

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA  
BIOLÓGICA

**ACUMULAÇÃO E TOXICIDADE DO COBRE  
EM ANIMAIS DE PRAIAS ARENOSAS DO  
EXTREMO SUL DO BRASIL**

**SAMANTHA ESLAVA GONÇALVES MARTINS**

Tese apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em  
Oceanografia Biológica da  
Universidade Federal do Rio  
Grande, como requisito parcial à  
obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Adalto Bianchini

Rio Grande  
Novembro de 2008

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em minhas decisões, e estão sempre do meu lado, mesmo com uma distância de 1500 km ! E a toda minha família, em especial meu irmão Fernando, que finalmente veio me visitar, e minha tia Solange, pelo ótimo tempo que passamos juntas durante minha passagem pela Europa, e também meus avós Yayo (*in memoriam*) e Yaya, por todo o apoio, desde sempre.

Ao meu orientador, Adalto Bianchini, pelos ensinamentos, paciência e especialmente pela confiança e apoio no meu doutorado sanduíche.

Ao Dr. Colin Janssen, que me recebeu de portas abertas em Ghent e foi sempre prestativo e atencioso. E Dr. Karel De Schampelaere, com quem aprendi muito durante o doutorado sanduíche. Também a toda a turma do laboratório de Toxicologia da UGent, por ser sempre prestativa e paciente, em especial a Marianne, pela amizade e por me auxiliar em tudo que precisei em terras longínquas, e ao Raphael, que dividiu comigo “The Dungeons Room”.

À Jéssica, Taty e Luiz, grandes amigos que fiz, e que tornaram a vida na Bélgica ainda mais prazerosa.

Ao Felipe Niencheski, João Paes e Bemvenuti, não apenas por aceitarem fazer parte da banca, mas também pela amizade e confiança. E ao Prof. Adalberto Val, por aceitar vir de muito longe para contribuir com a qualidade do trabalho.

Ao Buda, Lorena, Natan e Marcelo Okamoto, que auxiliaram nas minhas atividades e contribuíram para o bom desenvolvimento do trabalho.

À Indi, Lygia e Mari Basso e Rony, que estão sempre prontas prá me ajudar na hora da correria. E ajudaram muito !!

À turma que não se larga: Lygia, Flávio, Haig They e Mari Lauer, pelos incontáveis momentos de muita gargalhada.

A Camila e ao Rony, grandes amigos que estão sempre ao meu lado, pro que der e vier.

Ao Giba, sempre disposto a ajudar nas coletas, e sempre com uma história divertida prá contar.

À ComCur do PPGOB, principalmente pela oportunidade doutorado sanduíche. À Vera, sempre disposta a ajudar. Ao André Noble, que sempre foi atencioso e facilitou muito o processo do sanduíche. E a CAPES, pelo suporte financeiro no Brasil e na Bélgica.

Ao pessoal do Handebol, especialmente ao Maneca, Fernando, Lucas, Giovany e família, Vaca e família, Dani, Tati, Matheus, Elis, Jeffa, Madruga e Mel. Seja prá jogar ou prá comer, estar com vocês é sempre divertido !

E a todos os meus amigos, que surgiram antes ou durante esta etapa, mas que com certeza vão ficar prá sempre: Camila, Rony e Roberta, Indi, Lygia, Biba e Maurício, Mari Basso e Cássio, Roberta carioca, Fernando, Maneca, Lucas, Flávio Manoel Pingafôgo da Silva, Haig They, Lilian e Cleverson, Grasi e Duane, Carlinha, Ju e Nino, Kiti, Rrafaela Cederón, Roberrta, Thaís, Maíra, Marcos e Rúbia, Jaca, Janaína, Cristiano, Mari Lauer, Sandrinha e Igor, Liane, Lupe, Alessandra, Cibele e Daniel, Flávio, Simone, Regiane, Regilaine, Cinira, Priscila, Ana, Camille, Fabiane, Nelsinho, Marco... ufa... e talvez eu ainda tenha esquecido do seu nome !!

A vida é feita de momentos, e com vocês, eles são sempre ótimos. Obrigada !

## ÍNDICE

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1. Importância das praias arenosas e sua zona de arrebentação .....	10
1.2. A fauna da zona de arrebentação e intermareal das praias arenosas do sul do Brasil...	14
1.3. Utilização de ensaios ecotoxicológicos para avaliação da qualidade do meio e sensibilidade da biota .....	17
1.4. O cobre e sua importância como contaminante.....	18
1.5. Acumulação e Toxicidade do Cobre .....	20
1.6. Regulamentação da emissão de metais em águas costeiras.....	21
1.7. O Modelo do Ligante Biótico (BLM) e suas limitações.....	24
1.8. Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD).....	27
1.9. Modelo químico para especiação de metais em águas salinas.....	28
1.1.2. HIPÓTESES.....	30
1.1.3. OBJETIVOS .....	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
2.1. Delineamento experimental geral.....	34
2.2. Área de estudo .....	35
2.3. Material biológico.....	37
2.3.1. Ecologia e importância das espécies estudadas .....	37
2.3.1.1. Marisco branco <i>Mesodesma mactroides</i> Deshayes 1854.....	37
2.3.1.2. Misídeo <i>Metamysidopsis elongata atlantica</i> (Bacescu, 1968).....	40
2.3.1.3. Siri-chita <i>Arenaeus cribrarius</i> (Lamarck, 1818) .....	42
2.3.1.4. Pampo-malhado <i>Trachinotus marginatus</i> Cuvier 1832 .....	44
2.4. Coleta e aclimatação dos organismos .....	48
2.5. Determinação da CL <sub>50</sub> .....	50
2.6. Determinação da AL <sub>50</sub> .....	52
2.7. Bioacumulação de cobre in situ .....	56
2.8. Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD).....	59
2.9. Cinética de acumulação de cobre.....	59
2.10. Tratamento estatístico dos Dados .....	60
3. RESULTADOS .....	61
3.1. Determinação da CL <sub>50</sub> .....	61
3.1.1. Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD) .....	67
3.2. Acumulação de cobre em sistemas biológicos.....	70

3.2.1. Identificação do ligante biótico e determinação da cinética de acumulação de cobre.....	70
3.2.1.1. Acumulação de cobre no misídeo <i>Metamysidopsis elongata atlantica</i> .....	70
3.2.1.2. Acumulação de cobre no pampo-malhado <i>Trachinotus marginatus</i> .....	71
3.2.1.3. Acumulação de cobre no marisco branco <i>Mesodesma mactroides</i> .....	75
3.2.1.4. Acumulação de cobre no siri-chita <i>Arenaeus cribrarius</i> .....	82
3.2.2. Bioacumulação de cobre in situ .....	84
4. DISCUSSÃO.....	92
4.1. Determinação da CL50.....	92
4.1.1. Distribuição da Sensibilidade de Espécies.....	101
4.2. Acumulação de cobre em sistemas biológicos.....	104
4.2.1. Determinação do ligante biótico e da cinética de acumulação de cobre.....	104
4.2.2. Variações sazonais e espaciais na acumulação de cobre <i>in situ</i> .....	113
5. CONCLUSÕES .....	119
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	121
7. REFERÊNCIAS.....	123

## **RESUMO**

A zona de arrebentação das praias arenosas do extremo Sul do Brasil constitui um ambiente de extrema importância para o recrutamento e assentamento de muitas espécies. Em função do crescente desenvolvimento industrial e urbano nas últimas décadas, o estudo de possíveis alterações neste ecossistema torna-se fundamental. O objetivo do presente estudo foi, portanto, avaliar a acumulação e toxicidade do cobre, em guildas do ecossistema em questão, para avaliar suas respostas às possíveis elevações dos níveis deste contaminante. Indivíduos do misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica*, pampo-malhado *Trachinotus marginatus*, marisco branco *Mesodesma mactroides* e siri-chita *Arenaeus cribrarius* foram submetidos à testes para determinação da toxicidade do cobre (CL<sub>50</sub>) e cinética de acumulação deste metal. Um estudo *in situ* também foi realizado para verificar a possível influência da dinâmica do ambiente e da sazonalidade sobre a acumulação do cobre nas espécies estudadas. Os resultados obtidos indicam que o misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica* é a espécie mais sensível ao cobre e que pode ser utilizada para estabelecer novos limites de emissão deste metal em praias arenosas. Por sua vez, o bivalve *M. mactroides* apresentou as características relevantes para o uso em futuros estudos de biomonitoramento da contaminação da zona costeira pelo cobre. Os dados de acumulação em tecidos de animais expostos ao cobre em laboratório indicaram que as brânquias dos pampos e dos mariscos, bem como os misídeos íntegros podem ser utilizados como modelos biológicos para avaliar a biodisponibilidade e toxicidade do cobre em praias arenosas. O estudo *in situ* mostrou que a

acumulação de cobre no inverno é maior nos indivíduos que habitam o Molhe Leste, indicando um maior aporte do metal nesta região no inverno. No verão, os maiores níveis de acumulação foram geralmente observados em áreas de maior impacto antrópico.

Palavras-chave: acumulação e toxicidade do cobre, *Arenaeus cribrarius*, *Mesodesma mactroides*, *Metamysidopsis elongata atlantica*, praias arenosas, *Trachinotus marginatus*.

## **ABSTRACT**

Many species depend on the surf zone of the southernmost Brazilian sandy beaches for recruitment or settlement. Studies aiming to evaluate any kind of alteration of this ecosystem are very important because the growing industrial and urban development observed around this region over the last decades. Therefore, the main goal of the present study was to evaluate copper accumulation and toxicity in key species of the surf zone community to verify their responses to increased levels of this metal. Individuals of the mysid *Metamysidopsis elongata atlantica*, pompano *Trachinotus marginatus*, yellow clam *Mesodesma mactroides* and speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* were subjected to tests for determination of toxicity (LC<sub>50</sub>) and accumulation of copper. A field study was also performed to verify how environmental dynamics and season would be influencing copper accumulation in the studied species. Results showed that the mysid *M. elongata atlantica* is sensitive to copper, being a potential model to be used in establishing more safe limits for copper emission. They also showed that bivalve *M. mactroides* would be a good model to be used in future biomonitoring programs of copper contamination in coastal waters. Data from the tissue accumulation studies performed in laboratory indicated that gills from fish and bivalves, as well as mysids can be employed as biological models to evaluate copper bioavailability and toxicity in sandy beaches. Data from the field study showed that copper accumulation was higher in individuals collected at the Molhe Leste area in winter, indicating a higher local input of the metal in this season. In summer, the higher accumulation levels were generally observed in more anthropic impacted areas.

Keywords: Copper accumulation, copper toxicity, *Metamysidopsis elongata atlantica*, *Mesodesma mactroides*, *Arenaeus cribrarius*, *Trachinotus marginatus*.

## **1. INTRODUÇÃO**

O uso dos corpos de água pelo ser humano é conhecido desde o início da história humana, especialmente devido à abundância de recursos e como meio de transporte. Atualmente, cerca de 60% da população humana se concentra em uma faixa de 100 km de distância da linha de costa, dependendo direta ou indiretamente do mar para sobrevivência (Awosika & Marone 2000).

Devido à crença antiga de que os oceanos atuam como um receptáculo infinito das descargas humanas, durante muito tempo não houve preocupação com o lançamento de esgotos, lixo e contaminantes industriais e urbanos nos mares. No entanto, sabe-se hoje, que muitos problemas vêm sendo causados pelo uso desenfreado dos mares e oceanos como destino final de resíduos. Além disso, o crescente desenvolvimento urbano e industrial vem aumentando cada vez mais os níveis de substâncias tóxicas que atingem estes corpos d'água.

Uma vez que a linha de costa se localiza ao nível do mar (altitude zero), o ambiente costeiro constitui a bacia receptora da água continental e, conseqüentemente, dos dejetos que ela carrega. Sendo assim, as descargas fluviais transportam grandes quantidades de poluentes para o ambiente costeiro, de modo que grande parte da poluição mundial assenta em lagunas costeiras, estuários, áreas inundáveis, pradarias submersas e recifes de corais. Os contaminantes ficam parcialmente retidos na água e no sedimento dos estuários, baías, praias ou águas costeiras abertas, e são parcialmente transportados para a região oceânica (Clark 1996).

Dentre os contaminantes que atingem a região costeira, encontram-se os metais, que uma vez em contato com a água, podem formar complexos inorgânicos ou orgânicos ou, ainda, se apresentarem retidos à diversas partículas. Os metais que se encontram na forma de íons metálicos são os de maior preocupação, visto que são os mais disponíveis à biota (Cross & Sunda 1982).

### **1.1. Importância das praias arenosas e suas zonas de arrebenção e de varrido**

A maior parte da linha de costa mundial é composta por praias arenosas (McLachlan 1983). As variações na distribuição, composição e estrutura das praias arenosas depende dos fatores abióticos que regem o ecossistema, bem como das comunidades que lá habitam. As características geomorfológicas da praia determinam os tipos e energia de ondas e a granulidade, porosidade e permeabilidade do sedimento (Brown & McLachlan 1990). Desta forma, Short & Wright (1983) classificaram as praias arenosas em três tipos principais: as praias dissipativas, que apresentam sedimentos finos, alta energia de ondas e baixa declividade, permitindo o surgimento de uma larga zona de arrebenção, e como conseqüência uma maior densidade e diversidade de organismos; as praias reflectivas, que apresentam sedimento grosseiro e uma alta declividade, que faz com a que a energia de onda se concentre na face praial e seja refletida; e as praias intermediárias, que apresentam características dos dois grupos descritos anteriormente, sendo classificadas em diversos subgrupos, de

acordo com a maior proximidade a um ou outro tipo de praia. Além dos fatores abióticos, muitos autores vêm atribuindo as flutuações na diversidade e densidade das comunidades, às respostas à dinâmica populacional das populações dominantes (Defeo 1996).

No Brasil, o predomínio da linha de costa é também de praias arenosas. Na costa do Rio Grande do Sul, estas estão sujeitas a ações de ondas moderadas e fortes, com ondulações de leste-nordeste esbeltas e curtas, e as de sudeste normalmente apresentando maior energia (Calliari & Fachin 1993).

A Praia do Cassino (RS) faz parte de uma costa arenosa baixa, originária do período quaternário, com alta exposição à ação de ondas de alta energia. Devido a estas características, esta região apresenta uma hidrodinâmica muito forte, com uma zona de arrebentação extensa, e uma deriva litorânea bastante significativa (Garcia 1998). A linha de costa apresenta-se uniforme e quase retilínea, sem quaisquer formações de baías, enseadas ou sacos (Cunha 1987). O principal fator hidrodinâmico que exerce influência sobre este ecossistema é a entrada de frentes meteorológicas, visto que o regime de marés apresenta baixa amplitude, sendo fortemente influenciado por fatores meteorológicos (Gianuca 1983).

A formação de uma importante zona de arrebentação está associada aos tipos de águas que atingem a região costeira. As águas da margem continental do sul do Brasil são influenciadas pela Convergência Subtropical (CST), que é formada pela Corrente do Brasil (CB) que transporta Água Tropical (AT) em direção ao sul, e pelo ramo costeiro da Corrente das Malvinas (CM) que transporta Água Subantártica (ASA) para o norte. A convergência entre elas

forma a Água Subtropical (AST) (Garcia 1998). Desta forma, são as interações entre a Corrente do Brasil oligotrófica, a Corrente das Malvinas, que transporta águas ricas em nutrientes, e a descarga continental, que conferem à região costeira das praias do sul do Rio Grande do Sul uma importante área de criação e fonte de alimentação, bem como de reprodução de estoques pesqueiros, que utilizam estas correntes para o transporte de longa distância (Seeliger & Odebrecht 1998). São também o aporte continental e as massas de água que determinam as características químicas das águas da região costeira ao longo das estações do ano (Niencheski & Fillmann 1998).

A costa do Rio Grande do Sul recebe a contribuição de vários aportes continentais, sendo o mais importante para a área abordada no presente estudo, o deságüe de água do sistema Patos-Mirim. Cerca de 70% do deságüe continental em todo o estado do Rio Grande do Sul é atribuído à Lagoa dos Patos e à Lagoa Mirim (Vieira 1984). A zona costeira do extremo sul do Brasil encontra-se adjacente à boca do estuário da Lagoa dos Patos, que se caracteriza por ser influenciada pela saída de águas continentais e sedimentos provenientes de uma grande bacia hidrográfica, com 183.523 km<sup>2</sup>, dos quais 75% fazem parte do sistema hidrológico da Lagoa dos Patos e 25% correspondem ao sistema da Lagoa Mirim (Hartmann 1988).

