEYALAKSHMI, ABOOBUCKER; 1980). O comportamento pode indicar um comprometimento relevante à níveis fisiológicos provocados pelos contaminantes.

Assim como para *M. vittat*, o efeito tóxico do cobre e do cádmio em *Eurytemora affinis* foi obtido através da observação de alterações natatórias em fêmeas 24 horas após exposição, já o valor da concentração letal (LC₅₀) para os mesmos compostos foi obtida após 96 horas de exposição (SULLIVAN et al., 1983).

Atualmente, milhares de componentes tóxicos são encontrados na natureza, criando a necessidade de tecnologias sensíveis que identifiquem os efeitos da exposição à curto prazo, fazendo da análise comportamental uma possibilidade real e rápida em suas detecções (MILLER et al., 1982; LITTLE; FINGER, 1990; CLEVELAND et al., 1991; LITTLE et al., 1993; GERHARDT, 2007; MARADONA et al., 2012). A quantidade limitada de trabalhos publicados evidenciando o comportamento como indicador de toxicidade traz um cenário de crescimento destas metodologias, indicando a potencialidade da sensibilidade comportamental frente

aos principais compostos tóxicos ainda a ser explorada com o objetivo de proteção de ecossistemas e dos organismos neles inseridos.

Conforme exposto por Hellou (2011), os testes ecotoxicológicos convencionais são aceitos em um contexto legal para implementação de diretrizes e regulamentos em função do custo e da facilidade em realizá-los e, provavelmente por estas razões, as avaliações de risco ambiental geralmente incluem somente taxas de letalidade e mortalidade.

A suma importância do comportamento no contexto ecotoxicológico se dá por integrar a fisiologia e ecologia dos organismos e do ambiente. Através dele, é possível relacionar processos celulares mensurados em laboratório com as respostas ecológicas aos estressores observadas no campo (LITTLE; BREWER, 2001).

Em literatura, Little (2002) sugere o papel crucial da ecotoxicologia comportamental na determinação de toxicidade e na restauração de sistemas impactados, utilizando-se das espécies locais para observações de comportamento.

Dado que o comportamento é ligado à uma variedade de respostas estressoras (AMIARD-TRIQUET, 2009), este aspecto é relevante não somente em estudos ecológicos, mas também na sua inclusão na avaliação de risco de componentes potencialmente tóxicos.

Dentre as vantagens no uso do comportamento para avaliação de toxicidade estão (1) a alta sensibilidade, (2) a rapidez e relevância ecológica. Além disto, as metodologias comportamentais têm (3) caráter não-invasivo e são (4) passíveis de repetibilidade (GERHARDT, 2007; AMIARD-TRIQUET, 2009; ROBINSON, 2009).

A relativa rapidez em obter resultados comportamentais relevantes frente aos contaminantes provém do mecanismo de defesa dos organismos, que tem como função protegê-los contra potenciais exposições que acarretam em efeitos deletérios irreversíveis (HELLOU, 2011).

Especificamente, o comportamento é a forma como os organismos expressam o que é preciso saber a respeito da contaminação ambiental (MORRIS, 2005), reagindo e adaptando-se às mudanças que nele ocorrem em diversas formas, inclusive quando expostos à contaminantes (EVANS 1994; DELL'OMO,

2002) e à outras mudanças abióticas diárias em diversas escalas. Primariamente, às respostas comportamentais provocadas por contaminantes estão ligadas à plasticidade comportamental fenotípica (EMLEN, 1998).

West-Eberhard (1989) propõe que a plasticidade comportamental é a habilidade de um genótipo produzir mais de uma resposta comportamental em resposta à um estressor, o que explica a heterogeneidade de alterações observadas em organismos de uma mesma população.

Quando impactado por concentrações subletais, um organismo não consegue manter sua homeostase. O desequilíbrio homeostático é uma das vias mais evidentes de ação na redução da capacidade de um organismo se manter funcionando adequadamente (BROUWER; MURK; KOEMAN, 1990).

A habilidade inata em responder à estímulos é uma das características comportamentais dos organismos (KOMERS, 1997) e, podem ser classificadas de diversas maneiras de acordo com a sua fisiologia e bioquímica (e.g.: atividades hormonais, consequências ecológicas (e.g.: escape, reprodução), grau de complexidade (e.g.: fototaxia, forrageamento) e interatividade (e.g.: interações sociais, agregação) (GEHARDT, 2007).

A análise de um comportamento deve ser criteriosa, implicando em manipular variáveis biológicas e ambientais, buscando mensurar um padrão de ação definido e exibido pelo organismo (DE PAIVA MAGALHÃES et al., 2007).

Além de prover indicativos de níveis organizacionais dos organismos (SCOTT; SLOMAN, 2004), o comportamento é, portanto, um produto final da fisiologia e ecologia dos aspectos ecotoxicológicos (LITTLE et al., 1990).

De maneira prática, a inserção do comportamento na ecotoxicologia é definida através de trabalhos que apresentam os (1) efeitos subletais de contaminantes, (2) modificações comportamentais após exposições quimicamente tóxicas, (3) o uso do comportamento para identificação de modos tóxicos de ação e a (4) validação de testes comportamentais para monitoramento de água (SANDHEINRICH, 2015).

Em resumo, a ecotoxicologia comportamental é uma das ferramentas que integram à ecotoxicologia e evoluiu conforme o interesse em entender os reais

impactos dos contaminantes no ambiente à nível organizacional. Desta forma, as análises comportamentais lançam mão de novas tecnologias de validação, levando à uma perspectiva mais ampla das questões de contaminação ambiental, estando em busca de sua implementação nas rotinas de laboratório e de monitoramento e de seu reconhecimento no contexto ecotoxicológico.

Este trabalho de revisão teve como principal objetivo demonstrar a importância da ecotoxicologia comportamental como ferramenta de análise de toxicidade de contaminantes, tendo para isto, como escopo principal, evidenciar a locomoção de invertebrados aquáticos como *endpoint*. As seções a seguir foram elaboradas de modo a elucidar a importância deste comportamento nos invertebrados aquáticos, bem como sua utilização como indicador de toxicidade. Ainda, encontram-se neste trabalho os principais métodos de observação do comportamento de locomoção e a revisão da aplicação destes *endpoints* conforme literatura.

2. A IMPORTÂNCIA DA LOCOMOÇÃO NOS INVERTEBRADOS DE AMBIENTE AQUÁTICO

A movimentação nos ambientes é o comportamento que mais determina a morfologia e fisiologia dos organismos. Em microcrustáceos aquáticos, a locomoção é possível através do rompimento da viscosidade fluídica, rompimento este que é maior que a inércia que mantem pequenos volumes de água movidos durante a locomoção, em movimento. Por esta razão, estes pequenos organismos conseguem se locomover empurrando a resistência da água, e, quando cessam seus movimentos, não decaem na coluna de água com rapidez em função da mesma resistência (DICKINSON et al., 2000).

A locomoção é um dos aspectos amplamente estudados dentro das ciências comportamentais, pois é através dela que atividades vitais são possíveis, e, principalmente, por permitir que os organismos acessem os recursos ambientais disponíveis, sendo também o meio pelo qual organismos interagem (AMIARD-TRIQUET, 2009).

No ambiente aquático, a importância da locomoção está diretamente ligada ao fato desta ser o comportamento-chave nas interações presa-predador, das relações de dominância, do sucesso no forrageamento (AMIARD-TRIQUET, 2009) do aumento nas taxas de encontro entre o organismo e o alimento, parceiros sexuais e eventuais predadores (VISSER, 2007), atividades que tem implicações diretas na ecologia e evolução das diversas classes de organismos, entre eles microrganismos e animais (SAMBOLINO, 2015).

No ecossistema aquático o grupo dos crustáceos é diverso, possuindo relevância ecológica e econômica. No ambiente, são consumidores primários e secundários, além de serem uma fonte alimentar significativa de organismos de alto nível trófico e grupos taxonômicos como peixes e mamíferos (WHITELEY, 2011). Economicamente, os crustáceos têm papel na produção pesqueira e aquicultura, contribuindo com o consumo de proteína animal alimentar em escala global, (BONDAD-REANTASO et al., 2012) e promovendo o crescimento do esforço pesqueiro durante as três últimas décadas (FAO, 2010).

Na aquicultura, os microcrustáceos marinhos e dulcícolas participam da alimentação em criadouros de peixes de interesse comercial, sendo uma das principais fontes de proteína destes animais (KIBRIA et al., 1997). No mais, possuem papel decisivo no sucesso de cultivo de peixes zooplânctívoros, que depende principalmente da densidade e composição das populações destes organismos (GEIGER; 1983; FERNANDO, 1994).

Dentre a classe de organismos aquáticos, em especial a abundante comunidade de pequenos copépodes, estabelecem relações fundamentais em redes tróficas aquáticas, sendo os maiores consumidores do fitoplâncton, integrando a alça microbiana marinha (ROFF et al., 1995). A pressão predatória exercida por copépodes se propaga como uma cascata trófica ao longo de toda cadeia alimentar, influenciando diretamente a abundância de outros constituintes do ecossistema (CALBET; LANDRY, 1999). Em ambientes dulcícolas, microcrustáceos também são fundamentais por consumirem cianobactérias e fitoplâncton, participando ativamente da constituição da cadeia trófica nestes ambientes (JONES; GREY, 2011).

Assim como é para todos os crustáceos, especificamente os planctônicos, a natação garante a sobrevivência e a habilidade em se manter em suspensão no ambiente tridimensional. No caso de organismos sésseis, a produção de larvas planctônicas assegura a dispersão e colonização das espécies nos ambientes (SAMBOLINO, 2015).

São influenciadas pela natação as habilidades em encontrar e capturar alimento, parceiros sexuais e evitar a predação em movimentações de pequena escala destes organismos (ALMEDA; VAN SOMEREN GREVE; KIORBOE, 2017). O sucesso em se manterem vivos e ativos está diretamente relacionada a uma apropriada capacidade natatória na coluna de água. O resultado destes movimentos tem implicações importantes no forrageamento eficiente, no balanço energético do organismo, na seleção do ambiente e na expressão de comportamentos sociais, como os reprodutivos (PYKE, 1984; STEVENS; KREBS, 1986; BELL, 2002).

Embora descritos padrões consistentes de comportamento de locomoção de invertebrados aquáticos, geralmente estes estudos comportamentais são direcionados aos níveis tróficos mais elevados (BELL; HANKISON; LASKOWSKI, 2009) como os mamíferos (WILLIAMS, 2018) e peixes (TAGUCHI; LIAO, 2011; VIDELER, 2012). A diferença de números de estudos entre os grandes grupos de vertebrados e invertebrados pode ser atribuída ao fato de que o primeiro possui grande impacto ecológico e, por vezes, econômico. Além disso, há relativa facilidade em se observar e descrever padrões de locomoção em escalas maiores, em detrimento dos invertebrados aquáticos, que se locomovem em distâncias milimétricas. No entanto, descrever o padrão natatório em organismos aquáticos em geral é menos comum quando comparado aos organismos terrestres, principalmente pela dificuldade em se obter dados de locomoção no ambiente aquático tridimensional, necessitando, para isso, o uso de sistemas capazes de captarem estes deslocamentos de forma significativa (SEURONT et al., 2004).

Dentro do grupo de organismos aquáticos, os microcrustáceos ocupam a grande parcela desta comunidade. O estudo de comportamento natatório em microcrustáceos é relatado em literatura (e.g.: COSTELLO et al., 1990; TITELMAN, 2001; BOWNIK, 2017; GAMBARDELLA, 2018) e pode ser atribuído (1) a facilidade de obtenção dos organismos e manutenção dos mesmos em laboratório e a (2)

importância trófica. Além disto, em termos comportamentais, estes organismos utilizam diversas estratégias para obter alimento, fugir de predadores e ter sucesso reprodutivo (SEURONT et al., 2004).

Processos ecológicos importantes envolvendo microcrustáceos (e.g.: predação, competição) acontecem no ambiente em escalas de centímetros, entretanto, as consequências destas interações têm impactos climáticos e na produtividade pesqueira sob escalas globais (RIVKIN; LEGENDRE, 2001), uma vez que, impactos negativos que afetam estas relações na comunidade planctônica geram prejuízos em toda a cadeia, sendo evidente que a locomoção nos microcrustáceos é fundamental na sustentação das populações de cada espécie no ambiente, através do desempenho de funções vitais, garantindo que o seu papel ecológico seja mantido.

O interesse em entender como ocorriam estas interações pode elucidar a partir da observação do comportamento de locomoção de forma detalhada, as respostas de escape frente a predadores (WAGGETT; BUSKEY, 2006; KIORBOE, 2013; BRADLEY et al., 2013) e aos estímulos hidromecânicos (BUSKEY et al., 2017), condições intimamente ligadas a vida destes organismos em ambiente natural. Não somente estas respostas foram estudadas, mas atualmente o papel da locomoção em comportamentos diversos, tais como: alimentares (e.g.: UTTIERI; PAFFENHÖFER; MAZZOCCHI, 2008; SABIA et al., 2014); sexuais (e.g.: SEURONT, 2013); e quando em condições não favoráveis provocadas por contaminantes (e.g.: CAILLEAUD et al., 2011).

Lowndes (1935) apud Cannon (1928) publicou observações gerais sobre o mecanismo de alimentação de *Diatomus gracilis* e *Calanus finmarchicus*, segundo a formação de correntes alimentares para filtração de partículas, porém, Koehl e Strickler (1981), através de filmagens do comportamento de *Eucalanus pileatus*, puderam descrever detalhadamente o processo de captura ativa de partículas alimentares. Neste sentido, copépodes podem detectar, inspecionar e decidir sobre a ingestão das mesmas e, no processo de alimentação, as correntes geradas por estes animais podem ter efeito em seu deslocamento.

Jonsson e Tiselius (1990) descreveram o comportamento de filtração de *Acartia tonsa* na obtenção de microflagelados para alimentação. Em experimentos, pode observar alterações de locomoção de *A. tonsa* na coluna d'água em relação à concentração alimentar de protozoários oferecida e, através desta informação, pode-se deduzir que o comportamento de locomoção pode ser alterado conforme às zonas de concentração de alimento no ambiente, sendo fundamental para a captura do alimento.

A alimentação de microcrustáceos em ambiente natural fornece estímulos para diferentes atividades de locomoção: (1) reorientação do corpo em relação à presa (e.g.: BROGLIO; JOHANSSON; JONSSON, 2001) e (2) movimentos que otimizam capturas alimentares (e.g.: TITELMAN; KIORBOE, 2003; WU et al., 2010).

Uma das estratégias alimentares relevantes de microcrustáceos tem efeitos no deslocamento dos organismos. Através da produção de correntes alimentares, copépodes e outros organismos suspensívoros podem se locomover de maneira eficiente. A eficiência desta modalidade de captura alimentar é ditada pela velocidade de locomoção presa-predador e pelo fluxo total das correntes geradas pelos organismos (KIORBOE, 2011).

O sistema de obtenção das partículas alimentares através de correntes de locomoção é apenas uma das formas adotadas por microcrustáceos, envolvendo pequenas estruturas morfológicas movimentadas rapidamente, o que dificultou a análise do comportamento alimentar destes organismos durante um longo período (RIISGARD, 2015).

No entanto, microcrustáceos pertencentes ao zooplâncton podem se alimentar também através da locomoção ativa em busca de presas ou através de “emboscadas”, onde os organismos ficam imóveis na água enquanto aguardam até que as presas passem próximas as suas estruturas de captura, ocasionalmente dando saltos para compensar o reflexo de afundamento (KIORBOE, 2010).

Assim como no forrageamento, na reprodução o encontro entre parceiros é relacionado ao comportamento locomotor (NIHONGI; LOVERN; STRICKLER, 2004; DUR et al., 2012). Sabe-se que a velocidade de locomoção é determinante para que estes encontros sejam possíveis (GERRITSEN; STRICKLER, 1977).

As diferenças de velocidade entre organismos relacionam-se aos diversos padrões natatórios exibidos durante a localização de parceiros sexuais (DOALL, 1998), à comportamentos de reprodução intraespecíficos (KIØRBOE; BAGØIEN; THYGESSEN, 2005), aos diferentes sexos e estágios reprodutivos (VAN LEEUWEN; MALY 1991) e a aceitação ou rejeição de parceiros sexuais (TITELMAN et al., 2007; TSUBOKO-ISHI; BURTON, 2017).

O aumento de velocidade na locomoção de copépodos durante o estágio pré-copulatório aumenta a probabilidade de encontro entre parceiros sexuais compatíveis, mas também os coloca expostos à ação de possíveis predadores (GERRITSEN; STRICKLER; 1977). Tanto no encontro quanto na fuga, a locomoção é determinante.

Por outro lado, para copépodes, além da atração de parceiros através da emissão de feromônios, a locomoção tem papel fundamental na continuidade da cópula, iniciada por um padrão natatório denominado por Jacobs (1961) por “movimentos de busca” e continuada pela capacidade de se manter em movimento até a emissão de gametas.