A zona de arrebenção de uma praia é um ambiente altamente dinâmico, caracterizada pela interação das ondas com o fundo arenoso (McLachlan 1980). Os movimentos da água e os deslocamentos da areia são os principais processos físicos que regem a zona de arrebenção interna de praias arenosas. O primeiro envolve a ação de ondas e as correntes geradas por elas,

e também as correntes formadas por ação eólica e as correntes de maré (Swart 1983). O movimento da areia compreende a ressuspensão de partículas do sedimento de fundo, que é decorrente da ação das ondas ou correntes litorâneas, bem como a deriva litorânea, que consiste no transporte de sedimentos ao longo da costa (Willcock 1987). Quando o sedimento é revolvido, diversos representantes da infauna e epifauna são movimentados, sendo estes movimentos de grande importância para a teia trófica dentro do habitat considerado (Cunha 1987). Além disso, a ressuspensão do sedimento também devolve à coluna d'água material que se encontrava precipitado, incluindo contaminantes. O sedimento revolvido também libera nutrientes para a coluna d'água, favorecendo a floração de organismos fitoplanctônicos, que servem de base alimentar para muitos metazoários. Esta riqueza de alimento presente na zona de arrebentação faz ainda com que este ambiente atue como berçário para muitas espécies de peixes (Lasiak 1981).

Associada à zona de arrebentação interna, encontra-se a zona de varrido ou intermareal, que é caracterizada pela inundação decorrente do regime de marés, e pode ser dividida em subzonas, em função do regime de ventos e composição da infauna. Na Praia do Cassino, a zona de varrido pode ser dividida em zona intermareal inferior e superior, na primavera e no outono, e em zona intermareal inferior, médio e superior, no verão e no inverno (Neves *et al.* 2007). A zona de varrido é importante para o recrutamento de diversas espécies da macrofauna bentônica, como o marisco branco *Mesodesma mactroides* (Neves *et al.* 2007).

O equilíbrio de um ecossistema aquático ocorre a partir da interação das espécies da biota local entre si e destas com os parâmetros físico-químicos da água. Sendo assim, cada organismo desempenha um papel fundamental no ambiente, de modo que alterações na estrutura deste podem acarretar uma série de prejuízos ao ecossistema, levando ao declínio de populações e à degradação de habitats.

## **1.2. A fauna das zonas de arrebentação e de varrido das praias arenosas do sul do Brasil**

As zonas de arrebentação e intermareal são de grande importância como área de crescimento para muitas espécies de peixes e invertebrados, incluindo peixes de valor comercial e esportivo, como os pampos (*Trachinotus spp.*), tainhas (*Mugil spp.*) e papa-terras (*Menthycirrhus littoralis*) (Anderson *et al.* 1977, Cunha 1981). Além de constituir uma área de farta abundância de alimentos, a zona de arrebentação serve ainda como corredor de migração e refúgio contra predadores (Busoli & Muelbert 1999, Monteiro-Neto *et al.* 2000).

As interações ambientais e relações tróficas entre os diferentes componentes da comunidade sugerem que a praia e suas porções inferiores, constituídas pelas zonas de varrido e de arrebentação interna, no extremo sul do Brasil, funcionem como um ecossistema fechado, e em muitos aspectos, auto-sustentável (Garcia & Gianuca 1998).

A estrutura trófica da macrofauna de zonas de arrebentação e intermareal de praias arenosas é normalmente dominada por filtradores (McLachlan 1983),

sendo que os bivalves estão entre os principais responsáveis pelos altos valores de biomassa. Neste contexto, *Donax hanleyanus* e o marisco branco *Mesodesma mactroides* são os principais representantes dos bivalves nas zonas de varrido de praias arenosas do sul do Brasil (Gianuca 1983, 1985).

Com relação à comunidade zooplanctônica, a zona de arrebentação de praias arenosas é dominada por misídeos e copépodes (McLachlan 1983), sendo as espécies mais abundantes da praia do Cassino o copépode *Acartia tonsa* e o misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica* (Montú *et al.* 1998).

Considerando as espécies de peixes dominantes, representantes do gênero *Trachinotus* estão entre os mais abundantes na zona de arrebentação de praias arenosas ao longo de toda sua distribuição (Anderson *et al.* 1977, Cunha 1981, Modde & Ross 1981). No sul do Brasil, juvenis do pampomalhado *Trachinotus marginatus* apresentam as maiores abundâncias dentre as espécies de peixes, ao lado de juvenis do clupeídeo *Brevoortia pectinata* e do mugilídeo *Mugil platanus* (Chao *et al.* 1982, Cunha 1987, Pereira *et al.* 1998, Lana 2005).

A fauna das zonas de arrebentação e de varrido das praias arenosas é ainda constituída por poliquetas e crustáceos, como camarões, tatuíras e siris. Nas praias do extremo sul do Brasil, o decápode portunídeo mais abundante é o siri-chita *Arenaeus cribrarius* (Pereira *et al.* 1998).

Muitos estudos vêm sendo realizados na zona de arrebentação das praias arenosas do sul do Rio Grande do Sul, evidenciando a grande importância desta área. No entanto, a grande maioria dos estudos aborda a dinâmica das populações, englobando aspectos como composição, distribuição, frequência

de ocorrência e abundância das espécies (Cunha 1981, 1987, Chao *et al.* 1982, Monteiro-Neto *et al.* 2000, Ramos & Vieira 2001), sendo estudos ecotoxicológicos virtualmente ausentes na região.

A zona de arrebentação da Praia do Cassino é a principal área de criação do pampo malhado *Trachinotus marginatus*, de forma que qualquer impacto ambiental que afetar esta área tenderá a refletir, direta ou indiretamente, sobre as populações desta espécie (Cunha 1987). Similarmente, a zona intermareal deste ambiente confere um local ideal para o assentamento de moluscos bivalves, que dependem primariamente dos processos físicos e geológicos que regem as praias dissipativas e intermediárias, de modo que a instabilidade deste ambiente possivelmente causaria um declínio populacional deste grupo.

### **1.3. Utilização de ensaios ecotoxicológicos para avaliação da qualidade do meio e sensibilidade da biota**

Diversos métodos podem ser utilizados para avaliar a qualidade do meio adequada à sobrevivência de uma determinada espécie ou população. Dentre eles, os testes de toxicidade são amplamente aceitos e vem sendo padronizados pela Sociedade Americana para Testes de Materiais (ASTM), e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), para diversos organismos (ASTM 1997, ABNT 2005).

A escolha dos organismos a serem testados em testes toxicológicos, seja em laboratório ou no próprio campo, deve levar em conta a abundância e freqüência da espécie no ambiente (Flammarion *et al.* 2002). Uma vez que a toxicidade de metais, bem como de outros contaminantes, varia entre os filos, classes, ordens, famílias, gêneros e mesmo dentro da própria espécie, organismos de diferentes grupos taxonômicos devem ser testados, a fim de se obter um amplo espectro da sensibilidade da comunidade local a um determinado contaminante (Haaparanta *et al.* 1997). Além disso, os animais podem ainda apresentar diferentes susceptibilidades a estes compostos em diferentes fases do ciclo de vida, sendo que de um modo geral, os juvenis apresentam uma menor resistência aos contaminantes que os adultos (Dave 1986, Grosell *et al.* 2002). Sendo assim, a biologia dos animais deve também ser levada em consideração em pesquisas relacionadas à acumulação e toxicidade de poluentes.

A quantificação de metais no ambiente costeiro pode ser realizada por meio de análise de sedimento, água ou biota (Phillips 1980). Neste contexto,

análises em amostras biológicas de espécies biomonitoras são de extrema importância, pois o grau de acumulação de metais nos organismos retrata as frações biodisponíveis do metal no ambiente, sendo um bom medidor da saúde ambiental.

#### **1.4. O cobre e sua importância como contaminante**

Dentre os metais-traço que atingem a zona costeira, o cobre é um dos elementos inorgânicos que merece bastante atenção, visto que foi introduzido na lista de contaminantes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA 1986) e é um dos principais contaminantes lançados na Lagoa dos Patos (RS), a partir da qual atinge a região costeira (Baumgartem & Niencheski 1998).

O cobre é um elemento traço essencial, que exerce diversas funções nos organismos, constituindo os pigmentos respiratórios de invertebrados, estando ligado a pequenas moléculas, incluindo antibióticos e porfirinas, combinando-se também com enzimas catalíticas, e ainda associado à algumas organelas celulares, como as mitocôndrias (Pais & Jones 1997). No entanto, concentrações elevadas de metais-traços podem causar efeitos adversos nos organismos. Neste contexto, o cobre é considerado como um dos elementos mais nocivos, ao lado do mercúrio, cobalto, cádmio e boro (Pais & Jones 1997).

A comunicação do estuário da Lagoa dos Patos com o ambiente marinho ocorre na desembocadura da laguna, situada entre a Praia do Cassino (Rio Grande, RS), localizada ao sul, e a Praia do Mar Grosso (São José do Norte,

RS), ao norte. Esta região estuarina é dominada por ventos do quadrante nordeste (Klein 1998). O vento controla a circulação, a distribuição de salinidade e os níveis de água (Garcia 1998). Dessa maneira, a água proveniente da laguna tende a se deslocar em direção à Praia do Cassino. Esta característica física e geográfica pode interferir na distribuição de contaminantes ao longo do ambiente costeiro. Considerando-se ainda que a especiação dos metais varia nos mais diversos ambientes, dependendo das características físico-químicas, geológicas e biológicas de cada um destes, espera-se que a biodisponibilidade do cobre, para uma mesma espécie, seja diferente dependendo do habitat onde se encontra um grupo de organismos.

As principais fontes de cobre de origem antrópica que atingem as águas do extremo sul do Brasil são as indústrias de fertilizantes, atividades portuárias, esgoto industrial e urbano, além de atividades de mineração, que, embora cessaram em 1995, podem ainda estar contribuindo com parte do aporte de cobre residual que hoje encontra-se presente no ambiente (Baugartem & Niencheski 1998, Corradi 2002).

Trabalhos realizados no estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente têm demonstrado um aumento nas concentrações de cobre no sedimento e na água das regiões localizadas no entorno de pólos industriais e portuários. No início da década de 80, a concentração de cobre dissolvido na boca do estuário se encontrava em torno de 2 µg/L (Seeliger & Knak 1982a,b). Quase 20 anos mais tarde, valores de até 34 µg/L foram registrados na mesma área por Baugartem e Niencheski (1998), que atribuíram este aumento principalmente às atividades portuárias.

### 1.5. Acumulação e Toxicidade do cobre

A afinidade do cobre pelos sítios ativos de ligação nas brânquias ou outros órgãos e tecidos varia de acordo com as próprias características morfo-fisiológicas do organismo. Sendo assim, em um ambiente exposto às mesmas condições biológicas e físico-químicas, diferentes espécies de animais podem apresentar comportamento diferente com relação à assimilação de cobre em seus tecidos. Isto torna importante o conhecimento da sensibilidade a este metal em diferentes organismos, para que se possa identificar as espécies mais sensíveis e utilizá-las como referência para se estabelecer concentrações de cobre viáveis de serem lançadas no ambiente sem prejuízos à biota local. Geralmente, as espécies menores tendem a apresentar maior sensibilidade, em virtude da maior taxa de circulação de sódio devido a maior atividade encontrada nestes organismos (Grosell *et al.* 2002).

A toxicidade do cobre ocorre quando uma determinada concentração deste metal (que varia dependendo da espécie animal) se liga a sítios fisiologicamente ativos nas membranas dos animais, reduzindo ou impedindo o transporte de outros cátions, fundamentais para a manutenção da homeostasia do organismo (MacRae *et al.* 1999).

As brânquias, por apresentarem uma grande área de exposição em contato direto com água, são as principais vias de entrada para a maior parte dos contaminantes (Evans *et al.* 1988, Heath 1995, Haaparanta *et al.* 1997, Aas *et al.* 2000, Delistraty 2000), e desta forma são consideradas o sítio primário de toxicidade do cobre em diversos grupos de animais (Morgan *et al.* 1997), de

forma que geralmente distúrbios iônico e osmorregulatórios são primariamente associados às respostas toxicológicas do cobre.

No entanto, para a que o cobre exerça toxicidade em uma espécie aquática, a concentração deste metal na água deve exceder a capacidade combinada do carbono orgânico dissolvido complexar este metal, dos cátions se ligarem ao ligante biótico em competição com o cobre, da química da água transformar o metal em frações não tóxicas, do carbono orgânico particulado adsorver o metal, e ainda de partículas minerais incorporarem o metal dentro de suas matrizes (Arnold *et al.* 2005). Desta forma, os parâmetros físico-químicos da água apresentam grande influência sobre a especiação e toxicidade do cobre (Di Toro *et al.* 2000).

#### **1.6. Regulamentação da emissão de metais em águas costeiras**

O tema ambiente e poluição vem ganhando crescente preocupação em muitos países, e isto tem estimulado instituições de pesquisa e órgãos competentes a regulamentar a emissão de contaminantes nos diversos ecossistemas, sejam eles aquáticos ou terrestres.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o órgão ambiental responsável pelo estabelecimento de limites de emissão de contaminantes nos diversos ecossistemas. A Resolução N° 357, de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Segundo este documento, a

concentração de cobre dissolvido permissível de ser lançada no ambiente costeiro é de 5 µg/L, mas em condições especiais, a agência pode permitir lançamentos de até 1 mg/L deste metal (CONAMA 2005).

Apesar dos avanços na regulamentação de metais nos ambientes aquáticos com relação ao documento anterior (CONAMA 1986), o controle realizado pelo CONAMA apresenta ainda muitas lacunas. A qualidade das águas é mantida pela regulamentação da emissão de metais na fase dissolvida, mas testes toxicológicos para determinar a sensibilidade de espécies-alvo ainda são escassos no país. Além disso, por ser um órgão nacional, o CONAMA considera a costa brasileira praticamente como um ambiente único, não levando em consideração as grandes diferenças nas características físicas e químicas da água, geológicas nos diferentes tipos de praias e biológicas com relação às diferentes composições faunísticas e florísticas encontradas nos diversos ecossistemas da extensa linha de costa brasileira.

Sendo assim, é fundamental que pesquisas ecotoxicológicas sejam amplamente desenvolvidas pelas instituições de pesquisa nacionais, para que critérios de qualidade de água diferentes possam ser definidos, considerando as características particulares de cada ambiente, que vão influenciar a especiação dos metais, e conseqüentemente a acumulação e toxicidade destes à biota.

Para que procedimentos de manejo e controle de poluição possam ser estabelecidos, deve-se primeiramente identificar o foco de poluição e a partir de então delinear um desenho experimental adequado para se avaliar os riscos

daquele contaminante específico. Howells (1976) identificou as principais etapas necessárias para que medidas de controle de determinado contaminante possam ser estabelecidas (Fig. 1.1).

Após a identificação do agente tóxico, medidas das concentrações basais e danosas deste contaminante devem ser determinadas em organismos susceptíveis a esta contaminação. Neste estágio, programas de monitoramento e controle são às vezes requeridos, embora sem o entendimento da relação dose-resposta, dos mecanismos de toxicidade e de avaliações de riscos (Howells 1976).

Sendo assim, um próximo estágio deve consistir em relacionar as concentrações observadas aos efeitos deletérios que elas causam, a partir da realização de testes de toxicidade do contaminante analisado. No entanto, a resposta de uma espécie deve ser diferente da resposta de toda a comunidade, visto que para se verificar a saúde de um ambiente, deve-se considerar a resposta da comunidade como um todo (Howells 1976). Deste modo, é importante verificar os efeitos da poluição em diversos representantes-chave da comunidade, para que toda ou a maior parte das espécies seja protegida.

Realizar estudos envolvendo uma grande variedade de modelos biológicos; em conjunto com todas as variáveis ambientais, incluindo a presença de outros poluentes; em todos os estágios ontogenéticos; e em todas as guildas, é claramente impraticável (Howells 1976). Felizmente, existem ferramentas que ajudam a avaliar os riscos de contaminantes de forma confiável, reduzindo em muito os custos financeiros e o tempo dedicado às experimentações.