Esta locomoção durante a fase que antecede a cópula, caracteriza-se por movimentos em loop em alta velocidade, contrastando-se com movimentos mais lentos, deslizamentos e explosões de velocidade semelhantes à resposta de escape à predadores. Posteriormente é importante a reorientação do corpo do macho em relação à fêmea para sucesso da fecundação (JACOBY; YOUNGBLUTH, 1983).

Fica claro que, por estarem em um grande volume tridimensional, para invertebrados aquáticos dependentes de fecundação interna, um passo importante no encontro de parceiros e no potencial sucesso reprodutivo é o encontro entre os organismos (BUSKEY, 1998), realizado através da locomoção.

Existem também copépodes que localizam parceiros sexuais através de sinais hidrodinâmicos deixados por ambos os sexos. Estes sinais são “impressos” no volume de água durante a locomoção (BAGOIEN; KIORBOE, 2005).

A probabilidade de encontros entre machos e fêmeas de copépodes depende também das distâncias percorridas por estes organismos e por padrões natatórios adequados frente aos parceiros sexuais escolhidos (BUSKEY, 1998; KIORBOE;

BAGOIEN, 2005). Ainda, Watras (1983) descreve etapas da cópula de *Diaptomus leptopus* caracterizados por locomoções em baixa velocidade e giros.

Segundo Bagoien e Kiorboe (2005), machos de *Centropages typicus* localizam suas parceiras sexuais através de *loopings* helicoidais, aumento de velocidade e mudança na direção de natação com objetivo de encontrar e interceptar a trilha química deixada pela fêmea de sua espécie.

Em relação ao estágio reprodutivo de invertebrados aquáticos, Heuschele e Kiorboe (2012) demonstraram que as fêmeas de *Oithona davisae* (acasaladas e virgens) e machos virgens exibem diferenças na velocidade e atividade natatória bem como diferenças de estratégias alimentares.

De acordo com observações de Kiorboe (2007), fêmeas de *O. davisae* são organismos que geralmente capturam seu alimento através de emboscadas, não fazendo uso de correntes alimentares produzidas por altas velocidades natatórias, ao contrário de machos desta espécie.

Como demonstrado por por Uttieri et al., (2007) em *Leptodiaptomus ashlandi*: fêmeas em estágio pré-copulatório percorriam pequenas distâncias movendo-se unidirecionalmente em um volume restrito. Já machos do mesmo estágio se locomoviam ativamente durante toda a observação de maneira exploratória.

Segundo Lee et al. (2011), a locomoção de machos de *Pseudodiaptomus annandalei* foi mais rápida e persistente que a exibida nas fêmeas, não localizando padrões natatórios de exploração do ambiente nestas.

Um padrão semelhante a este foi observado por Sabia et al., (2014) em *P. marinus* em relação ao sexo dos organismos, onde a locomoção observada é frequente e em baixa velocidade nos machos e rápida e menos frequente em fêmeas.

A migração em coluna d'água (migração vertical) praticada por alguns grupos de invertebrados aquáticos é, em geral, uma estratégia de locomoção coletiva provocada frente à presença de predadores no ambiente (COHEN; FORWARD, 2005) e na busca por alimento.

A dinâmica de locomoção em escala espacial e temporal é estudada em uma gama de organismos, entre eles as (1) bactérias (MORISAKI et al., 1999; TABOADA

et al., 2003; VATER et al., 2014), (2) moluscos (HUNT et al., 2000; DONOVAN, ELIAS, BALDWIN, 2006; NEWCOMB et al., 2012) e (3) crustáceos (VERSLYCKE et al., 2004; CAILLEAUD, 2011; FUCHS, DIBACCO, 2011; MICHALEC et al., 2009).

Em microcrustáceos aquáticos, a observação comportamental (e.g.: VAN DUREN; VIDELER, 1995; DAHMS; HWANG, 2010; KIORBOE, 2011) vem sendo realizada à partir de técnicas que permitam estudar estes organismos em escalas de tamanho próprias (TISELIUS; SAIZ; KIORBOE, 2013), já que, processos como competição e predação acontecem no ambiente sob distâncias de centímetros (SEURONT et al., 2004).

2.1 Locomoção e toxicidade

Uma das formas de quantificação das respostas comportamentais vem sendo feita por meio de “*behavioral endpoints*” (*endpoints* comportamentais), termo proposto por Clotfelter et al. (2004) para os aspectos observáveis em organismos expostos a substâncias tóxicas (e.g.: atividade natatória). Na ecotoxicologia, as respostas de sensibilidade dos *endpoints* dependem inteiramente do organismo que está sendo estudado (BANKS; STARK, 1998) e por este motivo, para invertebrados aquáticos, a locomoção tem sido considerada como um *endpoint* relevante e com grau de especificidade adequado, já que está diretamente relacionado às adaptações biológicas destes organismos ao seu ambiente.

As alterações comportamentais provocadas pela toxicidade ocorrem quando um agente químico é capaz de provocar mudanças que excedem os padrões normais de variabilidade nas respostas funcionais do organismo, tais como a respiração, a reprodução e a locomoção (ASTM, 2012), respostas que podem ser quantificadas.

É sabido que a exposição à pequenas concentrações de contaminantes por longos períodos ou concentrações medianas por curtos períodos com certa frequência resulta em prejuízos fisiológicos (NYMAN et al., 2013; SCHERER et al., 2013) e por este motivo, a análise comportamental é uma das mais efetivas ferramentas deste monitoramento.

No ecossistema, normalmente contaminantes ocorrem em concentrações subletais (HASENBEIN et al., 2015) e a escolha de um endpoint adequado para

testes ambientais de toxicidade dependem de vários fatores, incluindo a sua sensibilidade em caracterizar as respostas comportamentais observáveis.

A relevância ecológica dos *endpoints* comportamentais se dá em virtude da ligação que estabelece entre as respostas individuais e as mudanças populacionais que os contaminantes podem ocasionar, em particular porque mudanças populacionais são manifestadas posteriormente como modificações na estrutura e funcionamento da comunidade. Esta modificação é iniciada por alterações genéticas, bioquímicas e fisiológicas provindas da alteração ambiental (FINGER et al. 1985).

Endpoints sensíveis que detectam com rapidez efeitos significativos em concentrações mais baixas de substâncias tóxicas asseguram a eficiência no uso do comportamento como teste em intervalos mais curtos de tempo (ANDERSON; BOYD; WILLIAMS; 2001), sendo passíveis de serem incorporados em rotinas laboratoriais e de monitoramento.

Estes aspectos comportamentais tem sido considerados mais sensíveis que outros comumente empregados em estudos ecotoxicológicos (e.g.: letalidade) (DELL'OMO, 2002; GERHARDT, 2007; ROBINSON, 2009) e devido à sua alta sensibilidade, o seu uso vem ganhando maior visibilidade (HELLOU, 2011), sendo úteis para detecção de efeitos neurotóxicos até mesmo em peixes e humanos (GERHARDT, 2007).

A dificuldade na aquisição de registros comportamentais e a compreensão limitada da relevância do comportamento natural de muitos organismos dificultou o desenvolvimento de *endpoints* comportamentais, cenário modificado pela inclusão de ferramentas como os sistemas de aquisição de imagens (KANE; SALIERMO; BREWER., 2005). Os *endpoints* comportamentais já foram evitados em protocolos de avaliação de risco por serem afetados pela subjetividade do operador, especialmente *endpoints* obtidos através de técnicas não-automatizadas (e.g.: observação visual da natação e alimentação) (GERHARDT et al., 1996; ALONSO et al., 2009), necessitando de técnicas mais acuradas de observação.

Hoje sabe-se que o comportamento não é um processo randômico, mas sim um evento complexo de atividades previsíveis para garantir o *fitness* máximo e a sobrevivência das espécies em questão, sendo considerado um *endpoint* válido para avaliar os efeitos da exposição aos componentes tóxicos nos organismos (FAIMALI, 2017) e, em virtude de sua seletividade, os *endpoints* podem ser úteis na determinação de mecanismos de toxicidade em substâncias neurotóxicas (ANDERSON; BOYD; WILLIAMS; 2001) e são efetivos diante das exposições agudas ou crônicas à contaminantes (WEIS et al., 2001; AMIARD-TRIQUET, 2009).

A escolha do tempo de exposição aos contaminantes é determinante para obtenção de resultados significativos, já que os efeitos de alguns destes contaminantes são transitórios (AMIARD-TRIQUET, 2009), ocultando as possíveis alterações comportamentais, não permitindo que se expressem nos organismos e/ou produzindo efeitos comportamentais não relacionados diretamente à aplicação de substâncias tóxicas.

A importância e rapidez na aplicação e obtenção de respostas de *endpoints* com relevância populacional foi demonstrada por Clotfelter et al. (2004): o “*burrowing*” (escavar) é um dos comportamentos comuns entre invertebrados aquáticos e terrestres. Uma pequena alteração neste reflexo natural provocada por contaminantes pode causar intensa disfunção comportamental nos organismos, explicadas através dos danos em estruturas sensoriais e perda de coordenação geral, estimulando comportamentos repetitivos de evitação, energeticamente dispendiosos e que aumentam a vulnerabilidade à predação (BOYD, 2002).

Um *endpoint* relacionado às taxas de filtração também é uma alternativa de mapeamento de efeitos deletérios de contaminantes. A filtração, por ser uma das estratégias alimentares mais disseminadas em invertebrados aquáticos, realizada através da mobilização de apêndices específicos, pode ser prejudicada pela exposição à contaminantes com ação neurotóxicas quando em doses subletais, comprometendo a movimentação destas estruturas alimentares, coordenadas fundamentalmente através do sistema nervoso, resultando em imobilidade e diminuição de coordenação destas estruturas, impactando negativamente as taxas de filtração dos indivíduos e ocasionalmente levando à inanição (BOYD, 2002).

Ainda, alguns contaminantes podem levar a diminuição das taxas de filtração devido à adesão de partículas em estruturas alimentares, dificultando a mobilidade destas estruturas (STRATTON; CORKE, 1981; DAY; KAUSHIK, 1987) em prejuízos diretos nos processos alimentares destes invertebrados.

Em resposta ao estresse, os organismos comumente aumentam sua taxa metabólica e consumo de energia em respostas compensatórias que envolvem o sistema endócrino, com finalidade de aumentar a probabilidade de sobrevivência, e, em alguns casos, aumentando também seu repertório comportamental. Os processos de reprodução, fundamentalmente ligados ao sistema endócrino, os contaminantes afetam comportamentos pré-copulatórios e copulatórios (e.g.: LINDEN; 1976), inibindo a reprodução de organismos (e.g.: RODRÍGUEZ; MEDESANI; FINGERMAN, 2007), consequências estritamente relacionadas à conservação de espécies. A classe de contaminantes de maior relevância neste caso são os disruptores endócrinos, responsáveis por mimetizar ou inibir o funcionamento hormonal adequado (DEPLEDGE; BILLINGHURST, 1999).

O estudo do comportamento de locomoção é atrativo pois pertence à uma função comum e vital encontrada em todos os táxons, e em função dos diferentes graus de complexidade presentes nesta atividade (e.g.: natação espontânea ou em função da alimentação e/ou de interações (DELL'OMO, 2002) poder ser quantificadas e automatizadas através de análises de imagem (GEHARDT, 2007), fornecendo diversas interpretações dos efeitos e dos modos de ação de substâncias tóxicas (CHEN; LIN; TSENG, 2011; DENOËL et al., 2013), em oposição à histórica incipiência de ferramentas de fácil utilização para mensurar alterações comportamentais na locomoção (e.g.: sistemas automatizados de aquisição de imagens), entretanto nos anos recentes, houve uma considerável disponibilidade destas tecnologias para quantificação locomotora (LV et al., 2013).

Como visto, a atividade de locomoção (ou natatória) é fundamental em muitos organismos. As alterações de movimento podem ser utilizadas adequadamente como um caráter para avaliação de toxicidade (e.g.: CAIRNS et al., 2002; UNTERSTEINER; KAHAPKA; KAISER, 2003; MAGILLO; FAIMALI; GERACI, 2003, GOTO; HIROMI, 2003; FLEEGER; CARMAN; NISBET, 2003) por incluir padrões

sensíveis e mensuráveis de respostas aos contaminantes (i.e.: duração de movimentos, velocidade e distâncias percorridas), sugerindo sua aplicabilidade na detecção da toxicidade de substâncias (CALFEE et al., 2016). A mudança na locomoção de invertebrados é uma das respostas constantemente utilizadas dentro da ecotoxicologia aquática, onde a maioria dos estudos tem por objetivo investigar e estabelecer os aspectos natatórios observados como resposta aos contaminantes (FAIMALI et al., 2017).

As alterações nas locomoções de organismos expostos de forma aguda ou crônica aos contaminantes culminam em distúrbios fisiológicos no sistema nervoso, expressas pela perda de orientação da natação (BOWNIK, 2017), percepção, cognição ou da total função motora (DELL'OMO, 2002). Em alguns casos, os contaminantes podem favorecer o acúmulo da enzima AChE alterando o comportamento de locomoção através da interrupção de coordenação do sistema nervoso nos invertebrados e da ligação neurológica entre músculos e sistema nervoso nos vertebrados (GOLOMBIESKI et al., 2008).

Os efeitos da contaminação (natural ou antropogênica) na comunidade podem ser traduzidos através dos estudos da alteração de locomoção (e.g.: KIMMERER; GROSS; MACWILLIANS, 2014) e suas implicações em escalas populacionais e de comunidade, conforme demonstrado por Dodson; Hanazato, (1995), Boyd et al., (2002), Goto e Hiromi (2003) e Michalec et al., (2013).

2.2 Endpoints em microcrustáceos aquáticos

Os estudos comportamentais empregando contaminantes em microcrustáceos geralmente avaliam modificações na velocidade de natação (BAILLIEUL; BLUST, 1999), mudanças de orientação durante as trajetórias e processos de hiperatividade (SULLIVAN et al., 1983).

Os efeitos danosos de contaminantes também são expressos através da diminuição da habilidade natatória e da duração de movimentos horizontais (PAN et al., 2017), aumento da velocidade natatória (COHEN et al., 2014) e da frequência de escape (SEURONT, 2010).

De acordo com Alyuruk e colaboradores (2013), os *endpoints* baseados na locomoção possuem a vantagem de diminuir a interferência de fatores subjetivos

que prejudicam a confiabilidade dos resultados de toxicidade, como por exemplo, a determinação precisa nas taxas de mortalidade, uma vez que um organismo classificado como imóvel ainda assim pode ainda estar vivo.

As exposições prolongadas à baixas concentrações de contaminantes por vezes não são capazes de provocar mortalidade em organismos, e por este motivo, os testes convencionais de letalidade e mortalidade possuem relevância ecológica questionável (KRANG, 2007; HENRY et al., 2012).

Os organismos-modelo de estudos comportamentais geralmente são afins aos utilizados na ecotoxicologia, integrando os grupos de moluscos, crustáceos e equinodermos, devida sua vasta distribuição, facilidade no cultivo e manutenção em laboratório, além do curto ciclo de vida, aumentando a abrangência dos aspectos observados em estudos (DE PAIVA MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Para a revisão dos estudos utilizados na sessão “*A aplicação de endpoints nos invertebrados aquáticos*” (ver página 39) foram contabilizados 46 estudos encontrados nas bases de busca do *Google Scholar*, *Web of Science* e *Science Direct*. Os estudos foram concentrados em exposições aos compostos no meio aquático, já que diferentes meios de exposição podem influenciar nos comportamentos exibidos pelos organismos (GEHARDT, 2007).

A metodologia de busca foi feita baseada na revisão de Melvin e Wilson (2013). As seguintes combinações entre palavras-chave de busca foram: “*behavior*”, “*behavioral*”, “*ecotoxicology*”, “*swimming*”, “*movement*”, “*invertebrates*”, “*microcrustaceans*”, “*exposure*”, “*effects*”, “*pollutants*” e “*contaminants*”. A escolha das palavras foi fundamentada nos termos mais utilizados por autores da área de ecotoxicologia comportamental (*behavioral ecotoxicology*), procurando incluir o grupo de organismos tema desta revisão (invertebrados, considerando o ambiente aquático), o *endpoint* de interesse de estudo (comportamento natatório) e as substâncias aplicadas para a determinação de toxicidade (contaminantes ou poluentes). Os termos “*exposure*” e “*effect*” foram utilizadas para gerar maior especificidade na busca de trabalhos que avaliam os *endpoints* comportamentais frente ao uso de substâncias possivelmente tóxicas.

Para cada combinação de termos, a revisão restringiu-se nos primeiros 100 artigos encontrados em literatura, excluindo-se revisões, já que a proposta da

presente revisão foi analisar os resultados comportamentais obtidos através de exposições à diferentes contaminantes descritos em literatura. Cada combinação foi utilizada em todos os buscadores. Ao todo, 10 combinações de palavras-chave foram feitas e 46 trabalhos foram resultantes das buscas.