Para isso, muitos modelos matemáticos vêm sendo criados e têm se mostrado como uma importante ferramenta na compreensão da dinâmica dos ambientes. Dentre os modelos existentes, o mais robusto atualmente para avaliação de risco de metais em ambientes dulciaqüícolas é o Modelo do Ligante Biótico (BLM) (Di Toro *et al.* 2000). Este modelo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os riscos ecológicos causados por metais, e dessa forma vem contribuindo para a determinação da biodisponibilidade e toxicidade do cobre em organismos de água doce (Di Toro *et al.* 2000, Santore *et al.* 2001). O BLM foi reconhecido e vem sendo utilizado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA para estabelecer critérios de qualidade de água (USEPA 2003). A vantagem deste modelo sobre os demais existentes é que o BLM considera não apenas a química da água, mas também a presença de um ligante no organismo para predizer corretamente a toxicidade de metais, incluindo o cobre, enquanto os demais modelos não abordam aspectos fisiológicos.

### **1.7. O Modelo do Ligante Biótico (BLM) e suas limitações**

Embora o BLM seja uma ferramenta muito importante para a avaliação de riscos toxicológicos de metais em água doce (Di Toro *et al.* 2000, USEPA 2003), sua extensão para ambientes estuarinos e marinhos é ainda controversa, em função da base dos dados químicos que o modelo utiliza.

Os modelos geoquímicos utilizam a força iônica ( $I$ ) e os coeficientes de atividade do metal ( $\gamma$ ) para que a atividade do metal seja calculada. Desta

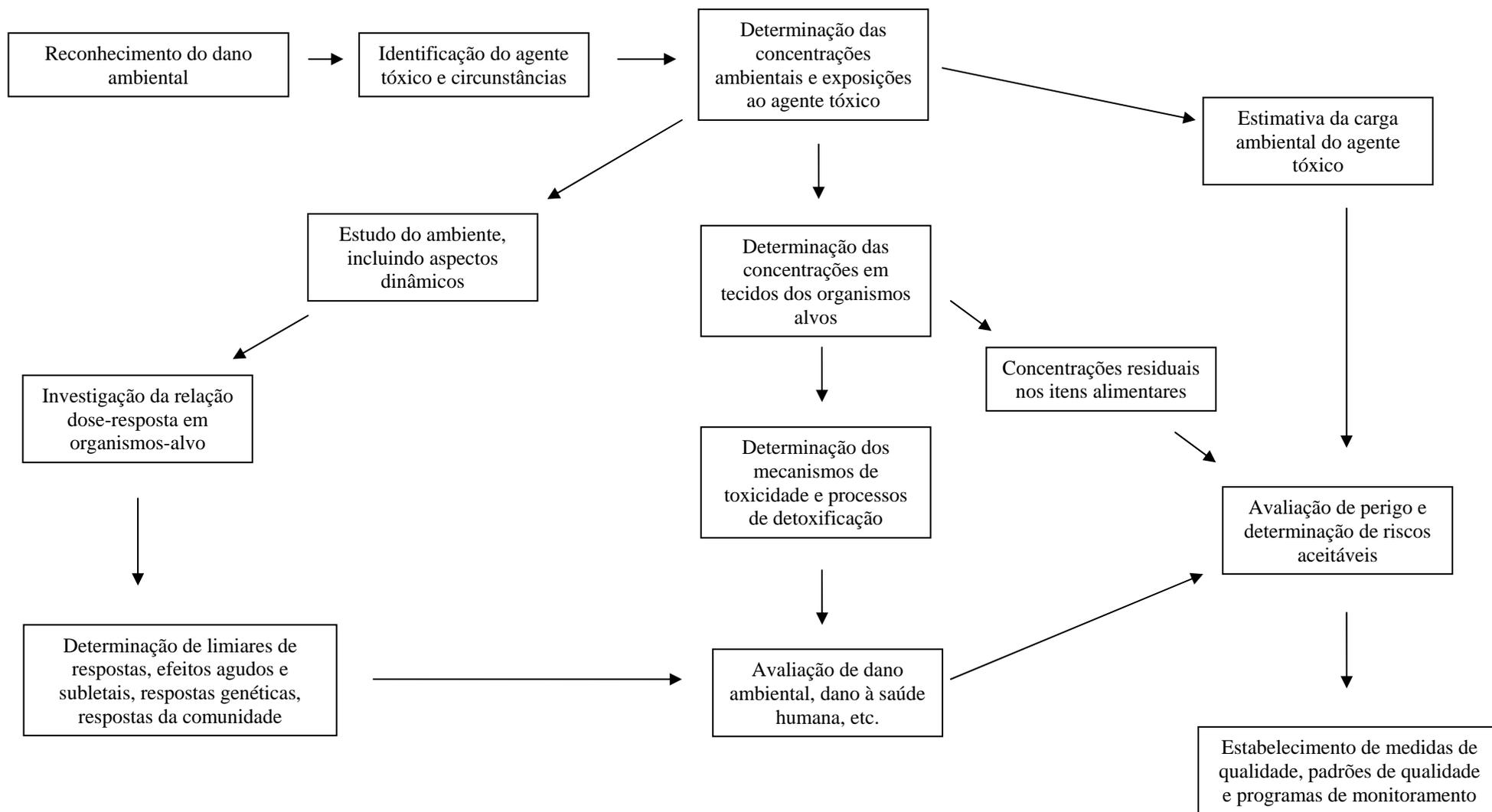
forma, a força iônica é uma variável importante, de modo que as equações são confiáveis quando os parâmetros analisados se encontram dentro de uma faixa de força iônica específica. O Modelo do Ligante Biótico utiliza a equação de Davies, como se segue:

$$-\log\gamma_i = A \cdot z_i^2 \left( \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - B \cdot I \right)$$

Onde  $\gamma_i$  é o coeficiente de atividade da espécie química  $i$ ,  $I$  é a força iônica,  $z$  é a carga da espécie,  $A$  é o coeficiente de Debye-Hückel (0,51 a 25°C) e  $B$  é o parâmetro  $B$  de Davies (0,3). A validade desta equação é limitada a forças iônicas baixas e intermediárias, de modo que a equação de Davies não é recomendada quando a força iônica  $I > 0,3$  M (Söhnel & Novotný 1985, Grenthe *et al.* 1997).

Em ambientes estuarinos e marinhos, a força iônica apresenta valores superiores a 0,4 M, e a equação de Davies, portanto, deve ser evitada, em função do erro que pode ocorrer.

Bianchini *et al.* (2003), no entanto, realizaram uma tentativa de validar o BLM para animais eurialinos e marinhos, e verificaram que o modelo tem potencial para ser estendido para estes ambientes, mas a base química deve ser ajustada para que o BLM englobe uma maior faixa de forças iônicas.



**Figura 1.1.** Esquema de investigação e avaliação de poluição. Traduzido de Howells (1976).

### 1.8. Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD)

Embora o BLM ainda não possa ser utilizado com confiança para a determinação da toxicidade e especiação de metais em ambientes com força iônica superior a 0,3 M, outras ferramentas podem ser aplicadas na tentativa de se estabelecer critérios de qualidade de água e avaliação de riscos ecológicos de metais em ambientes estuarinos e costeiros.

Pesquisadores e agências de regulamentação ambiental vêm utilizando com sucesso curvas de Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD) (Newman *et al.* 2000, USEPA 2003, Grosell *et al.* 2007). Esta curva depende da obtenção de dados de toxicidade do contaminante desejado em um número considerável de espécies ou gêneros, sendo que pelo menos oito espécies (ou gêneros) devem ser experimentadas (USEPA 2003).

Primeiramente, um mesmo parâmetro toxicológico é testado nas diferentes espécies estudadas (mortalidade, crescimento, sucesso reprodutivo etc.). O logaritmo natural de cada valor obtido é então determinado e plotado contra suas respectivas probabilidades.

A partir daí, as espécies (ou gêneros) mais sensíveis são determinadas. Geralmente, esta distribuição normal da sensibilidade de espécies visa a proteção de 95% da comunidade (Kooijman 1987, Wagner & Løkke 1991, Aldenberg & Slob 1993).

### **1.9. Modelo químico para especiação de metais em águas salinas**

A toxicidade de metais ocorre quando estes interagem com os ligantes bióticos do organismo-alvo, causando efeitos deletérios. No entanto, apenas uma fração do metal tem a capacidade de entrar no indivíduo, se ligar aos sítios ativos do ligante biótico e causar toxicidade, sendo esta fração constituída pelas espécies biodisponíveis do metal (Di Toro *et al.* 2000). De modo geral, as espécies iônicas são as que apresentam potencial tóxico. No caso do cobre, sua espécie mais tóxica é o íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Hall & Anderson 1999, De Schamphelaere *et al.* 2002, Paquin *et al.* 2002), mas algumas espécies hidroxiladas ( $\text{CuOH}^+$  e  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) são também tóxicas aos organismos (De Schamphelaere *et al.* 2002). Todas as frações tóxicas de cobre estão presentes na fase dissolvida do metal e podem ser estimadas a partir de modelagem química.

A determinação da especiação química para a obtenção das concentrações das espécies tóxicas de cobre, bem como a atividade destas espécies, é de grande importância, uma vez que as características físico-químicas do meio exercem grande influência na especiação de metais. Deve-se, portanto, se conhecer as espécies metálicas que realmente estão causando toxicidade e em que níveis esta toxicidade é causada. Neste contexto, o modelo químico Visual MINTEQ é uma ferramenta bastante confiável para a determinação da especiação química de metais em uma ampla faixa de salinidade.

O Visual MINTEQ é uma versão para o Windows do modelo MINTEQA2, desenvolvido, em 1999, pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA. O pacote computacional é mantido por dois conselhos de pesquisa suecos (MISTRA e VR) e sua última atualização ocorreu em 24/10/2007.

Este modelo permite ao usuário optar por uma entre três equações de correção de atividade, sendo que a equação de SIT (Specific Ion Interaction Theory) pode ser aplicada em qualquer faixa de força iônica até 4 M:

$$\log \gamma_i = -A \cdot z_i^2 \left( \frac{\sqrt{I}}{1 + 1,5\sqrt{I}} \right) + \sum_k \varepsilon(i, k) \cdot m_k$$

Neste caso,  $\varepsilon(i, k)$  é um coeficiente de interação de espécies que determina as interações curtas específicas entre as espécies  $i$  e  $k$ . A soma se estende para todas as espécies da solução. Quando  $I < 0,2$  M, a equação de SIT apresenta valores similares aos da equação de Davies. Entretanto, em forças iônicas superiores o termo  $\sum_k \varepsilon(i, k) \cdot m_k$  torna os resultados diferentes e mais confiáveis (Söhnel & Novotný 1985, Grenthe *et al.* 1997).

Sendo assim, a partir da inserção dos parâmetros físico-químicos do meio experimental e utilizando-se a equação de SIT, é possível determinar, por meio do Visual MINTEQ, a especiação do cobre a partir das concentrações do metal dissolvido determinadas experimentalmente.

### 1.1.2. HIPÓTESES

- A toxicidade do cobre varia entre os diferentes grupos taxonômicos testados, de acordo com as características fisiológicas de cada grupo;
- Uma vez que a taxa de circulação do sódio é maior em animais menores, estes tendem a apresentar maior sensibilidade ao cobre, de modo que em organismos zooplancctônicos (*Metamysidopsis elongata atlantica*) o cobre apresenta maior toxicidade que em juvenis de bivalves (*Mesodesma mactroides*), macrocrustáceos (*Arenaeus cribrarius*) ou peixes (*Trachinotus marginatus*);
- O misídeo *M. elongata atlantica* pode ser utilizado como modelo para estabelecer concentrações máximas permissíveis de cobre no ambiente, para fins de regulamentação ambiental;
- O modelo geoquímico de especiação Visual MINTEQ é uma ferramenta mais adequada que o BLM para a análise da especiação do cobre em ambientes costeiros, quando a química da água é o principal fator forçante da toxicidade;
- O marisco branco *M. mactroides*, à semelhança de outros bivalves, apresenta grande capacidade de acumulação de cobre em seus tecidos, sendo um bom bioindicador para uso em monitoramento de águas costeiras;
- Uma vez que ocorre maior aporte de contaminantes na Praia do Cassino, através das descargas provenientes do Sistema Patos-Mirim, animais que lá habitam apresentam maior concentração de cobre acumulado em seus

tecidos que populações de praias vizinhas, cujo impacto antrópico tende a ser menor;

- Devido à maior contribuição de contaminantes pelo aporte continental em períodos de maior pluviosidade, os níveis de acumulação de cobre nos tecidos das espécies estudadas são maiores no inverno.

### 1.1.3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi determinar o grau de acumulação e toxicidade do cobre em organismos costeiros de praias arenosas do extremo sul do Brasil, visando a obtenção de dados para estabelecer critérios de qualidade de água para esta região.

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Determinar a sensibilidade à exposição aguda ao cobre em invertebrados (misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica*, bivalve *Mesodesma mactroides* e portunídeo *Arenaeus cribrarius*) e vertebrados (teleósteo *Trachinotus marginatus*) marinhos que habitam a zona de arrebentação e intermareal da Praia do Cassino (Rio Grande, RS);
- Verificar a cinética de acumulação do cobre em organismos expostos às suas concentrações letais (CL<sub>50</sub>) do metal obtidas no presente estudo;
- Determinar o Ligante Biológico (órgão(s) envolvido(s) na toxicidade do cobre) nos organismos testados;
- Identificar, a partir de modelagem geoquímica, as principais espécies tóxicas de cobre e seus níveis presentes em águas costeiras de praias arenosas do extremo sul do Brasil;
- Comparar os dados de especiação do cobre obtidos a partir de duas ferramentas diferentes (Visual MINTEQ e BLM), para verificar a validade da atual versão do BLM em ambientes costeiros;
- Comparar, nas diferentes espécies analisadas, o grau de contaminação *in situ* em indivíduos que habitam duas praias do extremo Sul do Brasil, com

características e níveis de contaminação aparentemente diferentes;

- Verificar as variações sazonais *in situ* nos níveis de acumulação de cobre em tecidos dos indivíduos coletados em duas praias do extremo sul do Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Delineamento experimental geral**

Para atender aos objetivos do presente estudo, este foi dividido em três etapas. Para cada espécie estudada, primeiramente determinou-se a concentração letal para 50% dos indivíduos testados ( $CL_{50}$ ). A partir das concentrações obtidas, uma curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) foi construída, utilizando-se espécies costeiras para as quais a toxicidade do cobre já havia sido previamente determinada, e adicionando-se os valores de toxicidade encontrados para as espécies analisadas no presente estudo.

Também a partir dos dados de mortalidade, testes para determinar o ligante biótico foram realizados. Para tal, as espécies analisadas foram expostas às  $CL_{50}$  de cobre previamente determinadas e a concentração de cobre acumulada em diferentes tecidos ( $AL_{50}$ ), ao longo do tempo, foi determinada.

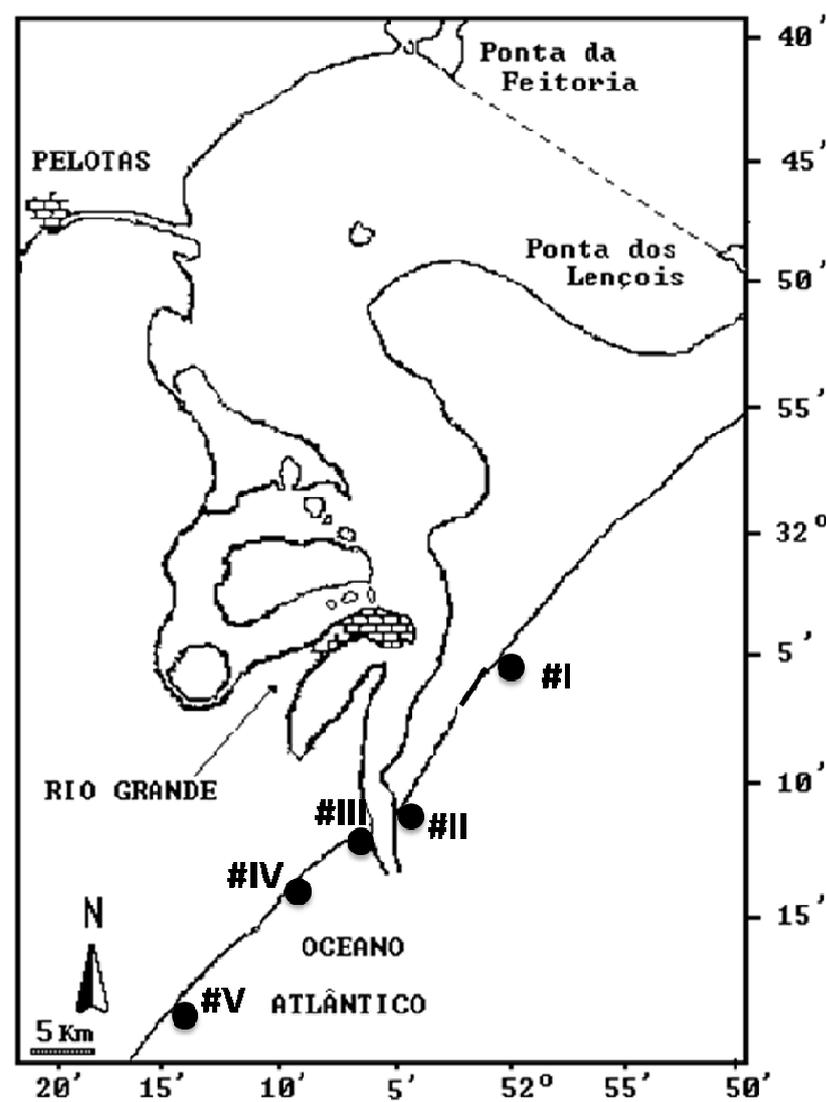
Uma terceira etapa consistiu na determinação da bioacumulação de cobre *in situ* em indivíduos coletados em duas praias do extremo sul do Rio Grande do Sul, que diferem em suas características fisiográficas. Além de permitir a comparação no grau de acumulação de cobre em diferentes pontos da costa sul-riograndense, esta etapa também permitiu verificar a influência da sazonalidade na acumulação do metal, visto que as coletas foram realizadas no verão e no inverno.

## 2.2. Área de estudo

Todos os exemplares utilizados para os testes de toxicidade aguda do cobre, bem como para os testes de acumulação do metal nos tecidos para a identificação dos ligantes bióticos, foram coletados nas zonas intermareal ou de arrebentação interna das praias do Cassino (Rio Grande, RS) e do Mar Grosso (São José do Norte, RS).

Para a determinação da bioacumulação do cobre *in situ* nos tecidos das espécies estudadas, os exemplares foram coletados em diferentes pontos da Praia do Cassino e do Mar Grosso. Três pontos de coleta foram amostrados na Praia do Cassino, sendo um deles imediatamente ao sul do Molhe Oeste (32°09'S; 52°06'W), próximo a desembocadura do estuário da Lagoa dos Patos, outro localizado no Balneário Cassino, em frente a passarela (32°11'S; 52°09'W), e um terceiro situado próximo ao navio encalhado (32°15'S; 52°14'W). Na Praia do Mar Grosso, um dos pontos amostrais localiza-se imediatamente ao norte do Molhe Leste (32°08'S; 52°04'W), e o outro cerca de 20 km ao norte do anterior (31°59'S; 51°55'W; Fig. 2.1).

Em função da influência que a temperatura exerce sobre as atividades metabólicas e fisiológicas do organismo, e sobre a especiação de metais, as coletas foram realizadas no verão e no inverno.



**Figura 2.1.** Área de estudo, indicando a localização aproximada dos pontos amostrais. (I) Mar Grosso; (II) Molhe Leste; (III) Molhe Oeste; (IV) Balneário Cassino; e (V) Navio. Modificado de Júlio Jr. (1993; <http://paginas.terra.com.br/servicos/camposjr/oceano/novo2/imagens/tgrad/estuario.GIF>).

### **2.3. Material biológico**

Todas as espécies analisadas no presente estudo exercem um papel chave na comunidade da zona de arrebentação da Praia do Cassino. São elas: o misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica* (Bacescus 1968); o bivalve *Mesodesma mactroides* Deshayes 1854 (marisco branco); o portunídeo *Arenaeus cribrarius* Lamarck, 1818 (siri-chita); e o teleósteo *Trachinotus marginatus* Cuvier, 1832 (pampo ou pampo-malhado).

Uma vez que a toxicidade do cobre pode variar não somente de acordo com a espécie, mas também com o habitat ocupado por estas, as espécies testadas no presente estudo foram selecionadas porque ocupam diferentes níveis tróficos dentro de uma mesma teia alimentar e pertencem a ordens ou filos diferentes. Além disso, os indivíduos testados para as diferentes espécies diferem entre si pelo tamanho e fases do ciclo de vida.

#### **2.3.1. Ecologia e importância das espécies estudadas**

##### **2.3.1.1. Marisco branco *Mesodesma mactroides* Desahyes 1854.**

PHYLUM MOLLUSCA

CLASSE BIVALVIA

SUBCLASSE HETERODONTA

ORDEM BIVALVIA

FAMÍLIA MESODESMATIDAE

O marisco branco *Mesodesma mactroides* é um bivalve filtrador suspensívoro que habita praias arenosas com sedimento fino e baixa

declividade (Olivier *et al.* 1971), distribuindo-se desde a baía de Santos (Brasil) até a boca do Rio Negro, na Argentina (de Castellanos 1970).

No sul do Brasil, seu principal item alimentar consiste de diatomáceas da espécie *Asterionellopsis glacialis* (Gianuca 1983, 1987), mas pode se alimentar também de protozoários, larvas de invertebrados, bactérias, detritos e outras espécies de algas (Olivier *et al.* 1971). A espécie apresenta a característica de se deslocar pelos diferentes estratos da praia em função da sazonalidade, permanecendo no infralitoral durante o inverno, onde pode inclusive desenvolver o hábito de comedor de depósito (Defeo & Scarabino 1990), e migrando massivamente para a zona intermareal durante a primavera (Olivier *et al.* 1971). Também é importante fonte de alimento para maçaricos e gaivotas, especialmente durante os meses de verão e outono (Vooren 1998). Constituem, ainda, um dos principais itens alimentares dos gastrópodes *Buccinanops duartei*, *Olivancellaria auricularia* e *O. uretai*, e do siri-chita *Arenaeus cribrarius*.

O marisco branco *M. mactroides* apresenta uma fase larval planctônica, com duração média de três semanas (Coscarón 1959), responsável pelo transporte e dispersão da espécie a longas distâncias, permitindo não apenas a colonização de novas regiões, mas também um fluxo gênico entre as áreas mais distantes (Marins & Levy 2000). Após este período, o animal reverte sua resposta fototática e assenta sobre o sedimento (Defeo *et al.* 1992).

O marisco branco é um animal de crescimento rápido e ciclo de vida curto. Sua longevidade é em torno de quatro anos (Defeo *et al.* 1992), sendo que indivíduos atingem o comprimento de até 40 mm no primeiro ano, 50 mm no

segundo, 60 mm no terceiro, e entre 61 e 64 mm no último ano (Olivier *et al.* 1971). O tamanho máximo registrado para a espécie foi de 76 mm (Defeo *et al.* 1992). Apresenta alta fecundidade, com produção de até 5,3 milhões de ovos por fêmea. A primeira maturação ocorre quando os indivíduos atingem em torno de 43 mm (Masello & Defeo 1986).

Embora no Brasil a espécie seja coletada apenas para sustento dos pescadores artesanais ou para comercialização em pequena escala, sendo vendida a restaurantes ou como isca para pesca esportiva, o marisco branco apresenta considerável potencial como recurso pesqueiro (Marins & Levy 2000). No Uruguai, ao contrário, *M. mactroides* constitui o segundo recurso malacológico mais explorado (Defeo 1985).

A descrição detalhada da morfologia adaptativa de *M. mactroides* pode ser encontrada no trabalho de Narchi (1981), que apontou várias características que permitiram a adaptação do marisco branco às praias arenosas. O sucesso adaptativo de *M. mactroides* depende primariamente dos processos físicos que regem a zona de arrebentação de praias dissipativas e intermediárias, de modo que alterações neste ambiente poderiam levar ao declínio das populações, tornando importante o estudo da tolerância da espécie às estas possíveis alterações.

**2.3.1.2. Misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica* (Bacescu,1968)**

PHYLUM ARTHROPODA

SUBPHYLUM CRUSTACEA

CLASSE MALACOSTRACA

SUPERORDEM PERACARIDA

ORDEM MYSIDA

FAMÍLIA MYSIDAE

O zooplâncton da zona de arrebentação no sul do Brasil é dominado por misídeos e copépodes, sendo que os misídeos podem ultrapassar 60% da abundância relativa, especialmente sob as condições de aumento da hidrodinâmica e influência de correntes de deriva. Das cinco espécies de misídeos presentes na zona costeira do Rio Grande do Sul (Montú *et al.* 1998), *Metamysidopsis elongata atlantica* é a mais abundante (Garcia & Gianuca 1998). Os misídeos são organismos abundantes em regiões costeiras, representando um elo em muitas cadeias alimentares marinhas, inclusive como fonte de alimento para peixes de alto valor comercial (Mauchline 1980).

O misídeo *M. elongata atlantica* é um crustáceo holoplanctônico, que apresenta ciclo de vida curto, com longevidade média de 116 dias para fêmeas e 99 dias para machos. A maturação ocorre aos 14 dias de vida, sendo a taxa de crescimento de 0,0453 mm/dia para organismos juvenis e de 0,0187 mm/dia para indivíduos com idade entre 15 e 45 dias. As mudas nos juvenis ocorrem em intervalos regulares, de modo que cinco mudas ocorrem nos primeiros 14 dias. Embora a maturação sexual ocorra no 14º dia, a presença de fêmeas ovadas é registrada a partir do 25º dia (Gama *et al.* 2002).

Com relação à eurialinidade, Gama e Zamboni (1999) registraram alta taxa de sobrevivência em salinidade 31, com organismos mostrando certa tolerância às salinidades entre 15 (50%) e 45 (14%), sendo a sobrevivência sempre superior a 70% em salinidades entre 18 e 35.

*Metamysidopsis elongata atlantica* uma espécie hiperbêntica, permanecendo associado aos fundos arenosos durante o dia e subindo à coluna d'água durante a noite, para alimentação (Zamboni 2000). Apresenta hábito alimentar onívoro, mas é preferencialmente carnívoro, alimentando-se de outros organismos planctônicos. Constitui também um importante elo trófico, sendo recurso alimentar para peixes zooplancatófagos e microcrustáceos bentônicos. Uma vez que apresentam uma distribuição agregada, constituem uma grande fonte de biomassa disponível para outros níveis tróficos (Gusmão *et al.* 1999).

As espécies de misídeos encontram-se entre as mais sensíveis a exposição de metais-traço (Nimmo & Hamaker 1982), de modo que vêm sendo amplamente utilizadas em testes de toxicidade (Badaró-Pedroso 1993, Nipper *et al.* 1993), em função da sua importância na teia trófica de seus ambientes e também da adaptabilidade à sua manutenção em cativeiro (Gama *et al.* 2002).

### 2.3.1.3. Siri-chita *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818)

PHYLUM ARTHROPODA

SUBPHYLUM CRUSTACEA

CLASSE MALACOSTRACA

ORDEM DECAPODA

SUBORDEM PLEOCYEMATA

INFRAORDEM BRACHYURA

FAMÍLIA PORTUNIDAE

Popularmente conhecido como siri-chita, *Arenaeus cribrarius* distribuiu-se de Massachusetts nos EUA até La Paloma no Uruguai (Juanicó 1978), sendo um animal que suporta temperaturas entre 11 e 30,8°C (Anderson *et al.* 1977). As maiores abundâncias desta espécie são encontradas em regiões com frações arenosas mais finas (Pinheiro *et al.* 1997).

O maior comprimento registrado para a espécie foi de 153 mm para um indivíduo macho (Camp *et al.* 1977). Para a população de *A. cribrarius* da Barra da Lagoa (SC), Ávila e Branco (1996) demonstraram que a espécie atinge a maturação sexual quando a carapaça tem de 75 a 80 mm de largura. Em diferentes regiões geográficas, os indivíduos desta espécie podem apresentar diferentes tamanhos de primeira maturação, visto que existe uma relação inversa entre a latitude e o tamanho de primeira maturação (Hines 1989). De acordo com Pinheiro e Terceiro (2000), os períodos reprodutivos da espécie são sincronizados com a elevação da temperatura e conseqüente disponibilidade de alimento. Com relação ao ciclo reprodutivo, todo o período,

desde a corte até a eclosão dos ovos, dura em torno de dois meses (Pinheiro & Fransozo 1999).

Embora um estudo detalhado sobre o hábito alimentar de *A. cribrarius* nas praias arenosas do Rio Grande do Sul não tenha sido realizado, sabe-se que em outras regiões a espécie preda sobre indivíduos do gênero *Emerita* e *Donax* (Leber 1982), sugerindo que a dieta dos organismos na região sul do Rio Grande do Sul deve ser constituída principalmente por tatuíras e moluscos bivalves.

Embora no Rio Grande do Sul o siri-chita não tenha ainda despertado um grande interesse comercial, Fransozo *et al.* (1992) aponta esta espécie como potencial para atividades pesqueiras no litoral norte do estado de São Paulo.

#### **2.3.1.4. Pampo-malhado *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832**

PHYLUM CHORDATA

SUBFILUM GNASTHOTOMATA

SUPERCLASSE PISCES

CLASSE OSTEICHTHYES

FAMÍLIA CARANGIDAE

Segundo Menezes e Figueiredo (1980), os peixes da família Carangidae preferem águas tropicais de superfície, junto à costa. São predadores e muitas das espécies formam cardumes, sendo que algumas apresentam grande importância econômica.

Popularmente conhecido como pampo ou pampo-malhado, espécimes de *Trachinotus marginatus* podem atingir até 630 mm de comprimento (Menezes & Figueiredo 1980). Sua distribuição vai desde o Rio de Janeiro no Brasil até a Argentina, sendo endêmico da província zoogeográfica marinha Argentina (Cervignon & Fischer 1979, Figueiredo 1981).

Cunha (1987) apontou esta espécie como o peixe mais abundante da zona de arrebentação da Praia do Cassino, em sua fase juvenil. A abundância de juvenis de *T. marginatus* é influenciada especialmente pela temperatura, seguida pela salinidade. A maior abundância ocorre quando a temperatura da água ultrapassa 20°C e salinidade 25. Lana (2005) também verificou alta frequência de ocorrência e abundância desta espécie em amostragens com curtos intervalos de tempo, com a maior abundância de juvenis das classes de comprimento entre 20 e 70 mm.

A captura em grande quantidade de juvenis com classes de comprimento de 15 a 40 mm durante os meses de verão e outono sugere que a desova ocorra fundamentalmente do final da primavera até o início do outono (Cunha 1987). Sendo assim, o recrutamento da espécie ocorre no verão e/ou outono, período em que chegam à região a primeira leva de juvenis com os menores tamanhos (Cunha 1987). O recrutamento da espécie parece ser influenciado pela passagem da Corrente do Brasil na região, durante o verão e o outono, período onde também se observa a predominância de ventos do quadrante nordeste e da corrente litorânea no sentido nordeste-sudoeste, que tem papel relevante no transporte de larvas e pequenos juvenis em direção à costa (Cunha 1987). Indivíduos de *T. marginatus* ocorrem durante todo o ano, sendo mais abundantes no verão e no outono. Na primavera, organismos maiores podem ser coletados em águas mais profundas (Cunha 1987).

A principal área de recrutamento da espécie é a faixa praiana do Rio Grande do Sul. Por ser um oportunista e tolerar grandes variações de salinidade, ocasionalmente espécimes podem ser coletados no interior do estuário da Lagoa dos Patos (Chao *et al.* 1982).

Cunha (1987) sugeriu que pelo menos parte da população migre em direção ao norte, a partir de abril, quando a temperatura da água começa a diminuir sensivelmente no litoral sul do estado, decorrente da passagem da corrente das Malvinas. Indivíduos maiores, entretanto, parecem permanecer nas praias locais (Cunha 1987). Há evidências de que a espécie não complete todo o seu ciclo de vida na costa do Rio Grande do Sul, visto que espécimes adultos são raramente coletados na região (Haimovici & Habiaga 1982). Desta

forma, sugere-se que organismos com tamanho de interesse comercial concentram-se em Santa Catarina e regiões ao norte. Ademais, Busoli e Muelbert (1999) não encontraram ovos de *T. marginatus* durante um estudo sobre a composição do ictioplâncton na zona de arrebentação da Praia de Cassino. No mesmo estudo, larvas de Carangidae foram encontradas em baixa abundância, mas a espécie ou gênero não foram identificados. Em estudo realizado nas regiões de plataforma e oceânica dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Franco e Muelbert (2003) observaram a maior abundância de larvas de Carangidae nas estações mais setentrionais, sugerindo novamente que os espécimes adultos concentram-se em latitudes mais baixas.