As combinações de palavras-chaves para a pesquisa foram: “*ecotoxicology and behavior*”, “*swimming behavior and ecotoxicology*”, “*swimming behavior and effects*”, “*exposures to contaminants and invertebrates*”, “*ecotoxicology and swimming behavior*”, “*pollutants effects and swimming*”, “*contaminants and swimming and invertebrates*”, “*swimming and invertebrates*”, “*pollutants swimming invertebrates*”, “*swimming effects contaminants*”, “*behavioral effects contaminants*” e “*contaminants and swimming*”.

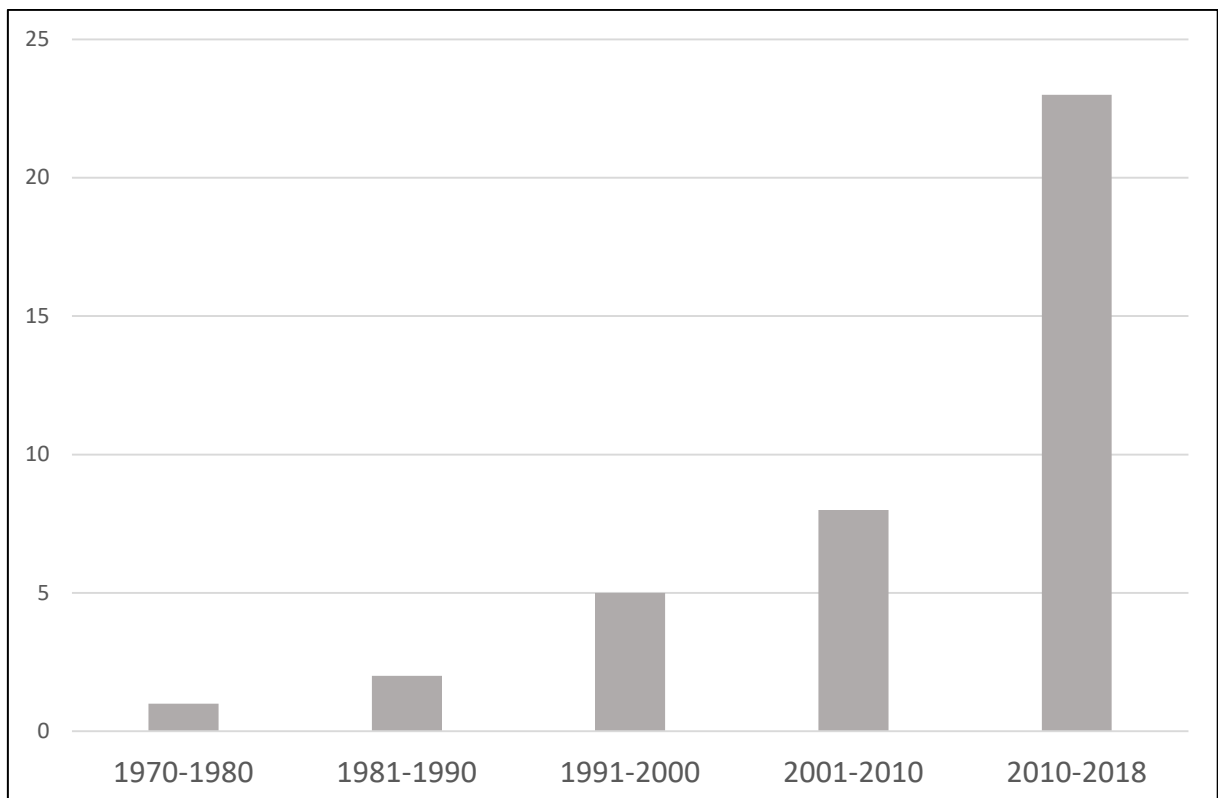
No que se refere à variação temporal dos estudos encontrados, as buscas pelos trabalhos foram estratificadas por décadas, isto é, foram criadas classes de anos para cada combinação de palavras, totalizando cinco classes temporais: (1) 1970-1980, (2) 1981-1990, (3) 1991-2000, (4) 2001-2010 (5) 2011-2018.

Após obter-se todos os trabalhos da base de dados, foram atribuídos pesos à cada classe de caracteres de inclusão dos estudos encontrados. O peso de número 1 é relacionado ao ano de publicação do estudo, sendo atribuídos “peso 1” aos estudos de 1970 a 2018. O peso de número 2 foi atribuído à classe de organismos enfocados no estudo revisado, sendo atribuído “peso 2” aos estudos que empregaram invertebrados aquáticos (marinhos e dulcícolas). Obteve peso de número os estudos que estiveram entre a classe geral de anos (1970-2018) que empregaram contaminantes em invertebrados aquáticos. O peso de número 4 foi atribuído à estudos que avaliaram alterações de locomoção e/ou natação como *endpoint*. O peso de número 5 referiu-se ao tipo de observação comportamental empregada (e.g.: visual, semi-automatizada e automatizada), sendo incluídos estudos que na seção de metodologia e/ou resultados esclareciam de forma clara a análise quantitativa do comportamento. De 46 estudos encontrados, apenas 39 estudos obtiveram pontuação máxima de 10 pontos, isto é, preencheram todos os caracteres de inclusão propostos e tiveram seus itens de metodologias, resultados e discussão revisados, permitindo a apresentação da aplicação de *endpoints* em testes ecotoxicológicos comportamentais e demonstrando a relevância destes estudos para o conhecimento dos efeitos deletérios na biota aquática. O grupo dos

microcrustáceos tiveram a maior incidência de estudos, representando 74,35% dos estudos incluídos na seção 4 desta revisão (ver página 39).

Os caracteres de inclusão foram escolhidos por atenderem ao período que vai desde o aparecimento da avaliação comportamental dentro da ecotoxicologia (segundo literatura disponível) até os estudos mais atuais. Os estudos com invertebrados aquáticos foram selecionados por preencher a proposta de dar enfoque neste grupo presente na ecotoxicologia clássica. Os contaminantes empregados foram entendidos como substâncias que alteram o comportamento de locomoção de invertebrados aquáticos em diversos níveis. O tipo de alteração comportamental foi um caráter de inclusão importante, já que a presente revisão pretendeu tratar das alterações de locomoção.

Gráfico 1. Representação da distribuição temporal dos estudos revisados empregando comportamento de natação de invertebrados aquáticos como *endpoint* de toxicidade no período de 1970-2018.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

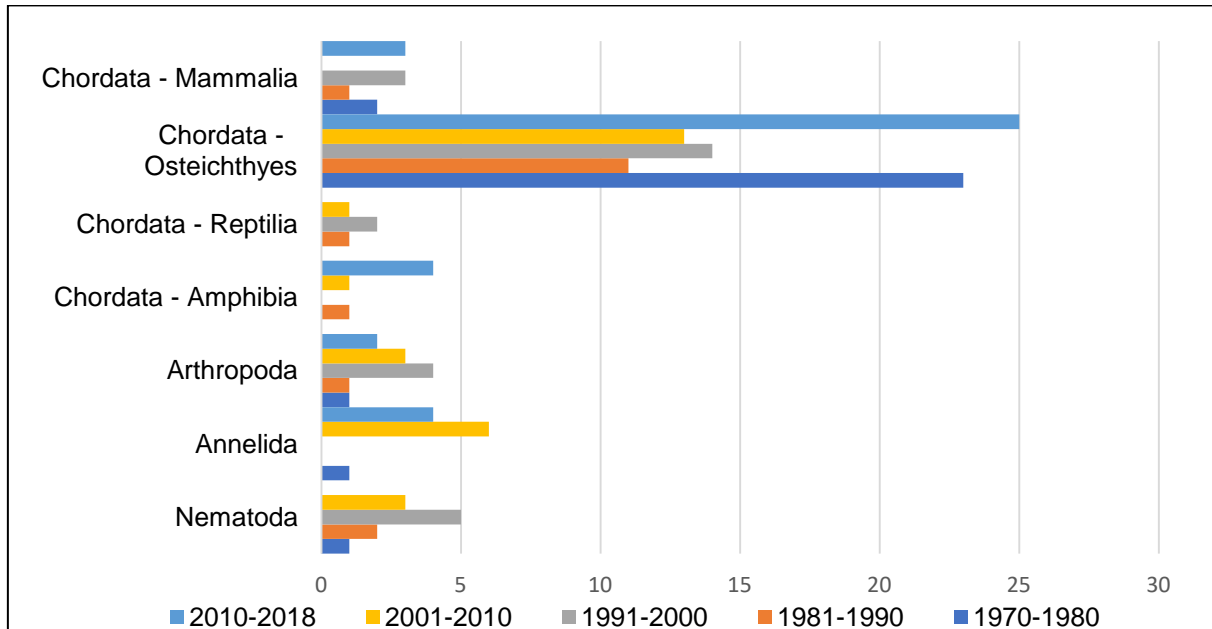
Como demonstrado, os estudos comportamentais empregando invertebrados estão tendo maior frequência em literatura, com trabalhos que utilizam a natação

como *endpoint* válido. Estes estudos frequentemente são complementados pela análise de toxicidade aguda (LC_{50}), fornecendo comparações entre as respostas comportamentais e as taxas comumente obtidas em estudos ecotoxicológicos clássicos. Desta forma, os estudos comportamentais publicados podem integrar as diferentes classificações de toxicidade, produzindo resultados mais abrangentes, passíveis de serem instituídos replicados e instituídos na avaliação de toxicidade de regulamentos e diretrizes.

A utilização da visão computacional e do imageamento como tecnologias aplicadas à observação do comportamento natatório, principalmente de organismos menores pertencentes à comunidade planctônica, tem papel fundamental na expansão destes estudos (GEHARDT, 2007), permitindo não só a obtenção de imagens dos *endpoints* obtidos quando organismos são expostos aos compostos, mas também a sua quantificação, colaborando com o contínuo crescimento de publicações científicas acerca do tema. A utilização de imagens do comportamento de organismos que se locomovem em pequenas escalas pode elucidar padrões de comportamentos ainda não observados, limitados anteriormente pela observação visual dos operadores de experimentos comportamentais, reduzindo a possível relatividade dos dados produzidos. A importância das imagens como forma principal de acessar os *endpoints* de toxicidade também está presente em sistemas de biomonitoramento de qualidade água, propostos para grupos de crustáceos e peixes.

Para elaboração do gráfico 2, referente à distribuição temporal dos estudos de comportamento por grupo taxonômico, foram utilizadas as bases de dados do *Google Scholar* e *Web of Science*. Foram feitas três combinações de palavras-chaves de busca: “*behavioral ecotoxicology*”, “*behavior endpoint*” “*behavior and endpoint*”. As combinações foram escolhidas por incluir o maior número de respostas comportamentais testadas, sem restringir apenas à respostas na natação e/ou locomoção. Todas as combinações foram utilizadas em ambos buscadores, sendo estratificadas por classes de anos, conforme a legenda apresentada no gráfico. Para cada estratificação de ano, foram revisados os 100 primeiros trabalhos resultantes da busca de cada combinação de palavra-chave.

Gráfico 2. Distribuição temporal dos estudos empregando comportamento de organismos como *endpoint* de toxicidade de substâncias conforme trabalhos publicados entre 1970-2018 na base de dados do *Google Scholar* e *Web of Science*.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

A ampla utilização da classe de peixes ósseos (*Osteichthyes*) em estudos ecotoxicológicos comportamentais é atribuída à familiaridade do emprego deste grupo em testes ecotoxicológicos convencionais na avaliação de toxicidade de contaminantes como pesticidas organoclorados e metais. Como bioindicadores sensíveis de qualidade ambiental, possuem relativa frequência e disponibilidade de obtenção, facilidade de cultivo e manutenção dos organismos em laboratório, hábitos alimentares conhecidos e importância econômica e ecológica (RAND; PETROCELLI, 1985). Frequentemente tem-se uso de espécies de peixes como *Danio rerio* e *Oncorhynchus mykiss* e do gênero *Pimephales* para ensaios de toxicidade, colocando-os como o grupo de vertebrados de maior utilização dentro da ecotoxicologia aquática (RAUNBECK; HINTON; STREIT, 1998). Comparativamente aos microcrustáceos, principalmente em relação ao tamanho, as possibilidades de estudos histopatológicos e hematológicos são maiores e, as técnicas de estudo, conhecidas e derivadas da medicina humana. A publicação de trabalhos científicos integrando o comportamento à todas as outras modalidades de análise de toxicidade

(e.g.: letalidade, acumulação tecidual de compostos, biomarcadores) podem indicar também a maior frequência de trabalhos encontrados para o grupo de peixes em função da integração de metodologias de avaliações de toxicidade ao comportamento. A maioria destes estudos é concentrada nos endpoints de natação, atividades de ventilação opercular e forrageamento. Através do estudo da contaminação aquática empregando este grupo, respostas em níveis organizacionais podem ser acessadas à partir de interferências em respostas biomecânicas e fisiológicas que possuem impacto em padrões de diversidade e distribuição das populações. As respostas comportamentais provocadas pelas exposições aos contaminantes incluíram danos genéticos, enzimáticos e de desenvolvimento nos organismos.

A quantidade de trabalhos encontrados foi restrita (46 trabalhos) quando a especificidade da pesquisa foi maior, isto é, quando foram restringidas as respostas comportamentais avaliadas nos estudos em apenas *endpoints* de toxicidade refletidos na natação (*swimming endpoints*) de invertebrados aquáticos, onde utilizaram-se 10 combinações de palavras-chaves específicas, anteriormente apresentadas. O termo “*swimming*” foi frequente em títulos dos estudos revisados.

Em função do desenvolvimento das técnicas de imageamento, da abundância de organismos zooplânctônicos nos ambientes aquáticos e rapidez na obtenção de respostas de sensibilidade deste grupo aos contaminantes, encontram-se com maior frequência em literatura estudos dos efeitos comportamentais de compostos em (1) copépodos de diversos estágios de vida (náuplio, copepodito I a V, e indivíduos adultos), (2) rotíferos, (3) cladóceros e (4) larvas de crustáceos sésseis e planctônicos (e.g.: cracas, artemias).

Copépodes marinhos são amplamente utilizados na ecotoxicologia para avaliação de mortalidade (e.g.: BREITHOLTZ; WOLLENBERGER, 2003), dos efeitos crônicos de contaminantes em gerações e desenvolvimento de organismos (e.g.: D'AGOSTINO; FINNEY, 1974), viabilidade de ovos (e.g.: TESTER; COSTLOW, 1981), reprodução e taxa de crescimento populacional (e.g.: BEJARANO; CHANDLER, 2003) e também empregados como organismos-modelo dentro das investigações comportamentais frente aos estressores químicos (e.g.: CAILLEAUD et al., 2011; MICHALEC et al., 2013; KADIENE et al., 2017).

Os rotíferos são empregados em testes de ecotoxicologia devido ao papel ocupado dentro da dinâmica ecossistêmica em ambientes marinhos e dulcícolas, tendo a sua fase sexuada produzida através de cistos testada quanto sua viabilidade e mortalidade (SNELL; JANSSEN, 1995) à compostos como cobre e benzeno (SNELL; PERSONE, 1989), sendo também comuns o uso de pesticidas e metais (MARCIAL; HAGIWARA; SNELL, 2005). No contexto comportamental, rotíferos já foram testados para se obter respostas estressoras na locomoção frente ao dimetoato (acaricida) (GUO; REN; REN, 2012), cobre e lindano (JANSSEN; FERRANDO; PERSOONE, 1994; CHAROY et al., 1995).

Cladóceros tem seu uso dentro dos testes de toxicidade (e.g.: mortalidade, letalidade, imobilidade) descritos em literatura ao longo dos anos de desenvolvimento desta ciência (e.g.: BIESINGER; CHRISTENSEN, 1972; ENSERINK; MAAS-DIEPEVEEN; VAN LEEUWEN, 1991; TEODOROVIC et al., 2009; BLINOVA et al., 2013). O gênero *Daphnia* é amplamente utilizado em ensaios comportamentais para os compostos como pesticidas organoclorados, metais e no monitoramento online (e.g.: JANSSEN; RODRIGO; PERSOONE, 1993; MICHELS; SEMSARI; MEESTER, 2000; BARATA et al., 2006; REN; WANG, 2010) devido sua representatividade no zooplâncton dulcícola, expressando respostas sensíveis em relação à letalidade e imobilização, bem como alterações de locomoção e alimentação quando exposto aos contaminantes.

As larvas de moluscos e crustáceos sésseis e planctônicos são testadas tanto na ecotoxicologia como também nas observações comportamentais compostos tóxicos, com frequentes respostas de alteração na atividade natatória e na atividade de fechamento de valvas no caso de moluscos (DODSON et al. 1995; LOTUFO et al., 1997; SHIMIZU et al., 2002; WALLACE; ESTEPHAN., 2004; AYAD; FDIL; MOUABAD, 2011; SIMPSON et al., 2012; HAZELTON et al., 2014; MANFRA et al., 2016; MORGANA et al., 2018).