Com relação aos hábitos alimentares da espécie, a dieta varia em função do tamanho do organismo e do alimento disponível no local. Segundo Monteiro-Neto (1983), os pampos alimentam-se, durante os primeiros estágios da vida juvenil, de misídeos, copépodes, anfípodes e recrutas de *Emerita brasiliensis*, e à medida que crescem, sua dieta passa a consistir basicamente de crustáceos (*Emerita spp.*), moluscos (*M. mactroides*), e pequenos peixes, como juvenis de tainha (*Mugil spp.*). Também podem se alimentar de insetos e poliquetas (Monteiro-Neto & Cunha 1990). Em observações qualitativas do conteúdo estomacal de juvenis, Gianuca (1983, 1985) observou a presença de juvenis dos bivalves *M. mactroides* e *D. hanleyanus*, bem como dos crustáceos *E. brasiliensis*, *A. cribrarius*, *Artemesia longinaris* e *Excirrolana armata*.

Os juvenis de *T. marginatus* são oportunistas em todas as classes de tamanho e alimentam-se primariamente sobre o fundo ou de organismos que

são revolvidos com a ação de ondas. Com relação às tendências sazonais, a disponibilidade dos itens alimentares desempenha um papel mais importante que a seleção (Monteiro- Neto & Cunha 1990).

A distribuição sazonal e espacial de *T. marginatus* está relacionada com a disponibilidade de alimento, de modo que seus picos de abundância no verão correspondem aos picos de biomassa dos principais itens alimentares da espécie (Cunha 1981, Gianuca 1983, 1985, 1987). Devido à sua adaptação às freqüentes mudanças de salinidade na zona de arrebentação, os pampos podem utilizar o estuário facultativamente, adotando a estratégia de organismos marinhos estuarino oportunistas (Vieira *et al.* 1998) e alimentando-se do gastrópode *Littoridina sp.* (Monteiro-Neto 1983).

Em função do texto apresentado acima, que demonstra a importância da zona de arrebentação para os pampos e vice-versa, bem como da boa resistência e adaptabilidade da espécie ao cativeiro (Furia 2005), faz-se importante o uso da espécie em testes ecotoxicológicos, uma vez que alterações no ambiente poderiam causar impactos negativos significantes sobre suas populações, que por sua vez afetaria, direta ou indiretamente, toda a comunidade da zona de arrebentação.

#### 2.4. Coleta e aclimação dos organismos

Os exemplares das espécies de misídeo e de peixe utilizados para os testes de sensibilidade e determinação dos padrões de acumulação tecidual de cobre, foram coletados na zona de arrebentação interna da Praia do Cassino, entre a Estação Marinha de Aqüicultura da FURG (EMA) e o navio encalhado. Por sua vez, os mariscos e siris foram coletados nas zonas intermareal e de arrebentação interna do balneário da praia do Mar Grosso, em função de suas maiores abundâncias naquela praia. Os indivíduos destinados aos testes de bioacumulação *in situ* foram coletados em diferentes pontos destas duas praias, conforme descrito no item 2.2.

Para a coleta de *M. elongata atlantica*, foi utilizada uma rede cilindro-cônica de 1,5 m de comprimento por 0,48 m de diâmetro de boca e malha de 300 µm. A coleta foi realizada em arrastos paralelos à linha da costa, contra a corrente, na profundidade média de 1 m.

Os exemplares de *M. mactroides* foram coletados manualmente, na zona de varrido da praia, com o auxílio de uma pá, ou eventualmente na zona infralitoral, especialmente nos meses de inverno.

Para a coleta de siris (*A. cribrarius*) e pampos (*T. marginatus*), redes de pesca com malha de 5 mm entrenós foram arrastadas paralelamente e perpendicularmente à linha de costa, na profundidade média de 1 m.

Após a coleta, o material biológico foi mantido em baldes plásticos com água do próprio local sob constante aeração e transportados ao Laboratório de Zoofisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da FURG, exceto durante os

testes de monitoramento ambiental, quando os indivíduos foram processados na própria estação de coleta.

Durante a fase de aclimação e experimentação, todos os indivíduos utilizados de todas as espécies foram mantidos em água de salinidade 30 e sob regime constante de fotoperíodo (12C:12E) e temperatura (20°C). O período de aclimação foi sempre superior a quatro dias para misídeos, e a sete dias para as demais espécies.

Uma vez que a rede de zooplâncton coleta outras espécies além da desejada, as amostras foram triadas a olho nu e com auxílio de microscópio estereoscópico para a identificação de *M. elongata atlantica*. Os indivíduos identificados foram coletados e mantidos em aquário de vidro com capacidade para 50 L, equipado com filtro biológico. Os misídeos foram alimentados diariamente com náuplios de *Artemia spp.* (< 48 h de eclosão), durante o período de aclimação.

Com relação aos mariscos (*M. mactroides*), os exemplares foram transferidos para monoblocos plásticos (cerca de 100 juvenis por monobloco) contendo no fundo areia do próprio local de coleta e cerca de 24 L de água na salinidade 30, e constante aeração. Durante o período de aclimação, parte da água foi renovada a cada dois dias e os organismos receberam 200 mL de cultivo da diatomácea *Thalassiosira weissflogii* como alimento.

Os siris (*A. cribrarius*) e os peixes (*T. marginatus*) foram acondicionados em tanques de fibra de vidro, equipados com filtro biológico, com cerca de 300 L de água na salinidade 30, e constante aeração. Para a aclimação de siris, areia da praia foi adicionada ao fundo do tanque, e pedaços de peixes foram

fornecidos como alimento, a cada dois dias. Os peixes foram alimentados com ração comercial, também a cada dois dias.

Após o período de aclimação, os organismos foram expostos aos testes toxicológicos para a determinação da concentração letal para 50% da população testada ( $CL_{50}$ ) e do nível de acumulação do metal nos tecidos, após exposição às suas respectivas  $CL_{50}$  de cobre previamente determinadas ( $AL_{50}$  - acumulação letal para 50% da população testada).

## **2.5. Determinação da $CL_{50}$**

Durante os testes de toxicidade aguda do cobre para determinação da  $CL_{50}$ , os indivíduos não foram alimentados. Por esta razão, os testes com misídeos foram limitados a 24 h, uma vez que os organismos ficam debilitados quando não são alimentados continuamente (Lussier *et al.* 1988, Domingues *et al.* 1998). Para as demais espécies, os testes tiveram duração de 96 h. Como no período de aclimação, os testes foram realizados com água na salinidade 30 e fotoperíodo (12C:12E) e temperatura (20°C) constantes.

Diferentes concentrações nominais de cobre, obtidas a partir de uma solução estoque preparada com cloreto de cobre ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , Vetec Química Fina, RJ) e água MilliQ (Millipore), foram aplicadas para contaminação dos meios experimentais, de acordo com valores já registrados na literatura para a espécie ou grupo semelhante. Para cada ensaio realizado, um grupo controle (sem adição de cobre) foi mantido nas mesmas condições dos grupos expostos. Independente da espécie testada, o meio experimental era sempre

preparado três horas antes da introdução dos animais, para o adequado equilíbrio do cobre com o meio experimental. Segue abaixo a metodologia empregada para cada espécie:

**Bivalves:** Os juvenis de mariscos (comprimento da concha < 43 mm; Masello e Defeo 1986) foram acondicionados individualmente em béqueres contendo 200 mL do meio experimental, sendo que cada tratamento contou com nove réplicas (n = 9). A faixa de concentração nominal de cobre testada foi de 0,3 a 1,5 mg Cu/L. O experimento teve duração de 96 h, sendo que a cada 24 h, o meio experimental foi renovado, a mortalidade registrada e os indivíduos mortos foram coletados e descartados.

**Misídeos:** Espécimes adultos foram individualmente colocados em frascos de vidro contendo 50 mL do meio experimental (n = 10 por tratamento) e mantidos em incubadora tipo D.B.O. durante 24 h. Após exposição (24 h), a mortalidade foi registrada. A faixa de concentração nominal de cobre testada variou entre 0,02 e 0,32 mg Cu/L.

**Siris:** Cinco siris juvenis (< 75 mm; Avila & Branco 1996) foram introduzidos em cada aquário de vidro preenchido com 3 L de meio experimental sob constante aeração. Para cada tratamento, os siris foram expostos a concentrações nominais de cobre variando entre 0,5 e 4 mg Cu/L. Assim como para mariscos, o teste teve duração de 96 h, com renovação do meio e registro de mortalidade a cada 24 h. Os testes foram realizados em duplicata.

**Peixes:** Em cada aquário redondo de vidro contendo 2 L do meio experimental, foram colocados cinco indivíduos juvenis. O meio experimental foi mantido sob constante aeração. Cada teste foi realizado em duplicata. Os

meios experimentais foram contaminados com concentrações nominais de cobre variando entre 0,3 e 1,5 mg Cu/L. O teste também teve duração de 96 h, com renovação total dos meios experimentais e registro de mortalidade a cada 24 h.

Antes do início de cada experimento, os animais foram medidos (bivalves), pesados (peixes) ou pesados e medidos (siris).

Antes da introdução dos animais nos meios experimentais, e após 24 h de teste, uma alíquota do meio experimental foi coletada para a determinação das concentrações de cobre total e dissolvido ( $< 0,45 \mu\text{m}$ ), bem como para análise dos demais parâmetros necessários para se calcular a especiação do cobre a partir de modelagem geoquímica (alcalinidade, pH, salinidade, temperatura e concentrações de carbono orgânico dissolvido,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

As concentrações dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  foram determinadas através de fotometria de chama (MicroNal, Campo Grande MS, Brasil). A concentração de  $\text{Mg}^{2+}$  foi determinada por colorimetria utilizando-se um kit de reagentes (DOLES, Goiânia, GO, Brasil), sendo que as medidas foram realizadas em leitora de Microplacas (Bio-Tek ELX-800, Vermont, EUA) a 490 nm. A concentração de íons cloreto foi determinada por método titrimétrico utilizando-se um cloridrômetro (JENWAY PLM3, Inglaterra). O sulfato foi analisado utilizando-se o método turbidimétrico proposto por Tabatabai (1974).

Além das medidas descritas acima, o pH da água (Digimed DM20, São Paulo, SP, Brasil), a temperatura, a alcalinidade (APHA, 1989) e a concentração de carbono orgânico dissolvido ( $< 0,45 \mu\text{m}$ ; Shimadzu ASI-V) também foram determinados.

## **2.6. Determinação da AL<sub>50</sub>**

Segundo dados da literatura, os testes de acumulação de cobre em tecidos de organismos aquáticos visando determinar a concentração de cobre acumulada no órgão alvo do metal que induz mortalidade de 50% dos indivíduos testados (AL<sub>50</sub>) geralmente apresentam duração de três horas, pois se acreditava que este tempo seria suficiente para que os sítios no ligante biótico dos animais aquáticos fossem ocupados e a toxicidade fosse observada. No entanto, estudos vêm demonstrando que muitos organismos necessitam de mais tempo para que seus sítios de ligação do metal sejam totalmente ocupados (Morgan *et al.* 1997, Bury *et al.* 1999, Wood *et al.* 1999). No presente estudo, a concentração tecidual de cobre acumulado após 3 h de exposição a diferentes concentrações do metal foi determinada para peixes e mariscos.

Os testes com misídeos foram realizados em função do tempo (até 24 h), porém apenas foram testadas a CL<sub>50</sub> e uma concentração equivalente a 50% do valor de CL<sub>50</sub>, na qual espera-se que não seja observado um efeito significativo (USEPA 2003). Novos exemplares de moluscos e peixes também foram submetidos a este novo tipo de teste, de modo que a acumulação em diferentes tecidos foi observada em função do tempo em animais expostos à CL<sub>50</sub> e a 50% da CL<sub>50</sub>. Para os testes realizados com siris, o grau de acumulação foi determinado após 96 h de experimentação, em três concentrações de cobre.

Tanto para os testes de acumulação em função da concentração de cobre (3 h para peixes e mariscos e 96 horas para siris), quanto para os testes de acumulação em função do tempo (mariscos, misídeos e peixes), os animais foram expostos ao metal, crioanestesiados e tiveram suas brânquias dissecadas, exceto para os misídeos, os quais foram agrupados (N=6) em pools de 10 indivíduos e foram analisados inteiros. As amostras obtidas foram utilizadas para determinação da concentração de cobre que se liga ao sítio de toxicidade do metal no animal. Além disso, o órgão relacionado ao armazenamento e detoxificação de metais foi extraído nas diferentes espécies estudadas, a saber: glândula digestiva (mariscos), hepatopâncreas (siris) e fígado (peixes). E ainda, a hemolinfa (mariscos e siris) e o sangue (peixes) foi coletado, antes de o animal ser crioanestesiado. Com exceção dos misídeos, seis indivíduos de cada espécie foram submetidos a cada tratamento experimental.

Após extração dos tecidos, estes foram secos em estufa (~50°C) durante 48 h. O peso seco de cada tecido foi então determinado em balança analítica de precisão (0,01 mg; Kern 410) e as amostras secas foram digeridas em ácido nítrico (Merck Suprapure<sup>®</sup>, EUA), à temperatura ambiente por 48 h. As amostras digeridas foram então diluídas em água deionizada e a determinação da concentração de cobre foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica de chama, utilizando uma combinação de ar sintético e acetileno como combustível, com lâmpada de cátodo oco em sensibilidade ajustada ao comprimento de onda de 324,7 nm (GBC AAS 932 Plus; limite de detecção: 10 µg/L). As amostras foram determinadas contra uma curva padrão certificada,

sendo que diferentes concentrações das soluções padrões foram preparadas a partir de uma solução estoque de referência de 1 g/L (CELM; São Paulo, Brasil), calibrada a partir de padrão certificado internacional (NIST, EUA). Uma vez que o volume de ácido utilizado para a análise dos tecidos foi diferente para cada espécie ou tecido analisado, os padrões foram preparados respeitando as proporções ácidas de cada tratamento. A concentração tecidual do metal foi expressa em  $\mu\text{g/g}$  de peso seco.

## 2.7. Bioacumulação de cobre *in situ*

Para a determinação da acumulação de cobre nos animais em seu ambiente natural, o procedimento adotado para cada ponto amostral, em cada estação do ano, é descrito a seguir.

Foram coletados seis exemplares de cada espécie estudada, com exceção dos misídeos, que foram agrupados em pools (N=6) de 10 organismos, de forma que 60 organismos foram coletados em cada ponto amostral. Após a coleta, os animais eram mantidos em água do próprio local constantemente aerada. Os animais foram então processados, no local de coleta. Os misídeos foram triados a olho nu, e quando necessário, uma lupa foi utilizada. Dez organismos foram introduzidos em cada um dos seis tubos plásticos previamente pesados e identificados.

Para as outras espécies, amostras de diferentes tecidos foram obtidas, conforme descrito abaixo.

Marisco *M. mactroides*: A biometria do indivíduo foi determinada com paquímetro (comprimento total, largura e altura) e a hemolinfa foi coletada por punção no músculo adutor com auxílio de uma seringa de insulina (1 mL), e acondicionada em tubo tipo Eppendorf previamente pesado e identificado. O animal foi então crioanestesiado, uma das conchas foi removida e as brânquias e a glândula digestiva foram dissecadas. Antes de serem acondicionadas em seus respectivos tubos, as brânquias foram lavadas rapidamente com água destilada e secas em papel filtro. Todas as amostras foram mantidas sob gelo

até a chegada no laboratório, quando foram então conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

*Siris A. cribrarius*: a largura total (distância de um espinho ao outro) foi determinada com auxílio de paquímetro e os animais foram pesados em balança de precisão portátil (0,1 mg; Ohaus). Em seguida, a hemolinfa foi coletada por punção no 4º ou 5º par de pereópodos, como descrito para os mariscos. O animal foi então crioanestesiado, sua carapaça foi removida e as brânquias dissecadas e separadas em anteriores e posteriores. Antes de serem acondicionadas em tubos plásticos previamente pesados e identificados, as brânquias foram rapidamente lavadas em água destilada. Após dissecação das brânquias, o hepatopâncreas foi coletado e acondicionado em tubos plásticos previamente pesados e identificados. As amostras foram conservadas em gelo até a chegada no laboratório, onde foram então transferidas para um freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Pampo-malhado *T. marginatus*: o comprimento total foi determinado com paquímetro e os animais foram pesados em balança de precisão portátil (0,1 mg; Ohaus). Em seguida, o sangue foi coletado por punção no músculo do pedúnculo caudal com auxílio de uma seringa de insulina (1 mL) previamente heparinizada, para evitar a coagulação do sangue. O animal foi crioanestesiado e teve sua medula espinhal seccionada, antes da dissecação dos tecidos. Como para os mariscos e siris, as brânquias foram dissecadas e rapidamente enxaguadas em água destilada antes de serem acondicionadas em seus respectivos tubos. O fígado foi então coletado e as amostras acondicionadas e conservadas da mesma maneira como descrito para as demais espécies.