3. OBSERVAÇÃO DE *ENDPOINTS* COMPORTAMENTAIS

Os *endpoints* comportamentais podem ser observados com diversas técnicas à partir de configurações adequadas. Para isto, ao longo do desenvolvimento de testes comportamentais, sistemas com a finalidade de quantificar aspectos das trajetórias dos organismos são desenvolvidos com especificidades diferenciadas,

que variam de acordo com os objetivos das observações (e.g.: CAILLEAUD et al., 2011; BRADLEY et al., 2013) e, em razão do progresso dos sistemas de imageamento e das técnicas computadorizadas, atualmente é possível a observação de *endpoints* válidos que indiquem toxicidade, interpretados à partir de uma variedade de modelos físicos e matemáticos usados para estimar a resposta de *endpoints* de avaliação em função de exposições químicas (BRADBURY, 1995).

O avanço no funcionamento das câmeras de vídeo tem possibilitado alcançar altos níveis de acurácia durante a reconstrução de padrões das trajetórias de natação (BIANCO et al., 2013). Apesar da obtenção de trajetórias tridimensionais dos organismos ser complexa (MICHALEC et al., 2012) e necessitar de sistemas específicos, ela fornece informações mais precisas (DUR et al., 2011) que as técnicas de reconstrução bidimensionais, mais simples, no entanto permitindo o registro de um número maior de trajetórias, provendo valores reais para métricas como velocidade, porém sobrestimando os valores para locomoções como o afundamento e *looping* (KIORBOE; BAGOIEN, 2005).

A utilização destas técnicas possibilita quantificar a capacidade de uma espécie em explorar os recursos alimentares necessários à sua sobrevivência (HELENIUS; SAIZ, 2017) e identificar as estratégias de forrageamento e reprodução, intrinsicamente condicionadas à locomoção (VAN SOMEREN GREVE; ALMEDA; KIORBOE, 2017), além de indicar possíveis alterações no comportamento padrão destas atividades.

3.1 Sistemas de observação

Conforme a classificação de Faimali et al. (2017), as técnicas para acessar o comportamento natatório de invertebrados aquáticos expostos à substâncias potencialmente tóxicas podem ser divididas em 3 classes principais: (1) manual, (2) automatizada e (3) semi-automatizada.

As técnicas manuais dependem diretamente da observação do operador, observando, por exemplo, as distâncias percorridas por organismos no ambiente de teste em um dado tempo de exposição (e.g.: WAHAB; DE NYS, R; WHALAN, 2011). A partir dos sistemas automatizados gravações em 2D ou 3D são possíveis utilizando-se câmeras e lentes de diferentes especificações, e frequentemente, as câmeras estão acopladas à sistemas de microscópios, permitindo a maior

visualização de detalhes das alterações natatórias (e.g.: MCALLEN; TAYLOR, 2001). A última categoria é referente aos sistemas semi-automatizados, obtendo-se gravações de deslocamento em 3D (e.g.: HUANG et al., 2016).

Dentro dos sistemas manuais pode-se empregar vídeo câmeras (WALLACE; ESTEPHAN, 2004) ou apenas a observação direta do comportamento de locomoção dos organismos. Evidentemente, o uso de câmeras auxilia no registro das alterações comportamentais que o operador do experimento estiver visualizando, no entanto, para algumas metodologias, o uso da câmera fica restrito em função de suas configurações (e.g.: experimentos realizados sob baixa luminosidade). Além disto, uma desvantagem deste método é a subjetividade da quantificação do comportamento de locomoção, dependente do operador.

Os sistemas automatizados podem incluir câmeras digitais (e.g.: SEURONT et al., 2010), microscópios com câmeras acopladas (e.g.: AMSLER et al., 2006) ou câmeras e sistemas de *video-tracking* acoplados à computadores que já possuam em suas configurações sistemas que permitam o imageamento dos organismos com possíveis alterações natatórias (e.g.: ALYURUK et al., 2013). Este tipo de formulação elimina a desvantagem da primeira classe, permitindo também o registro automatizado do comportamento natatório que diminui consideravelmente o tempo de análise de dados, tornando a tarefa do operador em analisar sequências de vídeos e imagens, as vezes com movimentos impossíveis de serem captados pelo olho humano, menos tediosa e sobretudo fornecendo dados quantitativos de possíveis alterações natatórias mais confiáveis. Neste método, encontram-se desafios como o custo dos sistemas de imageamento e o desenvolvimento de sistemas de *video-tracking* adequados aos organismos do estudo e à metodologia proposta. À partir dos vídeos e fotografias geradas, o comportamento de locomoção pode ser quantificado através da análise de trajetórias por *softwares* que reconhecem as imagens 2D e/ou 3D (*video-frames*). Cada imagem possui eixos de orientação compostos por *pixels* (X,Y e X,Y,Z). Os valores de métricas natatórias que identificam alterações comportamentais (e.g.: velocidade instantânea, *turning angle*, dimensão fractal) podem ser estimadas à partir da posição dos organismos nos *pixels* de sucessivas imagens e as trajetórias de deslocamento dos organismos reconstruídas. São exemplos de sistemas automatizados o “*Swimming Behavioral Recorder (SBR)*” (GARAVENTA et al., 2010) e o “*Ethovision*” (RAO et al., 2007).

Os “*Biological Early Warning Systems*” (e.g.: VAN DER SCHALIE et al., 2001; BAE; PARK, 2014) são sistemas automatizados desenvolvidos para detectar mudanças induzidas por s presentes em amostras de água através de diversos parâmetros do comportamento natatório (BOWNIK, 2017). Os biosensores baseados em parâmetros comportamentais de organismos para a detecção de mudanças toxicológicas no ambiente tem funcionamento automatizado semelhante, através da aquisição de imagens em tempo real (TAHEDL; HADER, 2001).

Os sistemas semi-automatizados estão disponíveis desde 2008 e são baseados na conversão da captura de vídeo-frames capturados em sistemas ópticos em trajetórias 3D utilizando softwares específicos como o “3D particle tracking velocimetry” (MICHALEC et al., 2013) ou adaptando softwares originalmente de outras áreas de estudo como o MATLAB (BEHAULIEU et al., 2015) nestas reconstruções de trajetórias. Neste método de observação comportamental são necessárias estruturas mais complexas como a montagem de sistemas ópticos que empregam fontes luminosas como LEDs, lentes colimadoras de diferentes aumentos e câmeras, para que a locomoção de organismos teste seja gravada e as trajetórias reconstruídas. Ainda, diferentemente dos outros métodos anteriormente citados, os sistemas semi-automatizados requerem que os dados gerados tenham um pós-processamento em outras plataformas, aumentando o tempo e o custo das análises. No entanto, a utilização de sistemas semi-automatizados permite a personalização dos *set-ups* de sistema óptico, adequando o sistema de aumento e a velocidade de captura dos frames ao organismo e aos *endpoints* que se deseja observar. A exemplo, Bianco et al., (2013) utilizou scripts de linguagem de programação (C++) para reconstruir trajetórias em 2D capturadas com lentes telecêntricas e transformá-las em 3D; posteriormente, os autores processaram estas trajetórias 3D visando calcular a velocidade de cada trajetória realizada por *Clausocalanus furcatus* utilizando scripts do software Java.

4. A APLICAÇÃO DE *ENDPOINTS* NOS INVERTEBRADOS AQUÁTICOS

Em um ambiente aquático e tridimensional, os movimentos padrões de organismos podem ser caracterizados por uma variedade de métricas, incluindo (1) a distância percorrida pelo organismo, (2) a duração do movimento, (3) velocidade de locomoção, (4) diferenças na orientação da locomoção em um dado espaço e (5)

complexidade do movimento (SEURONT; BREWER; STRICKER, 2003), além disto, são *endpoints* relacionados à locomoção a observação direta de movimentos de estruturas morfológicas, como apêndices em microcrustáceos e valvas em moluscos.

Os *endpoints* comportamentais geralmente observados em microcrustáceos marinhos são baseados em respostas de escape, combinações entre períodos de agitação e imobilidade (e.g. BRADLEY et al., 2013) e movimentos de afundamento na coluna de água (BIANCO et al., 2013) durante os episódios de exposição aos contaminantes, que variam conforme o composto testado.

As alterações quantificadas nas características padrões de locomoção são reflexo das mudanças induzidas por compostos, sobre sistemas sensíveis a toxicidade (e.g.: sistema nervoso ou endócrino) (BOWNIK, 2017).

A locomoção através da natação é um dos processos fundamentais para microcrustáceos aquáticos, diretamente dependente da aceleração, uma reação essencial durante este mecanismo em ambientes aquáticos (DANIEL, 1984) e, por este motivo, as alterações comportamentais observadas após exposição aos contaminantes usualmente estão ligadas ao aumento ou diminuição de atividade natatória e a velocidade de natação (FAIMALI, 2006).

Segundo Charoy e Jansen (1999), as mudanças na velocidade de natação de invertebrados tem grande importância nos efeitos indiretos em comunidades marinhas e dulcícolas de invertebrados, como por exemplo a pressão predatória de topo de cadeia, a pressão predatória do zooplâncton e a abundância de fitoplâncton.

A quantificação da distância percorrida por um organismo pode ser um *endpoint* válido no sentido de mensurar como o indivíduo explora o ambiente, tendo reflexo na ecologia dos organismos, já que processos como a reprodução e alimentação dependem, sobretudo, da distância que podem percorrer no ambiente aquático em busca de parceiros e durante o forrageamento.

A orientação e complexidade do movimento podem ser medidas através de índices quantitativos de NGDR e do *turning angle*. O NGDR é a relação entre todos os pontos percorridos pelo organismo em uma trajetória com o ponto inicial e final desta. O *turning angle* dá informações a respeito da orientação do organismo entre

sucessivos movimentos (SEURONT; BREWER; STRICKER, 2003). A dimensão fractal é uma métrica natatória também utilizada para analisar dados de complexidade da locomoção. As métricas de velocidade natatória em invertebrados aquáticos geralmente são mensuradas em milímetros por segundo ($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$), sendo expressas usualmente em velocidade média de natação e velocidade instantânea de natação (num dado instante de seu movimento).

A observação direta dos organismos testados pelo operador do experimento também pode fornecer estas informações de maneira qualitativa ou quantitativa, dependendo da metodologia empregada em cada forma de observação comportamental (e.g.: distância percorrida por um molusco em placas de teste onde o organismo está exposto à substâncias tóxicas). Toda quantificação comportamental (*endpoints*) tem como objetivo demonstrar o efeito dos contaminantes nos organismos, bem como permitir a comparação dos dados encontrados ante ao uso destes aspectos de maneira válida e relevante em experimentos.

Sullivan et al. (1983) comparou os efeitos de doses subletais de cobre e cádmio na natação e no desenvolvimento de náuplios do copépode calanóide da espécie *E. affinis*. As diferenças de velocidade de natação foram evidentes após 24 horas de exposição em todas as concentrações testadas de cobre ($10\text{-}50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto que o desenvolvimento dos náuplios só foi reduzido após 96 horas de exposição na concentração de $25\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para o cádmio, o desenvolvimento só foi reduzido após 48 horas de exposição a $116\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto as alterações natatórias significativas foram percebidas após 24 horas de exposição à $130\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Na menor dose de cobre ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), episódios de hiperatividade dos náuplios foram observados e perduraram até 72 horas de exposição ao cobre, no entanto, a mesma concentração não provocou a mortalidade nem impactos negativos sobre a taxa de crescimento dos indivíduos testados após 96 horas de exposição, reforçando o uso do comportamento como alerta inicial de futuros prejuízos do contaminantes aos organismos. O cádmio provocou respostas de hipoatividade significativas refletidas na redução de velocidade dos organismos.

O comportamento de fêmeas do copépode calanóide *C. hamatus* foi reportado por Anderson e Mackas (1986) apud Cowles (1983) na presença de óleo cru (80 PPB) resultando na redução da natação associada à alimentação. A

toxicidade do óleo alterou consideravelmente a percepção alimentar dos organismos e sua habilidade natatória durante o forrageamento.

O anfípode *Monoporeia affinis* teve suas mudanças comportamentais estudadas por Lindstrom e Lindstrom (1980) em resposta à exposição de 4-clorofenol e estireno. Na concentração de estireno a 35 PPM a atividade dos organismos reduziu-se a zero no momento da inserção do contaminante. Durante 4-5 dias os organismos nadaram vagarosamente, perdurando os efeitos agudos do composto. A dez PPM de 4-clorofenol, os organismos tiveram sua atividade locomotora aumentada significativamente após a inserção do contaminante, mas esta resposta não perdurou nos dias seguintes de experimento. A heterogeneidade dos comportamentos, depende, sobretudo, do modo de ação do contaminante.

O rotífero *Brachionus calyciflorus* foi exposta ao cobre, PCP, DCA e ao lindano por Jansen, Ferrando e Persoone (1994). Para cada composto, as EC_{50} na velocidade natatória reduziram gradualmente em relação aos controles em função do tempo de exposição, chegando à valores não-significativos após a segunda hora de exposição. Após cinco minutos de exposição ao cobre ($250 \mu\text{g.L}^{-1}$) houve uma redução de 49% da capacidade de natação dos rotíferos. Os os valores de 3h- CE_{50} foram inferiores aos de 24h- LC_{50} para todos os compostos, isto é, os efeitos significativos prejudiciais provocados pelos compostos orgânicos foram percebidos com 21 horas de diferença entre os ensaios comportamentais e a determinação de toxicidade aguda clássica.

Charoy et al. (1995) expos neonatas do rotífero *B. calyciflorus* aos mesmos compostos propostos acima. Segundo autores, pode-se confirmar que a EC_{50} provinda da análise de comportamento foi mais sensível que os resultados provindos dos testes ecotoxicológicos de mortalidade. A exemplo, ainda que para o cobre a sensibilidade dos testes agudos ($LC_{50} = 26,0 \text{ mg.L}^{-1}$) seja comparada aos testes comportamentais ($EC_{50} = 28,16 \text{ mg.L}^{-1}$), ficou claro que duas horas de exposição é um tempo inferior para se alcançar a mesma sensibilidade dos testes de letalidade realizados sob exposição de 24 horas (LC_{50}) para monitoramento de alterações. Para este composto, a velocidade de natação diminuiu em até 41,5% na maior concentração, sendo uma resposta dose-dependente do contaminante. Para PCP, a tortuosidade da locomoção foi aumentada, bem como a velocidade de natação, que aumentou em 47% na maior concentração de PCP. Para o orgânico lindano, a

velocidade e o tempo gasto em natação diminuíram, bem com a tortuosidade da locomoção. Para DCA, o período gasto em natação caiu drasticamente de (600 segundos para 80 segundos em 80 mg.L⁻¹). Todos os compostos afetaram negativamente os organismos, fazendo com que se locomovessem de forma alterada.

Preston, Snell, Dusenbery (1999) observaram as alterações de escape à predação em *B. calyciflorus* frente à exposição ao PCP. Como resultados encontraram a interrupção do comportamento de defesa do rotífero na presença de seu predador, o rotífero *Asplanchna girodi*, em razão do aumento da velocidade de natação, os expondo à maiores riscos de encontro com o predador. Na exposição a 0,19 mg.L⁻¹ após 30 minutos, o rotífero continuou com um significativo aumento de sua velocidade de natação mesmo sem a presença do predador, aumentando a chance de mortalidade em 47% comparativamente aos organismos-controle na presença do mesmo predador. Algumas substâncias orgânicas como o PCP induzem mudanças comportamentais como a hiperatividade, que aumentam em mais de 50% o risco de predação de *B. calyciflorus*. Neste caso, a relação interespecífica foi alterada após a aplicação de PCP. Em escalas populacionais, o aumento do risco de predação devido a mudanças na velocidade de natação induzidas por substâncias tóxicas pode ter efeito significativo sobre a mortalidade de rotíferos, influenciando diretamente na relação presa-predador.

As alterações na habilidade e orientação de natação do misidáceo *Neomysis integer* expostos à concentrações de metais-traço foram observadas por Roast, Widdows, Jones (2000). A 7d-LC₅₀ para o cádmio foi de 2,58 µg.L⁻¹, no entanto, a concentração de 0,5 µg.L⁻¹ foi capaz de prejudicar a capacidade motora dos organismos, podendo ter possíveis consequências no ambiente natural, como por exemplo a dificuldade em forragear em áreas com recursos alimentares suficientes e aumento da chance de predação. Conforme os autores, concentrações superiores à 0,5 µg.L⁻¹ permitem o deslocamento destes organismos para outras áreas que não as estuarinas, seu ambiente natural.

Lam, Wo e Wu (2000) demonstraram os efeitos do cádmio no comportamento natatório de larvas planctônicas do crustáceo sésil *Balanus amphitrite*. Os *endpoints* foram a velocidade curvilínea e velocidade linear de náuplios em estágio II. Após 24 horas de exposição à 1,0 mg.L⁻¹ do composto, as duas métricas tiveram

redução de seus valores. Em discussão, o decréscimo destas métricas pode refletir menor eficiência na captura de alimento e menor capacidade de exploração de ambientes para assentamento. Segundo Wu, Lam e Zhou (1997), os ensaios sensíveis para prever a influência de compostos na inibição de assentamento duram aproximadamente seis dias. No entanto, no presente trabalho, a significativa diminuição na velocidade natatória foi caracterizada como uma resposta mais sensível e rápida para prever este tipo de resposta comportamental, baseada no decréscimo de atividade natatória.