Em laboratório, o peso úmido dos tecidos foi determinado e as amostras foram submetidos à secagem em estufa a 50°C, por aproximadamente 48 h. Após este período, o peso seco foi determinado em balança analítica (0,01 mg; Kern 410) e as amostras secas foram digeridas em ácido nítrico 65% (Merck SupraPure<sup>®</sup>, EUA) por 48 h à temperatura ambiente. As amostras digeridas foram então diluídas em água MilliQ e a concentração de cobre foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica de chama (324,7 nm; GBC AAS 932 Plus), conforme descrito anteriormente.

A temperatura, a salinidade e o pH estão entre os fatores abióticos que exercem maior influência na bioacumulação de metais (Förstner & Whittmann 1979). As variações de pH encontradas na região costeira são geralmente pequenas, de modo que não são suficientes para alterar a especiação do cobre e conseqüentemente o nível de acumulação deste metal nos organismos. No entanto, a temperatura e a salinidade variam bastante na região costeira, especialmente em função da estação do ano. Portanto, estes parâmetros foram registrados em cada coleta. Além disso, amostras de água de cada estação de coleta foram obtidas e acidificadas (HNO<sub>3</sub> 1%) para posterior determinação da concentração de cobre total (amostras não filtradas) e dissolvido (amostras filtradas em 0,45 µm). A determinação da concentração de cobre foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica de chama e utilizando-se padrões preparados conforme descrito anteriormente, porém usando água da mesma salinidade, isenta de cobre, para correção do efeito matriz.

## **2.8. Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD)**

Muitos testes toxicológicos para a determinação da toxicidade aguda do cobre em organismos marinhos vêm sendo desenvolvidos e os resultados de muitos deles foram utilizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para estabelecer critérios de qualidade de água (WQC) para ambientes costeiros (USEPA 2003). Dados compilados neste documento, bem como outros dados disponíveis na literatura, foram utilizados em conjunto com os resultados do presente estudo para construir uma curva de distribuição de sensibilidade de espécies ao cobre, a qual foi obtida a partir do logaritmo natural dos valores de toxicidade aguda e suas respectivas probabilidades.

Todos os dados utilizados para a obtenção da SSD foram derivados de trabalhos conduzidos em salinidade entre 25 e 35 e temperatura entre 15°C e 25°C, que são condições recorrentes no ambiente em estudo.

## **2.9. Cinética de acumulação de cobre**

A cinética de acumulação do cobre nos tecidos biológicos analisados foi avaliada em função do tempo ou de diferentes concentrações de exposição. Estimativas de regressão linear e não linear foram aplicadas aos dados de acumulação de cobre para se determinar o tipo de cinética que o metal apresenta em cada tecido e espécie analisada. Esta análise foi realizada utilizando-se o software SigmaPlot versão 6.0.

## **2.10. Tratamento estatístico dos Dados**

Os dados de mortalidade acumulada foram usados para o cálculo da toxicidade aguda do cobre ( $CL_{50}$ ) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, através da análise dos Probitos (Finney 1971; EPA Probit Analysis Program version 1.5). Os valores de  $CL_{50}$  foram calculados com base nas diferentes espécies de cobre e comparados através dos respectivos intervalos de confiança de 95% (APHA 1976).

Para se determinar a  $CL_{50}$  baseada nas concentrações de cobre livre e na atividade deste íon, a especiação do metal foi calculada a partir do modelo de equilíbrio químico Visual MINTEQ, desenvolvido por Jon Petter Gustafsson, divulgado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA em 1999 e atualizado em 24/10/2007. Este modelo foi desenvolvido para o cálculo de especiação de metal, e muitos outros parâmetros, em águas naturais.

Para a comparação dos dados de acumulação de cobre, primeiramente foi realizada uma análise de correlação de Pearson, para identificar a possível influência da biometria dos animais sobre a acumulação deste metal. Em caso de existência de correlação, foi realizada uma Análise de Co-variância (ANCOVA), considerando-se o tamanho como uma co-variável. Para os testes de acumulação *in situ* foi aplicada a ANOVA fatorial, visando comparar os diferentes pontos amostrais e estações do ano. Em todos os casos, o teste a *posteriori* de Tukey foi adotado para comparar os diferentes tratamentos ( $\alpha < 0,05$ ). Todos os dados de acumulação foram tratados estatisticamente utilizando-se o software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinação da CL<sub>50</sub>

Os valores dos parâmetros químicos da água utilizada para os testes de determinação da toxicidade aguda do cobre são apresentados na Tabela 3.1.1.

**Tabela 3.1.1.** Parâmetros químicos da água utilizada nos testes toxicológicos.

Parâmetro Testado	Média ± DP
Na <sup>+</sup> (mg/L)	10626 ± 104,2
Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	266,29 ± 30,25
K <sup>+</sup> (mg/L)	294,45 ± 33,93
Cl <sup>-</sup> (mg/L)	16744,43 ± 2652,04
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	737,5 ± 8,9
Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	630,03 ± 189,78
Alcalinidade (mgCaCO <sub>3</sub> )	161,05 ± 33,15
pH	7,53 ± 0,22
C.O.D. (mg/L)	0,7

C.O.D. – carbono orgânico dissolvido

Os resultados dos testes de toxicidade aguda do cobre nas diferentes espécies testadas são apresentados na Tabela 3.1.2. Os valores são apresentados com base nas diferentes frações de cobre analisadas, sendo que as concentrações de cobre total e dissolvido foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, enquanto a de cobre livre e a atividade do íon cúprico calculadas com auxílio do pacote computacional Visual MINTEQ, utilizando-se os parâmetros físico-químicos da água apresentados na Tabela 3.1.1.

**Tabela 3.1.2.** Toxicidade aguda do cobre (CL<sub>50</sub> – 24 h para misídeos; CL<sub>50</sub>-96 h para peixes, siris e mariscos) baseada nas diferentes frações de cobre (mg/L), para as diferentes espécies estudadas. Valores entre parênteses indicam o Intervalo de Confiança (95%). A especiação do cobre foi realizada utilizando-se o modelo geoquímico Visual MINTEQ.

CL <sub>50</sub> (mg/L)	<i>M. elongata atlantica</i>	<i>Trachinotus marginatus</i>	<i>Mesodesma mactroides</i>	<i>Arenaeus cribrarius</i>
Total medido	0,112 (0,053 – 0,151) <sup>a A</sup>	0,527 (0,477 - 0,574) <sup>b B</sup>	0,576 (0,454 – 0,661) <sup>a BC</sup>	0,843 (0,621 – 1,206) <sup>a C</sup>
Dissolvido	0,090 (0,048 – 0,118) <sup>a A</sup>	0,449 (0,407 – 0,489) <sup>b B</sup>	0,505 (0,380 – 0,588) <sup>a BC</sup>	0,687 (0,503 – 0,975) <sup>a C</sup>
Íon cúprico livre	0,014 (0,008 – 0,020) <sup>b A</sup>	0,075 (0,067 – 0,082) <sup>c B</sup>	0,097 (0,071 – 0,114) <sup>b BC</sup>	0,133 (0,096 – 0,191) <sup>b C</sup>
Atividade do cobre	0,003 (0,002 – 0,004) <sup>c A</sup>	0,016 (0,014 – 0,017) <sup>d B</sup>	0,021 (0,015 – 0,024) <sup>c BC</sup>	0,029 (0,021 – 0,041) <sup>c C</sup>

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as frações de cobre, para a mesma espécie animal testada. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as espécies animais testadas, para cada fração de cobre analisada.

Os resultados obtidos com base na especiação com software Visual MINTEQ mostram que os valores de CL<sub>50</sub> calculados com base nas concentrações do íon cúprico são cerca de cinco vezes menores que as concentrações do cobre dissolvido para todas as espécies animais testadas. Com relação a atividade do íon cúprico, 20% do total de íons cúpricos livres foi responsável pela toxicidade observada (Tab. 3.1.2).

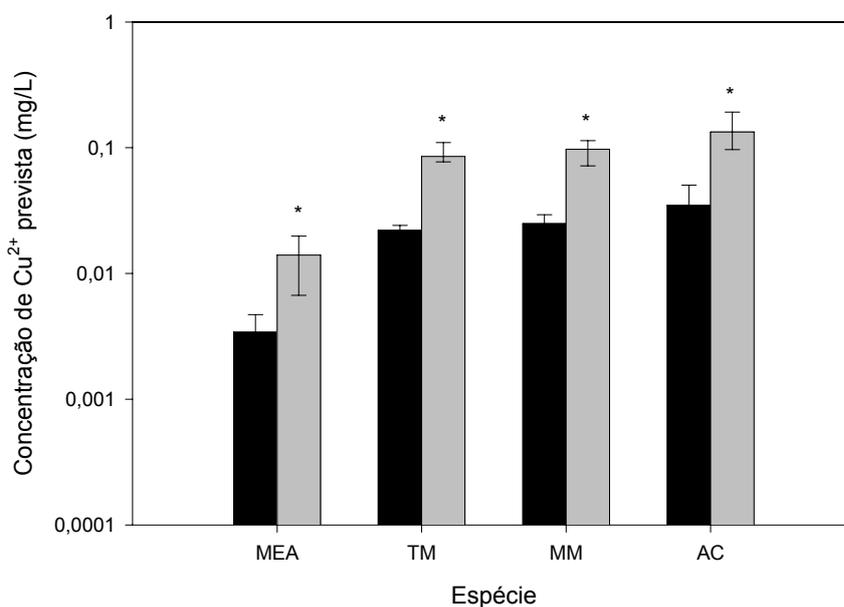
Quando comparados com os dados relatados na literatura para a toxicidade aguda do cobre em outras espécies de animais aquáticos (Tabela 3.1.3), os resultados do presente estudo mostraram que *M. elongata atlantica* é mais sensível que outras espécies de misídeos, como *Mysidopsis bahia* (Lussier *et al.* 1985, Cripe 1994), mas apresenta sensibilidade menor que o misídeo *Praunus flexuosus* (Garnacho *et al.* 2000).

Em relação às outras espécies testadas no presente estudo (Tab. 3.1.2), estas se apresentaram bastante tolerantes à exposição ao cobre. Os juvenis do pampo-malhado *T. marginatus* mostraram-se mais sensíveis que juvenis do siri-chita *A. cribrarius*. No entanto, não foram verificadas diferenças entre os juvenis de marisco branco *M. mactroides* e os juvenis do pampo-malhado e do siri-chita (Tab. 3.1.2).

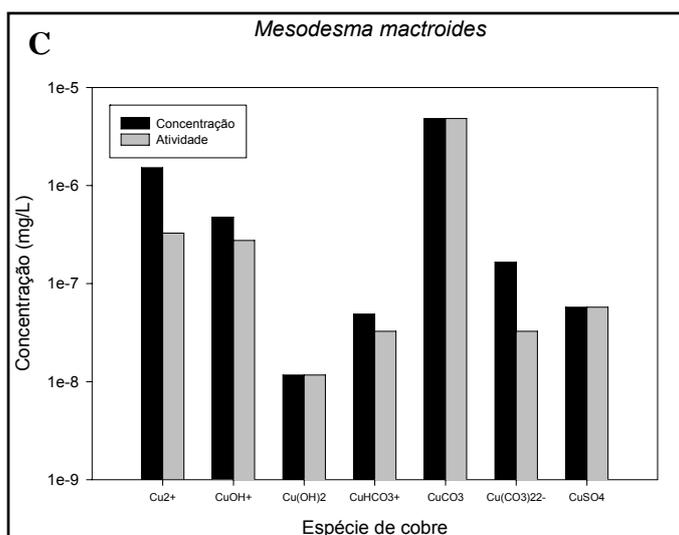
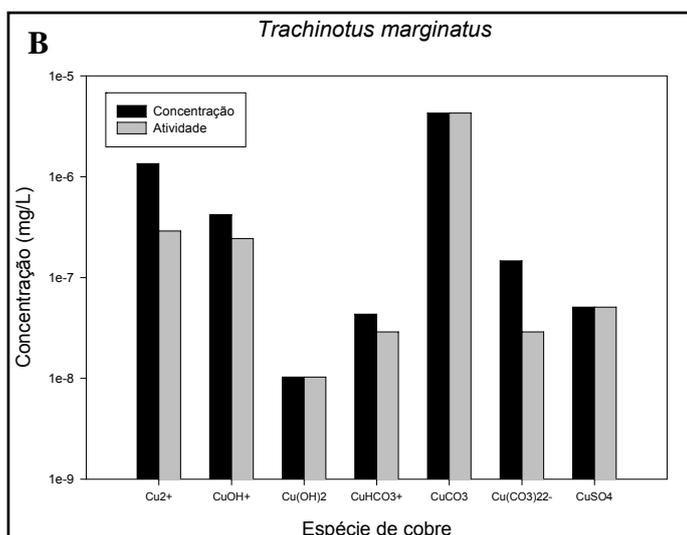
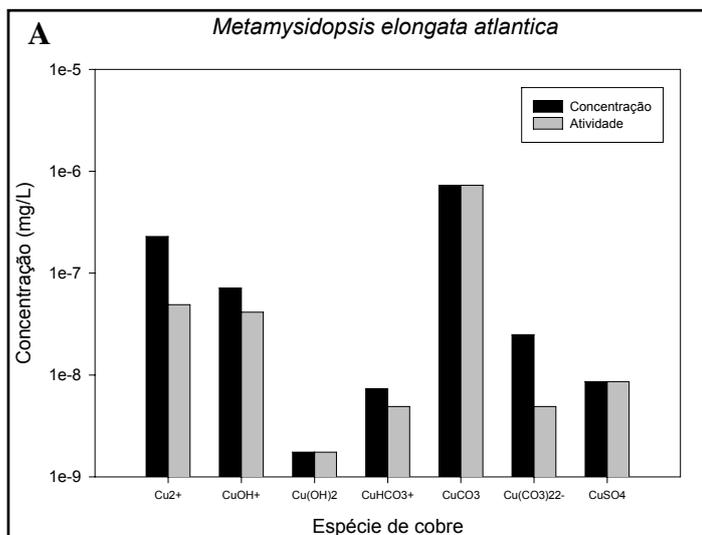
Para se verificar a validade da aplicação do BLM em águas marinhas, os valores de  $CL_{50}$  baseados nas concentrações de íon cúprico livre foram obtidos a partir da especiação da concentração de cobre dissolvido para cada espécie animal testada, utilizando-se os modelos BLM e Visual MINTEQ, e os resultados indicaram que o BLM superestima a toxicidade aguda do cobre para qualquer das espécies animais testadas, conforme demonstrado na Figura 3.1.1.

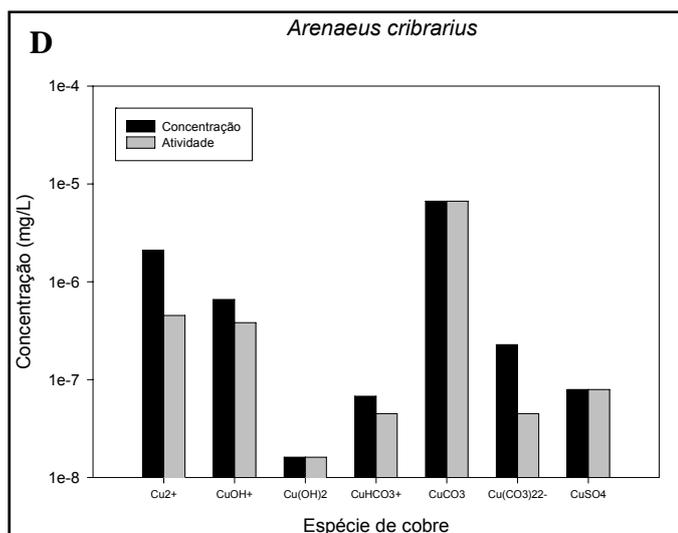
As concentrações das espécies de cobre formadas a partir da química da água utilizada nos experimentos com as diferentes espécies animais testadas são apresentadas na Figura 3.1.2. Como pode ser observado, em valores de pH próximos de 8, a maior parte das espécies de cobre são carbonatadas (Libes 1992). Além disso, as duas espécies consideradas mais tóxicas ( $Cu^{2+}$  e  $CuOH^+$ ; Paquin *et al.* 2002) apresentam-se em elevadas concentrações na água do mar (Fig. 3.1.2).