A espécie de craca *B. amphitrite* também tiveram alterações natatórias de suas larvas descritas por Magillo, Faimali e Geraci (2003) após exposição ao cloreto de cádmio. Uma significativa alteração de velocidade de natação foi encontrada na concentração de $0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que a mortalidade só foi estatisticamente significativa na concentração de $1,28 \mu\text{g.L}^{-1}$. A concentração que provocou a mortalidade dada pela 24h-LC_{50} foi de $4,19 \mu\text{g.L}^{-1}$; já para a inibição do comportamento natatório (24h-IC_{50}), a concentração necessária foi de apenas $0,853 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Wallace e Estephan (2004) observaram a suscetibilidade para os movimentos verticais e horizontais do crustáceo *Gammarus lawrencianus* expostos ao cádmio. A atividade natatória horizontal diminuiu com o aumento da concentração do composto em 50%. A atividade natatória vertical também foi alterada. Estes dados podem sugerir que a exploração do ambiente pelos indivíduos foi parcialmente prejudicada, tendo o composto a potencialidade de gerar impactos negativos quando em concentrações subletais.

Faimali et al. (2006) monitorou as alterações comportamentais em espécies de craca *B. amphitrite* expostas à biocidas de ação *antifouling*, metais e outros pesticidas. Os pesticidas methomil, methiocarbo e eserina não apresentaram efeitos nas médias de ensaios de mortalidade (LC_{50}), diferentemente da estimativa de alterações de velocidade natatória, comprovando os efeitos subletais destes contaminantes. Para todos os compostos, a velocidade foi alterada em apenas 24 horas de exposição. Neste caso, os valores das CE_{50} foram menores que os encontrados nos ensaios agudos. Para os biocidas, o monitoramento de atividade natatória foi mais sensível em uma ordem de magnitude que os ensaios agudos conduzidos com algas e moluscos, considerados mais sensíveis à esta classe de

componentes tóxicos. Este resultado é especialmente interessante, pois normalmente nos ambientes, os valores de LC_{50} são inferiores aos valores estimados em laboratório. A inibição de assentamento em resposta ao cobre foi encontrada após observação comportamental em três dias de exposição. Segundo Little e Finger (1990), de 1-5% dos valores de LC_{50} são capazes de provocar respostas comportamentais significativas. Testando o carbamato, a sensibilidade das alterações comportamentais provocou 95% de inibição de natação, enquanto que nos ensaios agudos com o mesmo componente a mortalidade foi de apenas 10%. Este dado sugere que o comportamento é mais efetivo na determinação de efeitos relevantes destes compostos na biota aquática. Ainda, a hormose foi um fenômeno plenamente capaz de ser demonstrado através da análise de velocidade natatória em indivíduos expostos. Neste trabalho, a velocidade natatória foi tratada através dos valores de velocidade da inibição natatória normalizados pela média da velocidade natatória apresentadas dos controles.

Seuront e Laterme (2007) observaram as alterações natatórias de curto prazo de copépodes da espécie *Centropages hamatus* ao naftaleno. Os *endpoints* utilizados para tal foram a velocidade natatória, velocidade de afundamento e a porcentagem de tempo alocado para natação, escolhidos respeitando o comportamento típico do organismo (com eventos de parada de natação seguidos de afundamento) durante 20 minutos de exposição ao contaminante. A porcentagem de tempo alocado para natação ativa caiu de 66-88% nas concentrações testadas, indicando diminuição de atividade natatória na presença do naftaleno. O decréscimo da complexidade das trajetórias também foi identificado pela estimativa de valores da métrica “*stress exponent*”. Biologicamente, seu decréscimo foi explicado à partir do dano fisiológico causado: as trajetórias tendem a ser mais complexas em situações onde não há estresse químico. Durante as situações contaminação, não há energia disponível e a complexidade dos deslocamentos tende a ser reduzida.

A espécie de anfípoda *Corophium volutator* foi empregado por Kienle e Gehardt (2008) para elucidar as alterações comportamentais após 2 horas de exposição à frações solúveis de hidrocarbonetos e dispersantes. Estes organismos apresentaram hiperatividade natatória ligada à resposta de escape/evitação após a exposição à menor fração (25% de diluição). Para a fração de diluição de 100%, sinais claros de narcose foram encontrados (organismos imóveis no fundo dos

aquários ou em baixa atividade locomotora) e, em função da variabilidade de respostas comportamentais na maior fração testada, não se encontrou diferenças estatisticamente significativas entre a concentração e o controle. No entanto, para a menor fração testada (25%) caracterizada por ser uma concentração subletal, a resposta estressora traduzida no aumento de atividade natatória foi unânime e suficiente para indicar efeitos comportamentais. À partir destes dados, sugere-se que concentrações subletais podem preceder efeitos irreversíveis à biota em um curto período de tempo de forma confiável.

Seuront (2010) testou o comportamento de copépode calanóide *Temora longicornis* após exposição à fração solúvel de óleo diesel (hidrocarboneto) após 15 minutos de exposição. Como resposta, 100% das fêmeas testadas apresentaram resposta de escape às manchas de contaminação em todas as concentrações testadas. A taxa de *turning angle* foi significativamente maior nas áreas com presença de contaminante, diretamente relacionada aos movimentos de fuga. Foi sugerido que organismos planctônicos passam menos tempo em áreas contaminadas, aumentando de forma proporcional sua resposta de escape frente ao aumento das concentrações de compostos. O tempo curto de exposição e as baixas concentrações detectadas pelas fêmeas em escape sugerem que a natação pode ser uma forma eficiente e rápida de se acessar os efeitos agudos adversos dos hidrocarbonetos.

O comportamento de copépodos calanóides *Labidocera aestiva* foi testado por Cohen et al. (2013) empregando dispersante de óleo (Corexit EC9500A e CEWAF) e óleo cru (MC-252). O efeito de narcose foi proposto à partir da observação da migração de copépodos para o topo das cubetas de ensaio após 30 minutos de exposição, em resposta de fuga das manchas de contaminação. A exposição também causou redução da atividade natatória diretamente proporcional ao aumento do tempo e das concentrações dos compostos, sugerindo a rápida narcotização dos sistemas de percepção e motores destes organismos. O resultado mais evidente ficou para o MC-252 (10 mg.L⁻¹): organismos do controle nadavam a 12 mm.s⁻¹ e após 30 minutos de exposição ao composto reduziram suas velocidades para 4 mm.s⁻¹.

Seuront et al. (2011) observaram o efeito de hidrocarbonetos no decréscimo do sucesso reprodutivo do copépode calanóide *Temora longicornis* após uma hora

de exposição. A habilidade de machos detectarem trilhas químicas deixadas pelas fêmeas e realizar contatos físicos diminuiu em função do aumento da concentração do composto. A exemplo, na concentração mais alta do componente (1% de diluição), o sucesso de captura diminuiu em 45,5% (de 26 para 7 eventos observados), aumentando também o erro na detecção das trilhas químicas das fêmeas: de 41 eventos do controle, quatro foram os eventos onde trilhas químicas das fêmeas não seguidas pelos organismos. E em 39 eventos observados na concentração de 1%, 20 foram as trilhas químicas não seguidas pelos organismos expostos, provavelmente pela alocação de energia para compensar a fisiologia perturbada pelo composto. Na concentração intermediária (0,01%), os eventos de *mating* caíram de 41 do controle para 28 eventos na concentração, sugerindo severos impactos do contaminante no *fitness* da espécie.

Sha et al. (2014) analisaram as alterações comportamentais influenciadas pela presença PBDEs em *B. plicatilis*. Após 24 horas de exposição à 9,695 mg.L⁻¹ de BDE-47, os organismos tiveram sua atividade natatória inibida em mais de 50%, com velocidades natatórias abaixo dos 0,27mm.s⁻¹. Os resultados do experimento sugeriram a influência aguda do contaminante nas atividades natatórias do organismo em um curto período de tempo.

Gambardella et al. (2014) empregaram nanopartículas metálicas em microcrustáceos (*Artemia salina*) após 48 horas de exposição. Para todas as classes químicas de nanopartículas testadas, não foi possível a determinação da LC₅₀, pois constatou-se apenas 20% de mortalidade de indivíduos, mesmo em altas concentrações dos compostos. Já a EC₂₀ (0,08 mg.L⁻¹) pode ser calculada após 20 minutos de exposição às nanopartículas de cério. Como resultados, pode-se observar a diminuição da velocidade e inibição natatória pelo surgimento de inflamações mediadas pelo aumento da enzima colinesterase. Também se constatou a ingestão das partículas de cério pelas larvas, incapazes de excretá-las. Esta ingestão não causou mortalidade em 24 horas, no entanto, alterações de locomoção puderam ser percebidas, salientando a importância da abordagem comportamental na determinação de toxicidade.

Chen et al. (2014) empregou o rotífero pertencente à espécie *B. calyciflorus* para monitorar possíveis alterações de locomoção provindas do dimetoato após duas horas de exposição. A EC₅₀ encontrada neste estudo foram apenas 40,12% e

35,35% da EC_{50} do pesticida encontrada após 48 horas de exposição sobre a taxa de crescimento das duas espécies, respectivamente. Como resposta, observou-se o fenômeno denominado “hormese”, caracterizada pela conversão da concentração baixa, em estímulo e da concentração alta, em inibição, (KITCHIN, 2002) nas duas espécies testadas.

Ren et al. (2015) observou as alterações natatórias em *D. magna* expostas ao DDVP. Após 11 horas de exposição à concentração menor, a frequência de movimentação nos organismos aumentou, mediados pela inibição da enzima AChE, causando perda da habilidade nervosa, da coordenação e levando à graus de hiperatividade.

Chevalier et al. (2015) comparou a sensibilidade do menor valor de *endpoint* comportamental de velocidade natatória com o *endpoint* de imobilidade para o cladóceros *Daphnia magna* em compostos. Para sertralina, cafeína, sulfato de cobre e carbofuran a 24h- EC_{50} foi mais sensível que a taxa de imobilidade dos organismos após 48 horas de exposição. Para estes compostos, a resposta de efeito foi encontrada em até cinco horas de exposição. As concentrações de efeito causando imobilização para os compostos foram respectivamente 0,560; 177,8; 0,1754; 0,0182 $mg.L^{-1}$; já os valores-limite para observação de efeitos comportamentais foram respectivamente 0,0014; 25; 0,0279; 0,0107 $mg.L^{-1}$. Estes resultados sugerem que o comportamento pode ser utilizado como detecção de toxicidade destas substâncias. Em termos comportamentais, as respostas foram heterogêneas. Para sertralina, o comportamento de natação foi desacelerado ao longo das cinco horas de monitoramento, assim como no sulfato de cobre, uma vez que absorção do composto depende da especiação do metal, o que demanda tempo. Já na cafeína e carbofuran, a resposta de natação provocou intensos e rápidos movimentos, caracterizado pelo comportamento de fuga, devida a rápida absorção e transporte dos químicos nas membranas celulares.

Costa et al. (2015) testou diferentes metais no comportamento natatório de náuplios II de cracas *Amphibalanus amphitrite*, larva instar I de *A. salina* e rotíferos *B. plicatili*. Para a espécie *A. amphitrite* a alteração natatória foi de 50% a 70% maior em relação aos controles após 24 horas de exposição, confirmado o uso de náuplios para avaliação comportamental de toxicidade. Rotíferos tiveram sua resposta natatória hiperestimulada em doses baixas de cobre, ferro e zinco.

Os efeitos no padrão dos movimentos natatórios do cladóceros *D. magna* em resposta ao fulereno (C_{60}) foram propostos por Brausch et al., (2011). Neste estudo, a velocidade de natação dos organismos foi reduzida após uma hora de exposição a menor concentração ($545,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) de $2,48 \text{ mm.s}^{-1}$ dos controles para $1,52 \text{ mm.s}^{-1}$, relevando o efeito subletal do composto mesmo em baixas doses. Ainda, quando em presença de *Raphidocelis subcapitata*, a velocidade aumentada dos apêndices alimentares pode sugerir que estes organismos interpretaram as nanopartículas como alimento.

Garaventa et al. (2010) testaram o comportamento de microcrustáceos *Artemia sp.* e rotíferos da espécie *B. plicatilis* para piritionato de zinco, Macrotról MT-200 e eserina. Para a primeira espécie, a alteração de velocidade natatória caiu entre $2-10 \text{ mm.s}^{-1}$. Para os autores, uma porcentagem significativa dos valores de LC_{50} causaram inibição da atividade natatória. Para eserina, a mais alta concentração (100 mg.L^{-1}) testada nos dois organismos foi incapaz de prover a EC_{50} , no entanto, concentrações de $45,92$ e $9,3 \text{ mg.L}^{-1}$ em *Artemia sp.* e *B. plicatilis* alteraram o comportamento natatório. Para os microcrustáceos testados, LC_{50} de piritionato de zinco foi muito superior a encontrada como EC_{50} nos testes comportamentais ($0,07$ e $< 0,005 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente) após 24 horas, onde a média da LC_{50} para o composto não pode ser calculada no mesmo período. Este cenário reforça as respostas comportamentais como um significativo sinal de efeitos mais severos na população dos organismos quando a mortalidade não pode ser observada.

Cailleaud et al. (2010), expuseram adultos de copépodes de *E. affinis* em concentrações ambientais subletais de nonilfenóis (78 PPM de 4-NP e NP1EC) tendo como resultados maiores períodos de imobilidade natatória, aumentando de 67% para 80% nas fêmeas e de 44% para 60% nos machos. A diminuição de velocidade natatória foi de 17% para 26% nas fêmeas e de 34% para 43% nos machos. A duração da locomoção também teve diminuições significativas em relação aos controles, mensurados com os mesmos organismos testados. Quando em movimento, os organismos tiveram aumento da velocidade natatória ligada à resposta de escape, seguidos do aumento na taxa de afundamento (*sinking*), relevando a instabilidade dos organismos durante a locomoção na coluna de água.

O *sinking* por longos períodos pode dificultar o acesso destes organismos à chegada de fitoplâncton em áreas mais elevadas no ambiente aquático.

Seuront (2012) utilizou fêmeas não-ovadas e machos de copépodes da espécie *E. affinis* para interpretar os efeitos comportamentais da fração solúvel de óleo diesel (hidrocarboneto). Os *endpoints* analisados foram referentes à capacidade de escape das manchas (*turning angle*) de contaminante e da influência direta do composto no padrão de natação (dimensão fractal e velocidade de natação). Como resposta, machos e fêmeas tiveram respostas de escape diretamente proporcionais à concentração do composto, no entanto, na maior concentração testada, a capacidade de escape diminuiu, indicando dificuldades de fuga quando em condições muito tóxicas. Em relação à natação, houve diminuição da velocidade e interrupção do tempo que os organismos exploravam o ambiente (comportamento denominado “*cruising*”). Ainda, a complexidade de locomoção diminuiu, sugerindo que as respostas de escape contribuíram para quebra de padrões natatórios complexos e fundamentais.

Guo et al. (2012) testou os efeitos do dimetoato no rotífero da espécie *calyciflorus*. Para o autor, as alterações na velocidade de natação lineares foram mais sensíveis que as variações na velocidade de natação angular, uma vez que o pesticida reduziu em 50% esta métrica natatória. Constatou-se também a relação entre a dose de contaminante presente na água e a preferência de orientação das rotações do organismo (para a esquerda ou para a direita). Rotíferos se locomovem através de rotação, e, disfunções como estas descritas, provocando preferência rotacional, pode culminar na exposição maior dos organismos à predadores ou influenciar na atividade de forrageamento e exploração do ambiente. Neste estudo, a 6h-CE₅₀ do comportamento foi de 0,30 mg.L⁻¹ (velocidade linear) enquanto que para 24h-LC₅₀ encontrou-se 180,51 mg.L⁻¹.

A resposta de escape de duas espécies de copépodos (*Notodiptomus conifer* e *Argyrodiptomus falcifer*) e três de cladóceros (*D. magna*, *Pseudosida variabilis* e *Ceriodaphnia dubia*) em resposta à metais (cobre e cromo) e ao endossulfan, após 15 minutos de exposição foi descrita por Gutierrez, Paggi e Gagneten (2012). Para as duas classes de contaminantes, as respostas de escape foram aumentadas pela hiperestimulação das cinco espécies testadas, causada por concentrações baixas das substâncias, já que na presença destas, o estado de

alerta foi aumentado. Este quadro pode suprimir a energia alocada para outros processos biológicos importantes, como a reprodução. De acordo com o trabalho, a alta habilidade de fuga das presas pode ser negativa, se considerar-se as relações entre presa-predador.

Artells (2013) testou o efeito de nanopartículas no comportamento em duas espécies de cladóceros, *D. magna* e *D. pulex*. Os *endpoints* analisados foram referentes à exposição de 0, 1, 10 e 100 mg.L⁻¹ após 48 horas ao dióxido de cério (CeO₂). Em função da adsorção/acumulação das nanopartículas na cutícula dos microcrustáceos testados, a velocidade de natação foi prejudicada pela exposição, diminuindo-a significativamente. Em *D. magna* a velocidade em condições contaminadas diminuiu de 6 mm.s⁻¹ para 3 mm.s⁻¹. Já na outra espécie testada, a velocidade de natação modificou-se de 3 mm.s⁻¹ para 1,5 mm.s⁻¹, observando redução de velocidade de locomoção em aproximadamente 50% em ambos os casos.

Michalec et al. (2013a) apresentou os efeitos no comportamento do calanóide *P. annandalei* de uma toxina algácea (2-trans, 4-trans decadienal) após 25 minutos de exposição. Três estágios adultos foram estudados (machos, fêmeas e fêmeas ovadas). Na concentração intermediária (3 µM) as maiores alterações de velocidade instantânea foram encontradas para todos os organismos, em função da resposta de escape frente à toxina (dos controles para a concentração, respectivamente: de 5,3 para 3,5 nos machos; de 2,8 para 3,1 nas fêmeas e de 4,9 para 4,1 mm.s⁻¹ em fêmeas ovadas), indicando que a exposição ao composto diminuiu a abundância de valores altos de velocidade. A relação dose-resposta aumentou em função das velocidades instantâneas. A exposição também aumentou a frequência de deslocamentos verticais (com ângulos < 40°). Na concentração mais alta (12 µM): mesmo com o comportamento de afundamento, primariamente passivo na coluna de água, os copépodos ainda assim permaneciam hiperestimulados. Nesta concentração também foram observados comportamentos erráticos e redução de velocidade instantânea, sugerindo perda da capacidade de escape por alterações fisiológicas irreversíveis. A resposta de escape é comum em microcrustáceos expostos à contaminantes durante os primeiros estágios de exposição aos poluentes e pode garantir a fuga destes organismos para áreas menos estressoras.

Michalec et al. (2013b) observaram que os três estágios de adultos do copépode *E. affinis* tiveram sua velocidade natatória aumentada na presença de 4-nonilfenol, cloreto de cádmio e PAHs após 25 minutos de exposição. Copépodos dos três estágios adultos passaram a maior parte do tempo em natação lenta, no entanto, a frequência de estados natatórios foi alterada, isto é, a frequência de observação de eventos de natação rápida aumentou em relação aos controles, havendo por consequência a diminuição da interrupção de eventos de natação (“*break behavior*”). A hiperatividade (aumento de eventos de natação rápida) é um caráter fundamental que impede a locação de energia para atividades vitais, tendo reflexos claros em escala populacional. Em fêmeas ovadas, os períodos de interrupção de natação foram substituídos por períodos alternados entre natação rápida e lenta (movimento errático). Em relação ao grau de ocupação espacial, fêmeas apresentaram natações mais tortuosas (aumento da dimensão fractal das trajetórias), já machos, apresentaram padrão natatório mais retilíneo (diminuição da dimensão fractal), indicando efeito prejudicial dos contaminantes por reduzir a complexidade do repertório de locomoção.

Noss et al. (2013) observaram alterações natatórias no cladóceros *D. magna* exposta ao dióxido de titânio ($n\text{TiO}_2$). Após a inserção do contaminante, foi observada uma tendência das fêmeas se alocarem no centro das cubetas, revelando um comportamento de agregação estimulado pelo contaminante, no entanto semelhante ao encontrado em resposta ao estresse provocado por predadores e/ou quando estes organismos estão em áreas de alimentação. Organismos diminuíram sua velocidade de natação a partir da concentração de 1 mg.L^{-1} logo após a inserção do contaminante (tempo zero). A redução de velocidade dos organismos expostos se manteve ao longo do experimento, sendo de 40-96% menor em relação ao controle, após 96 horas. Neste estudo, também foram relatadas variações frequentes de velocidade natatória.

Manfra et al. (2016) observaram os efeitos subletais no microcrustáceo *Artemia* sp. expostas ao sulfato de cobre e ao SDS. As alterações comportamentais na natação ficaram mais evidentes após 48 horas de exposição. O valor de 48h- EC_{50} do SDS ($7,49 \text{ mg.L}^{-1}$) foi comparado ao valor encontrado após exposição crônica ao mesmo composto por 14 dias ($14\text{d-LC}_{50} = 8,50 \text{ mg.L}^{-1}$). Para o sulfato de cobre, a média de valor de 48h- EC_{50} ($2,51 \text{ mg.L}^{-1}$) foi de 1,5-2 vezes menor que a

concentração de efeito prejudicial na incubação de ovos para o mesmo organismo, encontrada por Manfra et al. (2015) ($48h-EC_{50} = 4,95mg.L^{-1}$), demonstrando que os dados de alterações comportamentais são sensíveis e comparáveis aos ensaios que avaliam a incubação em microcrustáceos. O sulfato de cobre altera a capacidade de crustáceos detectarem fontes alimentares, produzindo efeitos na locomoção que os expõe a maiores taxas de predação. O SDS é caracterizado por sua alta absorção em membranas, causando distúrbios no balanço iônico celular e estresse oxidativo. As alterações de velocidade natatória para os dois compostos chegaram a 80-100% em relação aos controles, após 48 horas de exposição.

Michalec et al. (2016) observaram que a atividade natatória do copépode *E. affinis* em exposição à nanopartículas de ouro. A redução da média de velocidade foi clara em fêmeas e fêmeas ovadas. Os eventos de *jump* (pulos) comuns durante a natação para reorientação e/ou captura de alimento foram menos vigorosos nas fêmeas.

Morgana et al., (2016) puderam observar a alteração de atividade natatória em larvas de diferentes estágios do equinodermo *Paracentrotus lividus*, tendo sua atividade natatória reduzida até mesmo na menor concentração de cloreto de cádmio ($CdCl_2$) testada. A atividade de natação adequada é parte fundamental na dispersão de larvas planctônicas destes organismos e, segundo autores, este resultado expressou que até mesmo os estágios iniciais do equinodermos podem ser utilizados para avaliação de *endpoints* frente as demais substâncias, uma vez que a CE_{50} de alterações comportamentais de 24 a 96 horas de exposição ($0,1-13,42 mg.L^{-1}$) alinhou-se com os valores encontrados em literatura. No mais, ressaltou-se que o $CdCl_2$ tem um importante efeito inibitório de natação nos estágios iniciais de desenvolvimento deste organismo. Ainda, a larva em estágio pluteus apresentou a maior sensibilidade natatória ao composto testado. Este estágio do organismo também é avaliado durante ensaios agudos de toxicidade da ecotoxicologia convencional.

As alterações natatórias causadas pelas MPs foram objeto de estudo de Gambardella et al. (2017). Os efeitos natatórios em espécies de craca *A. amphitrite* e *A. franciscana* foram mensurados após 24 e 48 horas de exposição a 1 e $10 mg.L^{-1}$, respectivamente. As larvas das duas espécies foram capazes de ingerir partículas menores que $1 \mu m$ (micrometro), responsáveis pela diminuição da atividade natatória

inversamente proporcional à atividade da AChE. Após a exposição, de 20-30% do comportamento foi alterado, mas a mortalidade dos organismos, bem como os valores de concentração de efeito, não puderam ser constatados.

Morgana et al. (2018) puderam observar alterações comportamentais em artemias da espécie *A. franciscana* após 6 horas de exposição ao composto em diferentes temperaturas. De acordo com os autores, utilizar-se dos valores de alteração de velocidade normalizados pela média de velocidades do controle contribui para a urgente necessidade em se ter testes ecotoxicológicos rápidos, encontrando concentrações de efeito comportamentais similares às encontradas após 24 horas de teste agudo que avaliou a mortalidade de náuplios para dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sulfato de cobre ($Cu(SO_4)_2$), hipoclorito de sódio ($NaClO$), SDS e cloridrato de sertralina, com exceção da última substância, as demais são utilizadas de forma comum em ensaios de ecotoxicologia aquática há anos, demonstrando a integração entre a ecotoxicologia e a análise comportamental de forma aplicável.

Estes são exemplos bibliográficos publicados sobre o uso do comportamento de natação como endpoint de toxicidade em invertebrados marinhos. Espera-se demonstrar o uso desta ferramenta para acessar a toxicidade presente nas diversas classes de contaminantes, na maioria dos casos, em conjunto com os ensaios de mortalidade, letalidade, reprodução e crescimento populacional. Embora útil, nem sempre o comportamento é utilizado como via principal de acesso de toxicidade, indicando um campo novo para estudos futuros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O estudo em ecotoxicologia comportamental é uma realidade já vista na ciência, refletida na publicação de trabalhos científicos ao redor do mundo. Muito destes trabalhos tem a grande motivação de colaborar com as descobertas feitas pelos ensaios ecotoxicológicos agudos e/ou crônicos, na tentativa de contribuir com o crescimento no uso do comportamento para indicar toxicidade de substâncias de diversas fontes, geralmente antropogênicas. Em um panorama histórico, a ecotoxicologia comportamental vem crescendo e integrando áreas antes vistas como distantes, como por exemplo a engenharia, a computação e a física, integração esta que tem aumentado o nível de qualidade e acurácia, bem como a visibilidade da quantificação comportamental como uma ferramenta adequada. As espécies inseridas no contexto ecotoxicológico vão além das empregadas na ecotoxicologia clássica, incluindo vertebrados e invertebrados marinhos e dulcícolas de todos os níveis tróficos, comprovando o grande alcance e relevância das respostas comportamentais para os ecossistemas. As vantagens da observação de comportamento frente à situações de contaminação são evidentes e rápidas, prevendo prejuízos maiores à biota aquática exposta à concentrações subletais, que em alguns casos não são consideradas de risco. A utilização de índices convencionais como a mortalidade e letalidade em alguns casos pode ser questionável, contando o esclarecimento das técnicas comportamentais para a validações claras de toxicidade. Como perspectiva, a presente revisão aponta para o contínuo progresso de técnicas e metodologias que permitam a detecção de alterações de locomoção em invertebrados aquáticos, principalmente os microcrustáceos, como uma possibilidade acessível e aplicável, não apenas no monitoramento ambiental, mas nas rotinas de laboratório, inserindo-as com maior frequência nas regulamentações e diretrizes protetivas e idealmente, propondo a união entre as respostas letais e subletais no entendimento mais amplo das respostas ambientais provocadas pelos contaminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, J. D.; DANIELS, R. E. Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to Kepone. **Marine Biology**, v. 66, n. 2, p. 179-184, 1982.
- ALMEIDA, J. R. et al. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 8, p. 1369-1381, 2010.
- ALONSO, A.; DE LANGE, H. J.; PEETERS, E. THM. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 133, 2010.
- ALYURUK, H. A video tracking based improvement of acute toxicity test on *Artemia salina*. *Marine and freshwater behaviour and physiology*, v. 46, n. 4, p. 251-266, 2013. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 8, p. 1369-1381, 2010.
- AMIARD-TRIQUET, C. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 15, n. 1, p. 87-110, 2009.
- AMSLER, M. O. et al. The use of computer-assisted motion analysis for quantitative studies of the behaviour of barnacle (*Balanus amphitrite*) larvae. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 39, n. 4, p. 259-268, 2006.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM E1604-12 **Standard Guide for Behavioral Testing in Aquatic Toxicology**. In: Book of Standards. Active Standard ASTM E1604, v. 11.06, 2012.
- ANDERSON, G. L.; BOYD, W. A.; WILLIAMS, P. L. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 833-838, 2001.
- ANDERSON, E. P.; MACKAS, D. L. Lethal and sublethal effects of a molybdenum mine tailing on marine zooplankton: mortality, respiration, feeding and swimming behavior in *Calanus marshallae*, *Metridia pacifica* and *Euphausia pacifica*. **Marine Environmental Research**, v. 19, n. 2, p. 131-155, 1986.
- ARTELLS, E. et al. Exposure to cerium dioxide nanoparticles differently affect swimming performance and survival in two daphnid species. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71260, 2013.
- ARUNACHALAM, S.; JEYALAKSHMI, K.; ABOOBUCKER, S. Toxic and sublethal effects of carbaryl on a freshwater catfish, *Mystus vittatus* (Bloch). **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 9, n. 3, p. 307-316, 1980.
- ATCHISON, G. J.; HENRY, M. G.; SANDHEINRICH, M. B. Effects of metals on fish behavior: a review. **Environmental Biology of fishes**, v. 18, n. 1, p. 11-25, 1987.
- ATEMA, J. Sublethal effects of petroleum fractions on the behavior of the lobster, *Homarus americanus*, and the mud snail, *Nassarius obsoletus*. In: **Estuarine Processes: Uses, Stresses, and Adaptation to the Estuary**, Academic Press, v. 1, p. 302-312, 1976.
- AYAD, M. A.; FDIL, M. A.; MOUABAD, A. Effects of cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 3, p. 462-470, 2011.

BAE, M.; PARK, Y. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review. **Science of the Total Environment**, v. 466, p. 635-649, 2014.

BAILLIEUL, M.; BLUST, R. Analysis of the swimming velocity of cadmium-stressed *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 245-254, 1999.

BANKS, J. E.; STARK, J. D. What is ecotoxicology? An ad-hoc grab bag or an interdisciplinary science? **Integrative Biology: Issues, News, and Reviews**, v. 1, n. 5, p. 195–204, 1998.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 1-14, 2006.

BARTHALMUS, G. T; RAND, G. M. Use of an unsignalled avoidance technique to evaluate the effects of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on goldfish. *In: Aquatic Toxicology. American Society for Testing and Materials International (ASTM)*, 1980.

BEAULIEU, S. E. et al. Swimming speeds of polychaete larvae collected near deep-sea hydrothermal vents. **Marine Ecology**, v. 36, p. 133-143, 2015.

BELL, W. J. **Searching behaviour: the behavioural ecology of finding resources**. Springer, 2012.

BIANCO, G. et al. Unexpected regularity in swimming behavior of *Clausocalanus furcatus* revealed by a telecentric 3D computer vision system. **PLoS one**, v. 8, n. 6, p. e67640, 2013.

BRADBURY, S. P. Ecological risk assessment for chemical stressors: Challenges in predictive ecotoxicology research. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1995.

BRADLEY, C. J. et al. Swimming and escape behavior in two species of calanoid copepods from nauplius to adult. **Journal of Plankton Research**, v. 35, n. 1, p. 49-65, 2012.

BRAUNBECK, T.; HINTON, D. E.; STREIT, B. **Fish ecotoxicology**. Germany: Birkhäuser Verlag, 1998.

BRAUSCH, K. A. et al. The effect of fullerenes and functionalized fullerenes on *Daphnia magna* phototaxis and swimming behavior. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 30, n. 4, p. 878-884, 2011.

BEIRAS, R. et al. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1209-1224, 2003.

BELL, A. M.; HANKISON, S. J.; LASKOWSKI, K. L. The repeatability of behaviour: a meta-analysis. **Animal behaviour**, v. 77, n. 4, p. 771-783, 2009.

BEJARANO, A. C.; CHANDLER, G. T. Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3009-3016, 2003.

BIESINGER, K. E.; CHRISTENSEN, G. M. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 29, n. 12, p. 1691-1700, 1972.

BLINOVA, I. et al. Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 3456-3463, 2013.

BREITHOLTZ, M.; WOLLENBERGER, L. Effects of three PBDEs on development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 1, p. 85-96, 2003.

BRODIN, T. et al. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1656, p. 20130580, 2014.

BROGLIO, E.; JOHANSSON, M.; JONSSON, P. R. Trophic interaction between copepods and ciliates: effects of prey swimming behavior on predation risk. **Marine Ecology Progress Series**, v. 220, p. 179-186, 2001.

BROUWER, A.; MURK, A. J.; KOEMAN, J. H. Biochemical and physiological approaches in ecotoxicology. **Functional Ecology**, v. 4, n. 3, p. 275-281, 1990.

BROWN, J. A. et al. Changes in the predator-avoidance behaviour of juvenile guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to pentachlorophenol. *Canadian Journal of Zoology*, v. 63, n. 9, p. 2001-2005, 1985.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 158-165, 2012.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: a review. **Science of the total environment**, v. 601, p. 194-205, 2017.

BOYD, R.S. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. **Journal of chemical ecology**, v. 36, n. 1, p. 46-58, 2010.

BUSKEY, E. J. Components of mating behavior in planktonic copepods. **Journal of marine systems**, v. 15, n. 1-4, p. 13-21, 1998.

BUSKEY, E. J. et al. Escapes in copepods: Comparison between myelinate and amyelinate species. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 5, p. 754-758, 2017.

CAILLEAUD, K. et al. Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols. **Aquatic toxicology**, v. 102, n. 3-4, p. 228-231, 2011.

CAIRNS J. R, J.; GRUBER, D. A comparison of methods and instrumentation of biological early warning systems. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 16, n. 2, p. 261-266, 1980.

CAIRNS, J. The threshold problem in ecotoxicology. **Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 3-16, 1992.

CAIRNS, J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. CRC press, 2002.

CALBET, A.; LANDRY, M. R. Mesozooplankton influences on the microbial food web: direct and indirect trophic interactions in the oligotrophic open ocean. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 6, p. 1370-1380, 1999.