Para todos os valores de  $CL_{50}$  testados, a proporção de cada espécie de cobre manteve-se relativamente constante, visto que a química da água para todos eles foi exatamente a mesma, variando-se apenas a concentração de cobre dissolvido.



**Figura 3.1.1.** Valores de  $CL_{50}$  calculados com base nas concentrações de íon cúprico livre obtidas a partir da especiação de cobre dissolvido ( $CL_{50}$ ) utilizando-se dois modelos de especiação do cobre: BLM (barras pretas) e Visual MINTEQ (barras cinzas). Os valores dos parâmetros físico-químicos da água foram os mesmos para os dois modelos (Tabela 3.1.1). MEA – *Metamysidopsis elongata atlantica*; TM – *Trachinotus marginatus*; MM – *Mesodesma mactroides*; AC – *Arenaeus cribrarius*. \*indica diferença significativa entre os valores de  $CL_{50}$  calculados usando-se os dois modelos geoquímicos, para cada espécie estudada. A comparação foi feita utilizando-se os intervalos de confiança de 95%.





**Figura 3.1.2.** Principais espécies de cobre presentes na água quando a concentração letal de cobre dissolvido para 50% dos indivíduos testados foi adicionada ao meio experimental. (A) *Metamysidopsis elongata atlantica*; (B) *Trachinotus marginatus*; (C) *Mesodesma mactroides*; (D) *Arenaeus cribrarius*.

### **3.1.1. Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD)**

A Figura 3.1.3 apresenta uma curva de distribuição da sensibilidade das espécies, a partir da qual é possível determinar uma concentração máxima permitida para a emissão de contaminantes específicos. Os dados utilizados para a construção desta curva são apresentados na Tabela 3.1.3, e engloba os dados gerados no presente estudo, dados gerados em estudos prévios em nosso laboratório, bem como outros relatados na literatura.

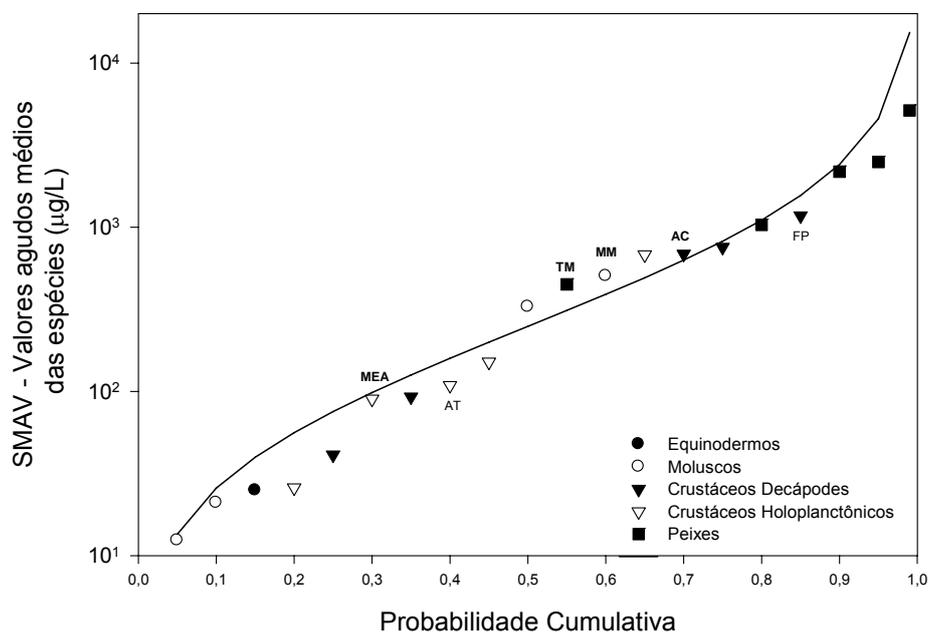
Para a determinação de uma concentração limite de emissão no ambiente, deve-se fazer uma média geométrica de todas as espécies (ou gêneros) que se encontram abaixo do nível de 5% de probabilidade na curva. O resultado deste valor é denominado Valor Agudo Final (FAV) e aponta a toxicidade do cobre ( $CL_{50}$ ) para as populações mais sensíveis. A FAV é então dividida por dois, visto que geralmente 50% da  $CL_{50}$  correspondem a uma concentração onde efeitos adversos não são observados (NOEC) (USEPA 2003). Obtém-se, então, a Concentração Máxima do Critério (CMC), ou seja, o limite permitido de emissão do contaminante considerado.

Para que se obtenha uma curva de distribuição de sensibilidade das espécies, a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) recomenda o uso de pelo menos oito espécies (USEPA 2003). Por essa razão, o gráfico apresentado na Figura 3.1.3 foi baseado em outras espécies, além daquelas encontradas na zona de arrebentação e intermareal das praias do sul do Brasil (Tab. 3.1.3).

**Tabela 3.1.3.** Valores agudos médios das espécies (SMAV) marinhas utilizadas na curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD; Fig. 3.1.3)\*

Classificação	Espécie	Estágio de vida	Salinidade	Temperatura (°C)	Duração do teste (h)	SMAV (µg/L)	Reference
1	<i>Mytilus spp.</i>	embrião	30	NI	NI	12,4	SAIC 1993
2	<i>Mercenaria mercenaria</i>	larva	27,5	24	96	21	LaBreche <i>et al.</i> 2002
3	<i>Diadema antillarum</i>	adulto	33	20	96	25	Bielmyer <i>et al.</i> 2005
4	<i>Praunus flexuosus</i>	juv/adulto	33	20	96	25,9	Garnacho <i>et al.</i> 2000
5	<i>Cancer magister</i>	zoea I	33	15	96	41,1	Martin <i>et al.</i> 1981
6	<i>Metamysidopsis elongata atlantica</i>	adulto	30	20	24	90	Presente estudo
7	<i>Neohelice granulata</i>	zoea I	30	16	96	92,7	Greco <i>et al.</i> 2001
8	<i>Acartia tonsa</i>	adulto	30	20	48	109	Rodrigues 2007
9	<i>Mysidopsis bahia</i>	< 24 h	25	25	96	151,3	Cripe 1994; Lussier <i>et al.</i> 1985
10	<i>Nassarius festivus</i>	11-16 mm	30	20	96	327,2	Cheung <i>et al.</i> 2002
11	<i>Trachinotus marginatus</i>	juvenil	30	20	96	449	Presente estudo
12	<i>Mesodesma mactroides</i>	juvenil	30	20	96	505	Presente estudo
13	<i>Tigropus japonicus</i>	adulto	33	25	96	681,3	Kwok <i>et al.</i> 2008
14	<i>Arenaeus cribrarius</i>	juvenil	30	20	96	687	Presente estudo
15	<i>Penaeus duorarum</i>	pós-larva	25	25	96	756,3	Cripe 1994
16	<i>Archosargus probatocephalus</i>	adulto	30	21-23	96	1036	Steele 1983a
17	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	pós-larva	33	20	96	1173	Santos <i>et al.</i> 2000
18	<i>Arius felis</i>	adulto	30	21-24	96	2182	Steele 1983b
19	<i>Lagodon rhomboides</i>	adulto	30	21-23	96	2500	Steele 1983a
20	<i>Micropogon undulatus</i>	adulto	30	21-23	96	5145	Steele 1983a

\* Espécies # 1, 5, 16, 19 e 20 foram previamente classificadas em função da sensibilidade ao cobre pela USEPA (2003). Os dados das espécies # 8 e # 17 foram obtidos em nosso laboratório em estudos prévios. Os decápodes *Neohelice granulata* em sua fase adulta (Bianchini *et al.* 2003) e *Callinectes sapidus* (Camila Martins, FURG, com. pes.), e o isópode *Excirrolana armata* (Barcarolli 2004) também foram testados, mas as CL<sub>50</sub> não puderam ser determinadas porque as concentrações de cobre adicionadas ao meio excederam o limite de solubilidade para este metal em água do mar. NI – não informado.

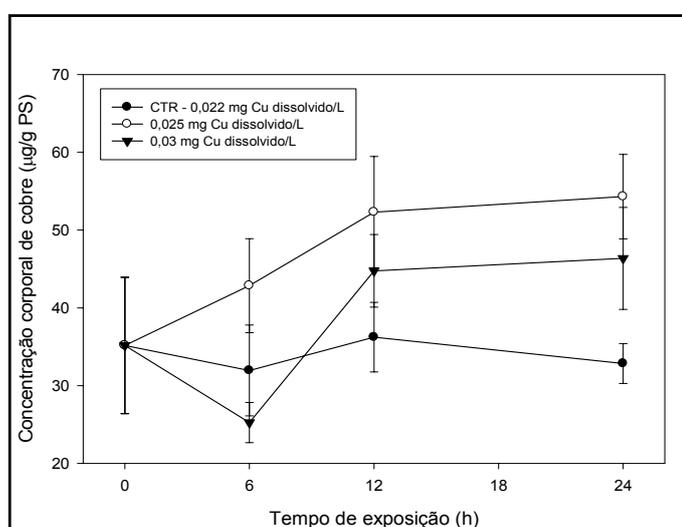


**Figura 3.1.3.** Distribuição da sensibilidade de espécies (SSD) para animais marinhos. Os pontos com legenda em negrito referem-se às espécies testadas no presente estudo (MEA – *Metamysidopsis elongata atlantica*; TM – *Trachinotus marginatus*; MM – *Mesodesma mactroides*; AC – *Arenaeus cribrarius*), e os pontos com legenda abaixo deles referem-se a outras espécies que foram testadas em estudos prévios, em nosso laboratório (AT – *Acartia tonsa*; FP – *Farfantepenaeus paulensis*). Os dados utilizados na figura correspondem àqueles apresentados na Tabela 3.1.3.

### 3.2. Acumulação de cobre em sistemas biológicos

#### 3.2.1. Identificação do ligante biótico e determinação da cinética de acumulação de cobre

##### 3.2.1.1. Acumulação de cobre no misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica*



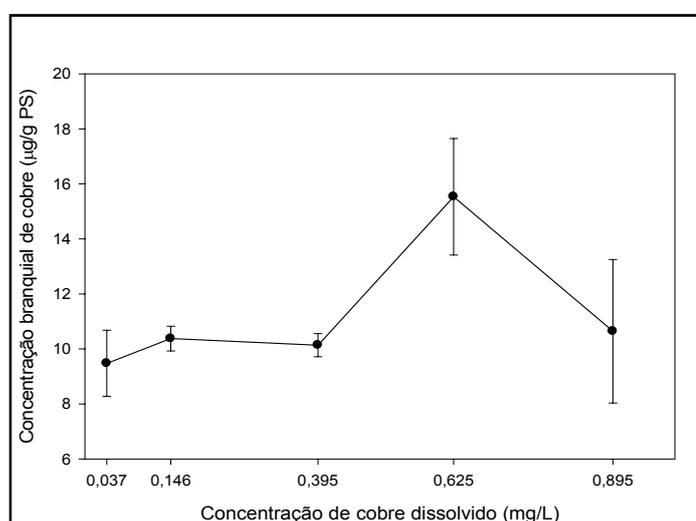
**Figura 3.2.1.** Acumulação temporal de cobre no misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica* (N = 60 por tratamento). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão.

A Figura 3.2.1 apresenta os resultados de acumulação de cobre ao longo do tempo no misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica*. Como pode ser observado, não houve diferença significativa na acumulação de cobre em função do tempo ou da concentração de exposição. As concentrações de cobre nominal utilizadas para a determinação da  $AL_{50}$  foram 0,04 mg/L (NOEC) e 0,08 mg/L ( $\sim CL_{50}$ ), mas como pode ser observado na figura, as concentrações de cobre dissolvido encontradas nos meios de experimentação não diferiram

significativamente do grupo controle, de modo que os níveis de cobre mantiveram-se similares ao nível basal. No entanto, a acumulação do metal parece seguir uma cinética de saturação, tanto em relação ao tempo de exposição quanto à concentração de cobre após 24 h de exposição (Fig. 3.2.1).

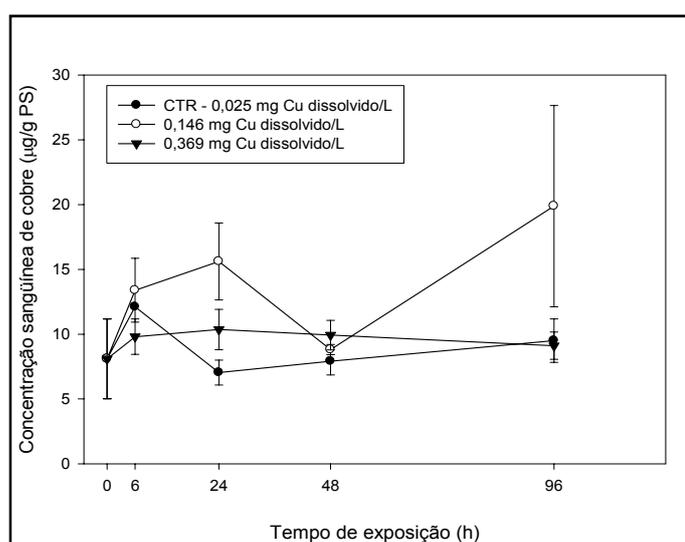
### 3.2.1.2. Acumulação de cobre no pampo-malhado *Trachinotus marginatus*

Após três horas de exposição a diferentes concentrações de cobre (0,4 a 1,6 mg/L de cobre nominal), não houve acumulação significativa deste metal nas brânquias dos peixes analisados (Figura 3.2.2), como já havia sido relatado para outras espécies de peixes (Morgan *et al.* 1997, Bury *et al.* 1999, Wood *et al.* 1999).

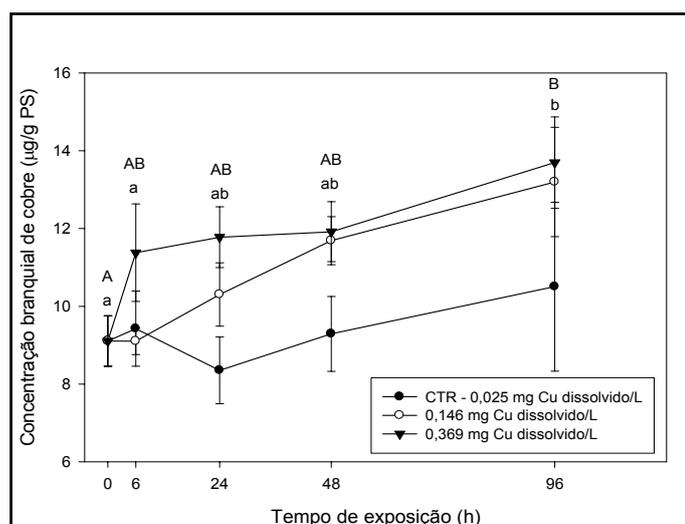


**Figura 3.2.2.** Acumulação de cobre nas brânquias de *Trachinotus marginatus* após 3 h de exposição a diferentes concentrações de cobre. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=6).

No presente estudo, os peixes foram então expostos por 96 h a  $CL_{50}$  previamente determinada nos testes de toxicidade aguda, bem como a uma concentração onde efeitos deletérios não são esperados (NOEC). Os resultados de acumulação de cobre nos tecidos são apresentados nas Figuras 3.2.3 (sangue) e 3.2.4 (brânquias).



**Figura 3.2.3.** Acumulação temporal de cobre no sangue de *Trachinotus marginatus*, expostos a diferentes concentrações de cobre dissolvido na água. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=6). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na concentração de cobre sanguíneo ao longo de tempo de exposição, em relação ao controle.



**Figura 3.2.4.** Acumulação temporal de cobre nas brânquias de *Trachinotus marginatus*, expostos a diferentes concentrações de cobre dissolvido na água. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=6). Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de exposição a NOEC para os peixes (0,146 mg Cu dissolvido/L). Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de exposição, para os peixes expostos à  $CL_{50}$  (0,369 mg Cu dissolvido/L). Não houve variação significativa ao longo do tempo de exposição para os peixes mantidos na condição controle ((0,025 mg Cu dissolvido/L).