CALFEE, R. D. et al. Quantifying fish swimming behavior in response to acute exposure of aqueous copper using computer assisted video and digital image analysis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 108, 2016.

CHAROY, C. P. et al. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 271-282, 1995.

- CHAROY, C.; JANSSEN, C. R. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress: II. Comparative sensitivity of various behavioural criteria. **Chemosphere**, v. 38, n. 14, p. 3247-3260, 1999.
- CHEN, T.; LIN, C.; TSENG, M. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). **Marine pollution bulletin**, v. 63, n. 5-12, p. 303-308, 2011.
- CHEN, J. et al. The swimming speed alteration of two freshwater rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Asplanchna brightwelli* under dimethoate stress. **Chemosphere**, v. 95, p. 256-260, 2014.
- CHEVALIER, J. et al. Exploration of *Daphnia* behavioral effect profiles induced by a broad range of toxicants with different modes of action. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1760-1769, 2015.
- CLEVELAND, L. et al. Sensitivity of brook trout to low pH, low and elevated aluminum concentrations during laboratory pulse exposures. **Aquatic Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 303-317, 1991.
- CLOTFELTER, E. D.; BELL, A.M.; LEVERING, K. R. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. **Animal behaviour**, v. 68, n. 4, p. 665-676, 2004.
- COHEN, J. H. et al. Effects of dispersant and oil on survival and swimming activity in a marine copepod. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 4, p. 381-387, 2014.
- COHEN, J. H.; FORWARD, R. B. Diel vertical migration of the marine copepod *Calanopia americana*. II. Proximate role of exogenous light cues and endogenous rhythms. **Marine Biology**, v. 147, n. 2, p. 399-410, 2005.
- COSTA, E. et al. Ecotoxicological effects of sediments from Mar Piccolo, South Italy: toxicity testing with organisms from different trophic levels. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 13, p. 12755-12769, 2016.
- COSTELLO, M. J. Predator feeding strategy and prey importance: a new graphical analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 36, n. 2, p. 261-263, 1990.
- D'AGOSTINO, A., FINNEY, C. The effect of copper and cadmium on the development of *Tigriopus japonicus*. In: **Pollution and physiology of marine organisms**. New York: Academic Press, p. 445-463, 1974.
- DANIEL, T. L. Unsteady aspects of aquatic locomotion. **American Zoologist**, v. 24, n. 1, p. 121-134, 1984.
- DHARA, K.; SAHA, N. C.; MAITI, A. K. Studies on acute and chronic toxicity of cadmium to freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck) with special reference to behavioral and hematological changes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 35, p. 27326-27333, 2017.
- DELL'OMO, G. **Behavioural ecotoxicology**. United States of America: John Wiley & Sons, 2002.
- DE PAIVA MAGALHAES, D. et al. Behavioral response of zebrafish *Danio rerio* Hamilton 1822 to sublethal stress by sodium hypochlorite: ecotoxicological assay using an image analysis biomonitoring system. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 5, p. 417-422, 2007.
- DE PAIVA MAGALHAES, D.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.
- DAHMS, H. HWANG, J. Perspectives of underwater optics in biological oceanography and plankton ecology studies. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 112-121, 2010.
- DAY, K.; KAUSHIK, N. K. An assessment of the chronic toxicity of the synthetic pyrethroid, fenvalerate, to *Daphnia galeata mendotae*, using life tables. **Environmental Pollution**, v. 44, n. 1, p. 13-26, 1987.

- DEPLEDGE, M. H.; BILLINGHURST, Z. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 32-38, 1999.
- DICKINSON, M. H. et al. How animals move: an integrative view. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 100-106, 2000.
- DRUMMOND, R. A.; SPOOR, W. A.; OLSON, G. F. Some short-term indicators of sublethal effects of copper on brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 30, n. 5, p. 698-701, 1973.
- DOALL, M. H. et al. Locating a mate in 3D: the case of *Temora longicornis*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 353, n. 1369, p. 681-689, 1998.
- DODSON, S. I.; HANAZATO, T. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. **Environmental health perspectives**, v. 103, n. suppl 4, p. 7-11, 1995.
- DENOËL, M. et al. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: a video-tracking analysis in larval amphibians. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 945-951, 2013.
- DONOVAN, D. A.; ELIAS, J. P.; BALDWIN, J. Swimming behavior and morphometry of the file shell *Limaria fragilis*. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 7-16, 2004.
- DOURISH, C. T. et al. Benefits of ethological analysis of behaviour: Cost: benefit ratio of an ethological analysis of behaviour in the elevated maze model of anxiety. **Trends in pharmacological sciences**, v. 16, n. 8, p. 260-261, 1995.
- DUR, G. et al. Effects of animal density, volume, and the use of 2D/3D recording on behavioral studies of copepods. **Hydrobiologia**, v. 666, n. 1, p. 197-214, 2011.
- DUR, G. et al. Sex ratio and mating behavior in the calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. **Zoological Studies**, v. 51, n. 5, p. 589-597, 2012.
- EISSA, B. L.; SALIBIÁN, A.; FERRARI, L. Behavioral alterations in juvenile *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal waterborne cadmium. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 77, n. 6, p. 931-937, 2006.
- EMBRY, M. R. et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquatic toxicology**, v. 97, n. 2, p. 79-87, 2010.
- EMLÉN, J. M. et al. How organisms do the right thing: the attractor hypothesis. **Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science**, v. 8, n. 3, p. 717-726, 1998.
- ENSERINK, E. L.; MAAS-DIEPEVEEN, J. L.; VAN LEEUWEN, C. J. Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. **Water Research**, v. 25, n. 6, p. 679-687, 1991.
- EVANS, H. L. Neurotoxicity expressed in naturally occurring behavior. *In: Neurobehavioral Toxicity: Analysis and Interpretation*, New York: Raven Press, p. 111-136, 1994.
- FAIMALI, M. et al. Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as a behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. **Marine Biology**, v. 149, n. 1, p. 87-96, 2006.
- FAIMALI, M. et al. Old model organisms and new behavioral end-points: swimming alteration as an ecotoxicological response. **Marine environmental research**, v. 128, p. 36-45, 2016.
- FAO, 2010. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, p. 197, 2010.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1-3, p. 207-233, 2003.

FERNANDO, C. H. Zooplankton, fish and fisheries in tropical freshwaters. *In: Studies on the Ecology of Tropical Zooplankton*. Dordrecht: Springer, p. 105-123, 1994.

FINGER, S. E. et al. Comparison of Laboratory and Field Assessment of Fluorecence—Part I: Effects of Fluorecence on the Survival, Growth, Reproduction, and Behavior of Aquatic Organisms in Laboratory Tests. *In: Validation and predictability of laboratory methods for assessing the fate and effects of contaminants in aquatic ecosystems*. ASTM International, 1985.

FOSSI, C.; LEONZIO, C. **Nondestructive biomarkers in vertebrates**. United States of America: CRC Press, 1994.

FUCHS, H. L.; DIBACCO, C. Mussel larval responses to turbulence are unaltered by larval age or light conditions. **Limnology and Oceanography: Fluids and Environments**, v. 1, n. 1, p. 120-134, 2011.

GAMBARDELLA, C. et al. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 7, p. 4249-4259, 2014.

GAMBARDELLA, C. et al. Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 145, p. 250-257, 2017.

GAMBARDELLA, C. et al. Long-term exposure to low dose neurotoxic pesticides affects hatching, viability and cholinesterase activity of *Artemia* sp. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 79-89, 2018.

GARAVENTA, F. et al. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 3, p. 512-519, 2010.

GEIGER, J. G. Zooplankton production and manipulation in striped bass rearing ponds. **Aquaculture**, v. 35, p. 331-351, 1983.

GERHARDT, A. Behavioural early warning responses to polluted water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 3, n. 2, p. 63-70, 1996.

GERHARDT, A. Whole effluent toxicity testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792): survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 35, n. 2, p. 309-316, 1998.

GERHARDT, A. Suitability of *Crangonyx pseudogracilis* (Crustacea: Amphipoda) as an Early Warning Indicator in the Multispecies Freshwater Biomonitor (9 pp). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 13, n. 4, p. 242-250, 2006.

GERHARDT, A. Aquatic behavioral ecotoxicology—prospects and limitations. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 13, n. 3, p. 481-491, 2007.

GERRITSEN, J.; STRICKLER, J. R. Encounter probabilities and community structure in zooplankton: a mathematical model. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 34, n. 1, p. 73-82, 1977.

GOLOMBIESKI, J. I. et al. Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 340-345, 2008.

GOTO, T.; HIROMI, J. Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect. **Marine pollution bulletin**, v. 47, n. 1-6, p. 139-142, 2003.

HANSEN, J. A. et al. Behavioral avoidance: Possible mechanism for explaining abundance and distribution of trout species in a metal-impacted river. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.

18, n. 2, p. 313-317, 1999.

HASENBEIN, S. et al. The use of growth and behavioral endpoints to assess the effects of pesticide mixtures upon aquatic organisms. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 4, p. 746-759, 2015.

HELENIUS, L. K.; SAIZ, E. Feeding behaviour of the nauplii of the marine calanoid copepod *Paracartia grani* Sars: Functional response, prey size spectrum, and effects of the presence of alternative prey. **PLoS one**, v. 12, n. 3, p. e0172902, 2017.

HEBEL, D. K.; JONES, M. B.; DEPLEDGE, M. H. Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. Estuarine, **Coastal and Shelf Science**, v. 44, n. 2, p. 177-184, 1997.

HECKER, M.; HOLLERT, H. Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n.6, p.607-613, 2009.

HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an "early warning" signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2011.

HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348-350, 2012.

HEUSCHELE, J.; KIORBOE, T. The smell of virgins: mating status of females affects male swimming behaviour in *Oithona davisae*. **Journal of plankton research**, v. 34, n. 11, p. 929-935, 2012.

HUANG, Y. et al. Enabling sub-lethal behavioral ecotoxicity biotests using microfluidic Lab-on-a-Chip technology. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 226, p. 289-298, 2016.

HUNT, J. C. et al. The behaviour of *Loligo opalescens* (Mollusca: Cephalopoda) as observed by a remotely operated vehicle (ROV). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 80, n. 5, p. 873-883, 2000.

JACOBS, J. Laboratory cultivation of the marine copepod *pseudodiaptomus coronatus* Williams. **Limnology and Oceanography**, v. 6, n. 4, p. 443-446, 1961.

JACOBY, C. A.; YOUNGBLUTH, M. J. Mating behavior in three species of *Pseudodiaptomus* (Copepoda: Calanoida). **Marine Biology**, v. 76, n. 1, p. 77-86, 1983.

JANSSEN, C.; RODRIGO, F.; PERSOONE, G. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*, I: conceptual framework and applications. **Hydrobiologia**, v. 255, p. 21-32, 1993.

JANSSEN, C. R.; FERRANDO, M. D.; PERSOONE, G. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*: IV. Rotifer behavior as a sensitive and rapid sublethal test criterion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 28, n. 3, p. 244-255, 1994.

JONES, R. I.; GREY, J. Biogenic methane in freshwater food webs. **Freshwater Biology**, v. 56, n. 2, p. 213-229, 2011.

JONSSON, P. R.; TISELIUS, P. Feeding behaviour, prey detection and capture efficiency of the copepod *Acartia tonsa* feeding on planktonic ciliates. **Marine Ecology Progress Series**, p. 35-44, 1990.

LAM, P. K. S.; WO, K. T.; WU, R. S. S. Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. **Environmental toxicology**, v. 15, n. 1, p. 8-13, 2000.

LEE, C. et al. Mating behaviour of *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda, Calanoida) at calm and hydrodynamically disturbed waters. **Marine biology**, v. 158, n. 5, p. 1085-1094, 2011.

- LINDSTRÖM, M. LINDSTRÖM, A. Swimming activity of *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda)—Seasonal variations and usefulness for environmental studies. **Annales zoologici fennici**, v. 17, p. 213-220, 1980.
- LINDEN, O. Effects of oil on the reproduction of the amphipod *Gammarus oceanicus*. **Ambio**, v. 5, n. 1, p. 36-37, 1976.
- LITTLE, E. E. Behavioral Ecotoxicology – stimulating challenges for a growing discipline. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 9, n. 1, p. 1-2 1990.
- LITTLE, E. E. et al. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 380-385, 1990.
- LITTLE, E. E.; FINGER, S. E. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 9, n. 1, p. 13-19, 1990.
- LITTLE, E. E.; FAIRCHILD, J. F.; DELONAY, A. J. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. *In: Water quality and the early life stages of fishes, American Fisheries Society Symposium 14*. American Fisheries Society, p. 67-76, 1993.
- LITTLE, E. E.; BREWER, S. K. Neurobehavioral toxicity in fish. *In: Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts new perspectives: toxicology and the environment*, London: Taylor & Francis, v. 2, p. 139-174, 2001.
- LITTLE E. E. Behavioural measures of injuries to fish and aquatic organisms: Regulatory considerations. *In: Behavioural Ecotoxicology*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 31-411, 2000.
- LOTUFO, G. R. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behavior. **Marine environmental research**, v. 44, n. 2, p. 149-166, 1997.
- LV, Z. et al. Game on, science-how video game technology may help biologists tackle visualization challenges. **PloSone**, v. 8, n. 3, p. e57990, 2013.
- KADIENE, E. U. et al. Differences in lethal response between male and female calanoid copepods and life cycle traits to cadmium toxicity. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 9, p. 1227-1239, 2017.
- KAMBLE, S. B.; KAMBLE, N. A. Behavioural changes in freshwater snail *Bellamya bengalensis* due to acute toxicity of copper sulphate and *Acacia sinuata*. **International Journal of Environmental and Science Education**, v. 3, p. 1090-1104, 2014.
- KANE, A. S.; SALIERNO, J. D.; BREWER, S. K. Fish models in behavioral toxicology: automated techniques, updates and perspectives. **Methods in aquatic toxicology**, v. 2, p. 559-590, 2005.
- KIBRIA, G. et al. Zooplankton: Its biochemistry and significance in aquaculture. **Network of Tropical Aquaculture Scientists**, v. 20, n. 2, p. 8-14, 1997.
- KIENLE, C.; GERHARDT, A. Behavior of *Corophium volutator* (Crustacea, Amphipoda) exposed to the water-accommodated fraction of oil in water and sediment. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 27, n. 3, p. 599-604, 2008.
- KIMMERER, W. J.; GROSS, E. S.; MACWILLIAMS, M. Tidal migration and retention of estuarine zooplankton investigated using a particle-tracking model. **Limnology and Oceanography**, v. 59, n. 3, p. 901-916, 2014.
- KITCHIN, K. T. Defining, explaining and understanding hormesis. **Human & experimental toxicology**, v. 21, n. 2, p. 105-106, 2002.
- KIORBOE, T.; BAGOIEN, E.; THYGESEN, U.H. Blind dating—mate finding in planktonic copepods. II. The pheromone cloud of *Pseudocalanus elongatus*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 300, p.

117-128, 2005.

KIORBOE, T.; BAGOIEN, E. Motility patterns and mate encounter rates in planktonic copepods. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 6, p. 1999-2007, 2005.

KIORBOE, T. Mate finding, mating, and population dynamics in a planktonic copepod *Oithona davisae*: there are too few males. **Limnology and Oceanography**, v. 52, n. 4, p. 1511-1522, 2007.

KIORBOE, T. What makes pelagic copepods so successful?. **Journal of Plankton Research**, v. 33, n. 5, p. 677-685, 2010.

KIORBOE, Thomas. How zooplankton feed: mechanisms, traits and trade-offs. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 311-339, 2011.

KIORBOE, T. Attack or attacked: The sensory and fluid mechanical constraints of copepods' predator-prey interactions. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 5, p.821-831, 2013.

KOEHL, M. A. R.; STRICKIER, J. R. Copepod feeding currents: Food capture at low Reynolds number1. **Limnology and Oceanography**, v. 26, n. 6, p. 1062-1073, 1981.

KOMERS, P. E. Behavioural plasticity in variable environments. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, n. 2, p. 161-169, 1997.

KOPRUCU, S. S. et al. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 2, p. 99-105, 2006.

KRAMER, K. J. M; BOTTERWEG, J. Aquatic biological early warning systems: an overview. *In: Bioindicators and environmental management*, p. 95-126, 1991.

KRÅNG, A. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). **Aquatic toxicology**, v. 85, n. 1, p. 9-18, 2007.

MAGILLO, F.; FAIMALI, M.; GERACI, S. Effect of cadmium chloride on the swimming behaviour of *Balanus amphitrite*(Crustacea: Cirripedia) larvae. **Hydrobiologia**, v. 10, n. 2, p. 1014-1017, 2003.

MACFARLANE, G. R.; REID, D. J.; ESGUERRA, C. A. Sublethal behavioral effects of the water accommodated fractions of crude oil to gastropod molluscs. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 72, n. 5, p. 1025-1031, 2004.

MANFRA, L. et al. Lethal and sublethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and an ecotoxicological concern organic compound. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 123, p. 60-64, 2016.

MARADONA, A. et al. Utilization of multiple organisms in a proposed early-warning biomonitoring system for real-time detection of contaminants: preliminary results and modeling. **Journal of hazardous materials**, v. 219, p. 95-102, 2012.

MARCIAL, H. S.; HAGIWARA, A.; SNELL, T. W. Effect of some pesticides on reproduction of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. **Hydrobiologia**, v. 546, n. 1, p. 569-575, 2005.

MCALLEN, R.; TAYLOR, A. The effect of salinity change on the oxygen consumption and swimming activity of the high-shore rockpool copepod *Tigriopus brevicornis*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 263, n. 2, p. 227-240, 2001.

MCKIM, J. M. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicity. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 34, n. 8, p. 1148-1154, 1977.

MELVIN, S. D.; WILSON, S. P. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2217-2223, 2013.

- MICHALEC, F. et al. Three dimensional observation of salinity-induced changes in the swimming behavior of the estuarine calanoid copepod *Pseudodiaptomus annandalei*. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 438, p. 24-31, 2012.
- MICHALEC, F. et al. Changes in the swimming behavior of *Pseudodiaptomus annandalei* (Copepoda, Calanoida) adults exposed to the diatom toxin 2-trans, 4-trans decadienal. **Harmful Algae**, v. 30, p. 56-64, 2013a.
- MICHALEC, F. et al. Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants. **Aquatic toxicology**, v. 138, p. 129-138, 2013b.
- MICHALEC, F. et al. Short-term exposure to gold nanoparticle suspension impairs swimming behavior in a widespread calanoid copepod. **Environmental pollution**, v. 228, p. 102-110, 2017.
- MICHELS, E. et al. Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 47, n. 3, p. 261-265, 2000.
- MILLER, J. G. Ecotoxicology of petroleum hydrocarbons in the marine environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 88-98, 1982.
- MORISAKI, H. et al. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2797-2802, 1999.
- MORGANA, S. et al. Swimming speed alteration in the early developmental stages of *Paracentrotus lividus* sea urchin as ecotoxicological endpoint. **Marine environmental research**, v. 115, p. 11-19, 2016.
- MORGANA, S. et al. A short-term swimming speed alteration test with nauplii of *Artemia franciscana*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 558-564, 2018.
- MORGAN, W. D. A time series demand for water using micro data and binary variables. **Journal of the American Water Resources Association**, Academic Press, v. 10, n. 4, p. 697-702, 1974.
- MORRIS, R.G. M. Moving on from spatial learning to episodic-like and semantic-like memory. *In: Proceedings of Measuring Behaviour 2005, 5th International Conference*. Noldus Technologies, Wageningen, The Netherlands, p. 203, 2005.
- NAIMO, T. J. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. **Ecotoxicology**, v. 4, n. 6, p. 341-362, 1995.
- NEEDLEMAN, H. L. **Behavioral toxicology**. *Environmental Health Perspectives*, v. 103, n. suppl. 6, p. 77-79, 1995.
- NEWCOMB, J. M. et al. Homology and homoplasy of swimming behaviors and neural circuits in the Nudipleura (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. Supplement 1, p. 10669-10676, 2012.
- NEWMAN, M. C. **Quantitative ecotoxicology**. CRC press, 2012.
- NEWMAN, M. C. **Fundamentals of ecotoxicology: the science of pollution**. 2^aEd, CRC press, 2014.
- NELSON, W. G. Application of real-time monitoring in decision making: The new Bedford Harbor pilot dredging project. **Environmental Protection Agency**, Narragansett, RI (United States of America). Environmental Research Lab., 1994.
- NIHONGI, A.; LOVERN, S. B.; STRICKLER, J. R. Mate-searching behaviors in the freshwater calanoid copepod *Leptodiaptomus ashlandi*. **Journal of Marine Systems**, v. 49, n. 1-4, p. 65-74, 2004.

- NOSS, C. et al. Three-dimensional analysis of the swimming behavior of *Daphnia magna* exposed to nanosized titanium dioxide. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80960, 2013.
- NYMAN, A. et al. The insecticide imidacloprid causes mortality of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* by interfering with feeding behavior. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e62472, 2013.
- OLIVEIRA, L. L. D. et al. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 119, p. 123-131, 2015.
- PAN, Y. et al. Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40385, 2017.
- PANDEY, S. et al. Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 61, n. 1, p. 114-120, 2005.
- PRESTON, B. L.; SNELL, T. W.; DUSENBERY, D. B. The effects of sublethal pentachlorophenol exposure on predation risk in freshwater rotifer species. **Aquatic toxicology**, v. 47, n. 2, p. 93-105, 1999.
- PYNNÖNEN, K. Heavy metal-induced changes in the feeding and burrowing behaviour of a Baltic isopod, *Saduria* (Mesidotea) entomon L. **Marine environmental research**, v. 41, n. 2, p. 145-156, 1996.
- PYKE, G. H. Optimal foraging theory: a critical review. **Annual review of ecology and systematics**, v. 15, n. 1, p. 523-575, 1984.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere Publisher, 1985.
- RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. New York: CRC press, 1995.
- RAO, J. V. et al. Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, *Gambusia affinis* in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos. **International Journal of Environmental Research and public health**, v. 2, n. 3, p. 478-483, 2005.
- RAO, J. V. et al. Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 53, n. 2, p. 227-232, 2007.
- REN, Z. et al. Differences in the behavior characteristics between *Daphnia magna* and Japanese madaka in an on-line biomonitoring system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 5, p. 703-708, 2010.
- REN, Z. et al. AChE inhibition: one dominant factor for swimming behavior changes of *Daphnia magna* under DDVP exposure. **Chemosphere**, v. 120, p. 252-257, 2015.
- RIISGARD, H. U. Filter-feeding mechanisms in crustaceans. **Life styles and feeding biology. The natural history of the Crustacea**, v. 2, p. 418-463, 2015.
- RIVKIN, R.B.; LEGENDRE, L. Biogenic carbon cycling in the upper ocean: effects of microbial respiration. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2398-2400, 2001.
- ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. **Marine environmental research**, v. 50, n. 1-5, p. 107-112, 2000.
- ROAST, S. D.; WIDDOWS, J.; JONES, M. B. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. **Aquatic**

Toxicology, v. 47, n. 3-4, p. 227-241, 2000.

ROBINSON, P. D. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 66, n. 7, p. 1179-1188, 2009.

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

ROFF, J. C. et al. Bacterivory by tropical copepod nauplii: extent and possible significance. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 9, n. 2, p. 165-175, 1995.

SABIA, L. et al. Pseudodiaptomus marinus Sato, 1913, a new invasive copepod in Lake Faro (Sicily): observations on the swimming behaviour and the sex-dependent responses to food. **Zoological Studies**, v. 53, n. 1, p. 49, 2014.

SALÁNKI, J. et al. Molluscs in biological monitoring of water quality. **Toxicology Letters**, v. 140, p. 403-410, 2003.

SAMBOLINO, A. **Swimming behaviour characterization in Amphibalanus amphitrite (Crustacea, Cirripedia) larvae with 3D video analysis and its alteration in response to sublethal exposure to copper**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Monitoramento Biológico) - Università degli Studi di Genova, p.1-55, 2015.

SCHERER, C. et al. Interactive effects of xenobiotic, abiotic and biotic stressors on *Daphnia pulex*—Results from a multiple stressor experiment with a fractional multifactorial design. **Aquatic toxicology**, v. 138, p. 105-115, 2013.

SCHMIDT, K. et al. Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). **Aquatic toxicology**, v. 71, n. 1, p. 49-59, 2005.

SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 68, n. 4, p. 369-392, 2004.

SEURONT, L. et al. From random walk to multifractal random walk in zooplankton swimming behaviour. **Zoological Studies**, v. 43, p. 498-510, 2004.

SEURONT, L.; LETERME, S. Increased zooplankton behavioral stress in response to short-term exposure to hydrocarbon contamination. **The Open Oceanography Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2007.

SEURONT, L. Zooplankton avoidance behaviour as a response to point sources of hydrocarbon-contaminated water. **Marine and Freshwater Research**, v. 61, n. 3, p. 263-270, 2010.

SEURONT, L. Hydrocarbon contamination decreases mating success in a marine planktonic copepod. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26283, 2011.

SEURONT, L. Hydrocarbon contamination and the swimming behavior of the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *In*: Intechopen, **Marine Ecosystems**, 2012.

SEURONT, L. Chemical and hydromechanical components of mate-seeking behaviour in the calanoid copepod *Eurytemora affinis*. **Journal of plankton research**, v. 35, n. 4, p. 724-743, 2013.

SHA, J. et al. Effects of two polybrominated diphenyl ethers (BDE-47, BDE-209) on the swimming behavior, population growth and reproduction of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 28, p. 54-63, 2015.

SHIMIZU, N. et al. Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 17, n. 5, p. 441-448, 2002.

SHIRER, H. W.; CAIRNS, J. R., J.; TALLER, W. T. A simple apparatus for measuring activity patterns of fishes. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 4, n. 3, p. 27-43, 1968.

SIMPSON, S. L. et al. Oxidation of acid-volatile sulfide in surface sediments increases the release and toxicity of copper to the benthic amphipod *Melita plumulosa*. **Chemosphere**, v. 88, n. 8, p. 953-961, 2012.

SNELL, T. W.; PERSOONE, G. Acute toxicity bioassays using rotifers. II. A freshwater test with *Brachionus rubens*. **Aquatic Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 81-91, 1989.

SNELL, T. W.; JANSSEN, C. R. Rotifers in ecotoxicology: a review. **Hydrobiologia**, v. 313, n. 1, p. 231-247, 1995.

SINGH, R. et al. Heavy metals and living systems: An overview. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 246, 2011.

SPARLING, D.W. **Ecotoxicology essentials: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants**. India: Academic Press, 2016.

STEPHENS, D. W.; KREBS, R. **Foraging theory**. Princeton University Press, 1986.

STRATTON, G. W.; CORKE, C. T. Interaction of permethrin with *Daphnia magna* in the presence and absence of particulate material. **Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological**, v. 24, n. 2, p. 135-144, 1981.

SULLIVAN, B. K. et al. Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). **Marine Biology**, v. 77, n. 3, p. 299-306, 1983.

VAN DER SCHALIE, W. H. et al. Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 7-8, p. 457-465, 2001.

VAN DUREN, L. A.; VIDELER, J. J. Swimming behaviour of developmental stages of the calanoid copepod *Temora longicornis* at different food concentrations. **Marine Ecology Progress Series**, v. 126, p. 153-161, 1995.

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

VAN LEEUWEN, H. C.; MALY, E. J. Changes in swimming behavior of male *Diaptomus leptopus* (Copepoda: Calanoida) in response to gravid females. **Limnology and oceanography**, v. 36, n. 6, p. 1188-1195, 1991.

VAN SOMEREN GRÉVE, H.; ALMEDA, R.; KIORBOE, Thomas. Motile behavior and predation risk in planktonic copepods. **Limnology and Oceanography**, v. 62, n. 5, p. 1810-1824, 2017.

VATER, S. M. et al. Swimming behavior of *Pseudomonas aeruginosa* studied by holographic 3D tracking. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87765, 2014.

VERSLYCKE, T. A. et al. Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 23, n. 5, p. 1219-1234, 2004.

- VIDELER, J. J. **Fish swimming**. Springer Science & Business Media, 2012.
- VISSER, A. W. Motility of zooplankton: fitness, foraging and predation. **Journal of Plankton research**, v. 29, n. 5, p. 447-461, 2007.
- TABOADA, B. et al. Automatic tracking and analysis system for free-swimming bacteria. *In: Engineering in Medicine and Biology Society, 2003. Proceedings of the 25th Annual International Conference of the IEEE*. IEEE, p. 906-909, 2003.
- TAGUCHI, M.; LIAO, J. C. Rainbow trout consume less oxygen in turbulence: the energetics of swimming behaviors at different speeds. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 9, p. 1428-1436, 2011.
- TAHEDL, H.; HÄDER, D. P. Automated biomonitoring using real time movement analysis of *Euglena gracilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, n. 2, p. 161-169, 2001.
- TEODOROVIC, I. et al. Sensitivity of bacterial vs. acute *Daphnia magna* toxicity tests to metals. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 4, p. 482-492, 2009.
- TESTER, P. A.; COSTLOW, J. D. Effect of insect growth regulator Dimilin (TH 6040) on fecundity and egg viability of the marine copepod *Acartia tonsa*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 5, p. 297-302, 1981.
- TISELIUS, P.; SAIZ, E.; KIØRBOE, T. Sensory capabilities and food capture of two small copepods, *Paracalanus parvus* and *Pseudocalanus* sp. **Limnology and Oceanography**, v. 58, n. 5, p. 1657-1666, 2013.
- TSUBOKO-ISHII, S.; BURTON, R. S. Sex-specific rejection in mate-guarding pair formation in the intertidal copepod, *Tigriopus californicus*. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0183758, 2017.
- TITELMAN, J. Swimming and escape behavior of copepod nauplii: implications for predator-prey interactions among copepods. **Marine Ecology Progress Series**, v. 213, p. 203-213, 2001.
- TITELMAN, J.; KIØRBOE, T. Motility of copepod nauplii and implications for food encounter. **Marine Ecology Progress Series**, v. 247, p. 123-135, 2003.
- TITELMAN, J. et al. Copepod mating: chance or choice?. **Journal of Plankton Research**, v. 29, n. 12, p. 1023-1030, 2007.
- ULLAH, S.; ZORRIEHZAHRA, M. J. Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 40-57, 2015.
- UNTERSTEINER, H.; KAHAPKA, J.; KAISER, H. Behavioural response of the cladoceran *Daphnia magna* Straus to sublethal Copper stress—validation by image analysis. **Aquatic toxicology**, v. 65, n. 4, p. 435-442, 2003.
- UTTIERI, M. et al. On the relationship between fractal dimension and encounters in three-dimensional trajectories. **Journal of theoretical biology**, v. 247, n. 3, p. 480-491, 2007.
- UTTIERI, M. PAFFENHÖFER, G.; MAZZOCCHI, M.G. Prey capture in *Clausocalanus furcatus* (Copepoda: Calanoida). The role of swimming behaviour. **Marine biology**, v. 153, n. 5, p. 925-935, 2008.
- WAHAB, M.; DE NYS, R.; WHALAN, S. Larval behaviour and settlement cues of a brooding coral reef sponge. **Coral Reefs**, v. 30, n. 2, p. 451-460, 2011.
- WAGGETT, R. J.; BUSKEY, E. J. Calanoid copepod escape behavior in response to a visual predator. **Marine Biology**, v. 150, n. 4, p. 599-607, 2007.

WALLACE, W. G.; ESTEPHAN, A. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). **Aquatic Toxicology**, v. 69, n. 3, p. 289-297, 2004.

WARNER, R. E.; PETERSON, K. K.; BORGMAN, L. Behavioural pathology in fish: a quantitative study of sublethal pesticide toxication. **Journal of Applied Ecology**, v.3, p. 223-247, 1966.

WATRAS, C. J. Reproductive cycles in diaptomid copepods: effects of temperature, photocyclus, and species on reproductive potential. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 40, n. 10, p. 1607-1613, 1983.

WEDDERBURN, J. et al. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 257-267, 2000.

WEIS, J. S.; PERLMUTTER, J. Effects of tributyltin on activity and burrowing behavior of the fiddler crab, *Uca pugnator*. **Estuaries and coasts**, v. 10, n. 4, p. 342-346, 1987.

WEIS, J. S.; SMITH, G. M.; ZHOU, T. Altered predator/prey behavior in polluted environments: implications for fish conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 55, n. 1-2, p. 43-51, 1999.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 249-278, 1989.

WIBE, A. E.; ROSENQVIST, G.; JENSSEN, B. M. Disruption of male reproductive behavior in threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus* exposed to 17 β -estradiol. **Environmental research**, v. 90, n. 2, p. 136-141, 2002.

WILLIAMS, C. G. **Adaptation and natural selection: A critique of some current evolutionary thought**. New Jersey: Princeton University Press, 1996.

WHITELEY, N. M. Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. **Marine Ecology Progress Series**, v. 430, p. 257-271, 2011.

WU, C. et al. Behavioral interactions of the copepod *Temora turbinata* with potential ciliate prey. **Zoological Studies**, v. 49, n. 2, p. 157-168, 2010.

WU, R. S. S.; LAM, P. K. S.; ZHOU, B. S. Effects of two oil dispersants on phototaxis and swimming behaviour of barnacle larvae. *In: Asia-Pacific Conference on Science and Management of Coastal Environment*. Dordrecht: Springer, p. 9-16. 1997.

ZALA, S.; PENN, J. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. **Animal Behaviour**, v. 68, n. 4, p. 649-664, 2004.

ZHADAN, P. M. et al. The effect of environmental pollution, hydrocarbons and heavy metals on reproduction of sea urchins and bivalves. *In: Oceanic and anthropogenic controls of life in the Pacific Ocean*. Dordrecht: Springer, p. 267-286, 1992.

ZINKL J. G. et al. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In: MINEAU, P. Cholinesterase-inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment*. Elsevier, 1991.