No sangue, os níveis de acumulação de cobre não diferiram do grupo controle, independente do tempo ou concentração de exposição (Fig. 3.2.3). Vários autores têm demonstrado que o sangue é preferencialmente uma via de transporte de contaminantes, a partir da qual estes atingem os órgãos-alvo, onde exercem sua toxicidade (Beaumont *et al.* 2000).

Por outro lado, tanto para os peixes expostos à NOEC (0,146 mg Cu dissolvido/L) quanto para indivíduos expostos a CL<sub>50</sub> (0,369 mg Cu dissolvido/L), o nível de cobre acumulado nas brânquias após 96 h de exposição foi significativamente maior do que aquele observado no grupo controle (Fig. 3.2.4).

Enquanto a acumulação branquial de cobre nos peixes do grupo controle manteve-se constante, a cinética de acumulação do metal nos peixes expostos a NOEC respondeu ao modelo linear ( $R^2 = 0,97$ ), segundo a equação:  $y = 9,123 + 0,045x$ . Por outro lado, nos peixes expostos a CL<sub>50</sub> a cinética de acumulação seguiu o modelo de saturação ( $y = 11,85x/(3,027 + x)$ ;  $R^2 = 0,99$ ), sendo a concentração máxima de cobre assimilado pelas brânquias estimada em  $11,85 \pm 0,07 \mu\text{g/g PS}$ .

A Figura 3.1.2 mostra as principais espécies de cobre presentes no meio experimental que poderiam ser assimiladas pelos animais expostos ao metal. Estes resultados mostram que o  $\text{CuCO}_3$  é a espécie inorgânica de cobre mais abundante na água costeira utilizada no presente estudo.

No presente estudo, a análise de especiação do cobre foi realizada para diferentes concentrações do metal dissolvido, através do software Visual MINTEQ. Quando a especiação do cobre foi analisada para 0,369 mg Cu

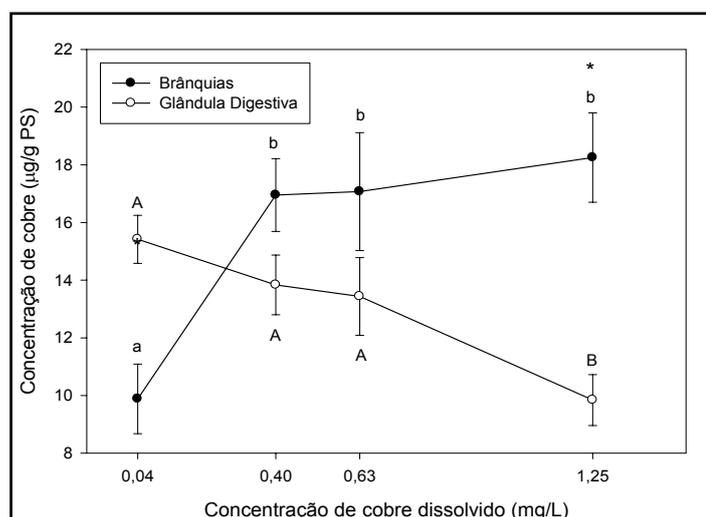
dissolvido/L, a maior concentração testada em laboratório e correspondente a  $CL_{50}$ , 18,83% do cobre apresentou-se na forma de íon cúprico livre ( $Cu^{2+}$ ), considerada a mais tóxica (Paquin *et al.* 2002). As demais espécies tóxicas (De Schampelaere *et al.* 2002) contribuíram com apenas 5,89% ( $CuOH^+$ ) e 0,14% ( $Cu(OH)_2$ ). A espécie inorgânica predominante foi o  $CuCO_3$  (59,84%), como esperado para água do mar (Libes 1992). Quando a especiação foi calculada para 0,02 mg Cu dissolvido/L, que pode ser considerada uma concentração ambientalmente relevante (Baumgarten & Niencheski 1998), a distribuição das espécies de cobre apresentou um comportamento diferente. Cerca de 13% do total de cobre foi representado pelas suas formas tóxicas (9,87%, 3,09% e 0,08% de  $Cu^{2+}$ ,  $CuOH^+$  e  $Cu(OH)_2$ , respectivamente). A contribuição da espécie  $CuCO_3$  foi de 31,44%, e a maioria do cobre apresentou-se complexado à matéria orgânica (52%).

### 3.2.1.3. Acumulação de cobre no marisco branco *Mesodesma mactroides*

Baseado nos resultados de  $CL_{50}$ , os mariscos foram expostos à diferentes concentrações de cobre durante três horas, para se determinar a cinética de acumulação do metal em diversos tecidos. Os resultados são apresentados na Figura 3.2.5.

Para todas as concentrações de exposição, houve uma acumulação branquial significativa de cobre. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos, caracterizando a cinética de acumulação como sendo do tipo saturação ( $R^2 = 0,99$ ;  $V_{max} = 18,3 \pm 0,27 \mu\text{g/g PS}$ ;  $K_m = 0,031 \pm 0,003$

$\mu\text{g/L}$  de cobre dissolvido). Este resultado demonstra que já nas primeiras horas de exposição a concentrações elevadas de cobre ocorre uma saturação dos sítios de ligação do cobre nas brânquias, apontando este órgão como um possível sítio de toxicidade do metal. Além disso, cabe notar que de modo geral a acumulação de cobre foi maior nas brânquias que na glândula digestiva dos mariscos expostos às diferentes concentrações do metal por três horas (Fig. 3.2.5).

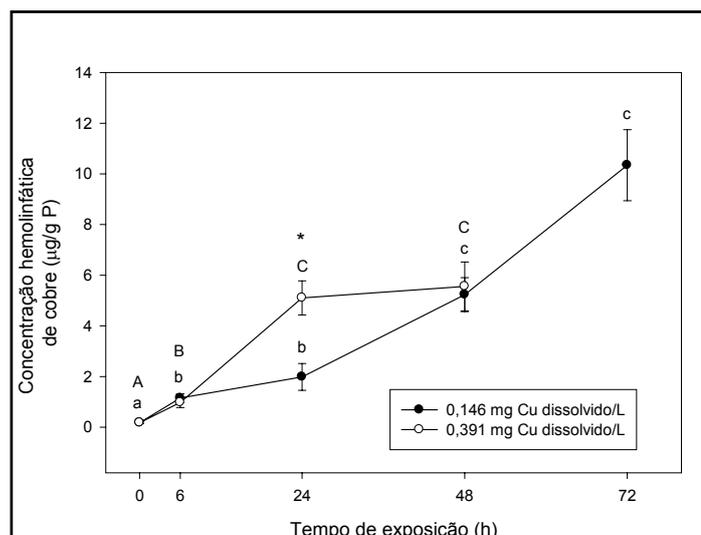


**Figura 3.2.5.** Acumulação de cobre em tecidos do marisco branco *Mesodesma mactroides* após 3 h de exposição a diferentes concentrações de cobre. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=6$ ). Letras minúsculas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) na acumulação de cobre nas brânquias entre as concentrações de exposição. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) na acumulação de cobre na glândula digestiva entre as concentrações de exposição. \* indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) na acumulação de cobre entre os tecidos, para a mesma concentração de exposição.

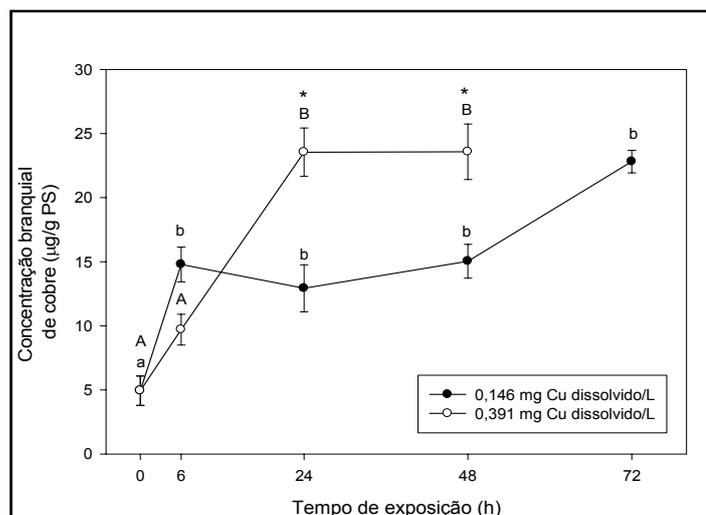
Na glândula digestiva, diferentemente do que foi observado nas brânquias, não foi evidenciado um padrão de resposta de acumulação de cobre em função da concentração de metal no meio. Mariscos expostos a alta (1,25 mg/L) concentração de cobre dissolvido apresentaram depuração do cobre previamente acumulado, indicando a importância da glândula digestiva na detoxificação deste metal, como vem sendo relatado na literatura (Roméo & Gnassia-Barelli 1995, Géret *et al.* 2002).

Para a determinação da cinética de acumulação temporal do cobre em diferentes tecidos do marisco branco, estes foram agudamente expostos a  $CL_{50}$  e a NOEC. Os resultados estão expressos nas Figuras 3.2.6 a 3.2.8.

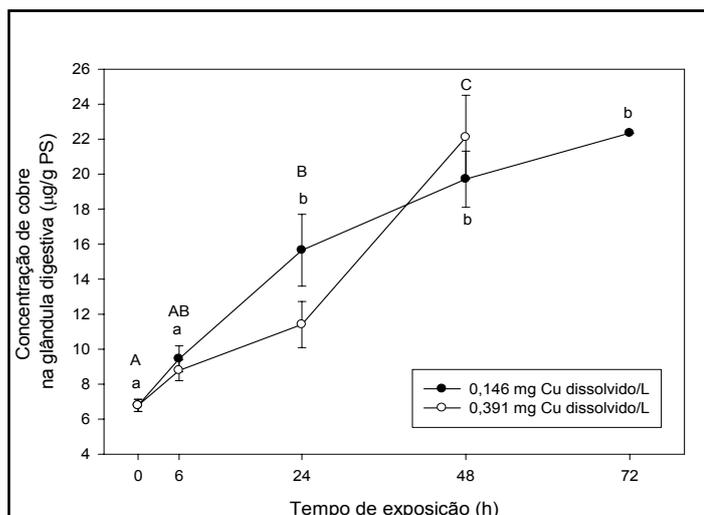
A acumulação de cobre encontrada nos mariscos expostos a NOEC (0,146 mg de cobre dissolvido/L) seguiu um modelo linear, tanto na hemolinfa ( $R^2=0,95$ ;  $y = -0,253 + 0,134x$ ; Fig. 3.2.6) quanto na glândula digestiva ( $R^2=0,94$ ;  $y = 8,38 + 0,214x$ ; Fig. 3.2.8), mostrando que estes tecidos acumulam continuamente cobre à medida que são mantidos por mais tempo em concentrações elevadas deste metal. Para ambos os tecidos (hemolinfa e glândula digestiva), a concentração de cobre acumulado já apresentou diferença significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao controle, após 6 h de exposição ao metal. Por outro lado, a acumulação de cobre nas brânquias dos mariscos expostos a NOEC demonstraram uma cinética de saturação ( $R^2=0,67$ ;  $y = 19,79x/(2,19 + x)$ ), uma vez que após 6 h de exposição ao cobre, a acumulação do metal foi estatisticamente igual àquela observada nos tempos subsequentes. A capacidade máxima de acumulação de cobre foi estimada em  $19,79 \pm 4,49 \mu\text{g/g PS}$  (Fig. 3.2.7).



**Figura 3.2.6.** Acumulação temporal de cobre na hemolinfa do marisco branco *Mesodesma mactroides*, expostos a 0,2 mg Cu nominal/L (NOEC, círculos pretos) e a 0,6 mg Cu nominal/L (CL<sub>50</sub>, círculos brancos). Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n=6). Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de exposição para mariscos expostos à NOEC. Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de exposição para mariscos expostos à CL<sub>50</sub>. \* indicam diferença significativa (p<0,05) entre a acumulação nas diferentes concentrações de cobre, para o mesmo tempo de exposição.



**Figura 3.2.7.** Acumulação temporal de cobre nas brânquias do marisco branco *Mesodesma mactroides*, expostos a 0,2 mg Cu nominal/L (NOEC, círculos pretos) e a 0,6 mg Cu nominal/L (CL<sub>50</sub>, círculos brancos). Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n=6). Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de exposição para mariscos expostos à NOEC. Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de exposição para mariscos expostos à CL<sub>50</sub>. \* indicam diferença significativa (p<0,05) entre a acumulação de cobre em função da concentração, para o mesmo tempo de exposição.



**Figura 3.2.8.** Acumulação temporal de cobre na glândula digestiva do marisco branco *Mesodesma mactroides*, expostos a 0,2 mg Cu nominal/L (NOEC, círculos pretos) e a 0,6 mg Cu nominal/L (CL<sub>50</sub>, círculos brancos). Os resultados são expressos como média ± erro padrão (n=6). Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de exposição para mariscos expostos à NOEC. Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de exposição para mariscos expostos à CL<sub>50</sub>. Não houve diferença significativa (p>0,05) na acumulação de cobre em função da concentração, para o mesmo tempo de exposição.

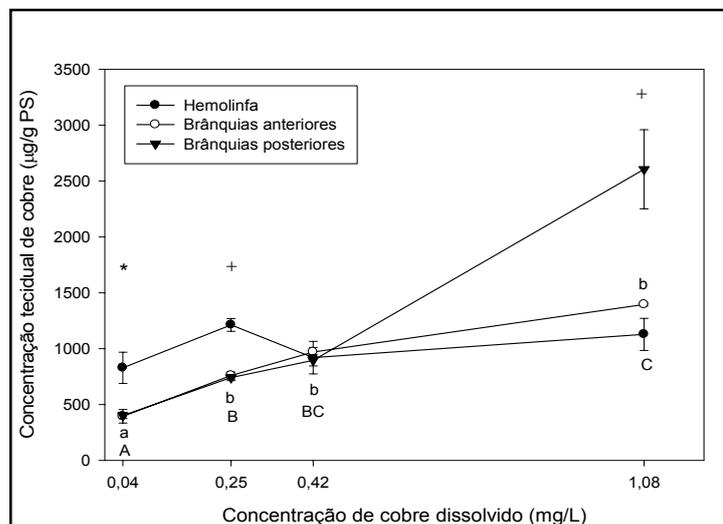
Em função da disponibilidade de mariscos para a realização deste teste de acumulação ao longo do tempo e à mortalidade observada (e esperada) no grupo exposto à CL<sub>50</sub>, não foi possível a continuidade do teste ao longo de 96 h de duração, sendo este interrompido após 48 h. Quando os mariscos foram submetidos à CL<sub>50</sub>, a cinética de acumulação de cobre foi diferente para cada tecido analisado.

Na hemolinfa, a acumulação de cobre também seguiu o modelo linear ( $R^2 = 0,99$ ;  $y = -0,02 + 0,21x$ ). É importante notar que os níveis de acumulação de cobre ao longo do tempo foram, de modo geral, semelhantes nas diferentes concentrações de cobre testadas (Fig. 3.2.6). Estes resultados indicam que o limite de capacidade de assimilação do cobre pelos mariscos já é atingido após exposição a NOEC.

Nas brânquias, a cinética temporal de acumulação de cobre nos mariscos expostos a  $CL_{50}$  também seguiu um modelo de saturação ( $R^2 = 0,99$ ;  $y = 24,04/(1 + e^{-(x-7,72)/5,26})$ ), sendo que a capacidade máxima de acumulação foi estimada em  $24,04 \pm 0,8 \mu\text{g/g PS}$  (Fig. 3.2.7). Cabe ressaltar que este valor é bastante semelhante àquele observado nos mariscos expostos a NOEC, indicando que esta concentração de cobre já é suficiente para saturar os sítios de ligação presentes nas brânquias.

Assim como observado para a hemolinfa, a cinética de acumulação de cobre na glândula digestiva do marisco branco exposto a NOEC ( $R^2 = 0,94$ ;  $y = 8,38 + 0,21x$ ) ou à  $CL_{50}$  ( $R^2 = 0,95$ ;  $y = 6,255 + 0,309x$ ) seguiu um modelo linear de acumulação deste metal (Fig. 3.2.8). Esta resposta pode estar associada ao fato de que a glândula digestiva dos bivalves é o principal órgão envolvido na detoxificação de metais.

### 3.2.1.4. Acumulação de cobre no siri-chita *Arenaeus cribrarius*

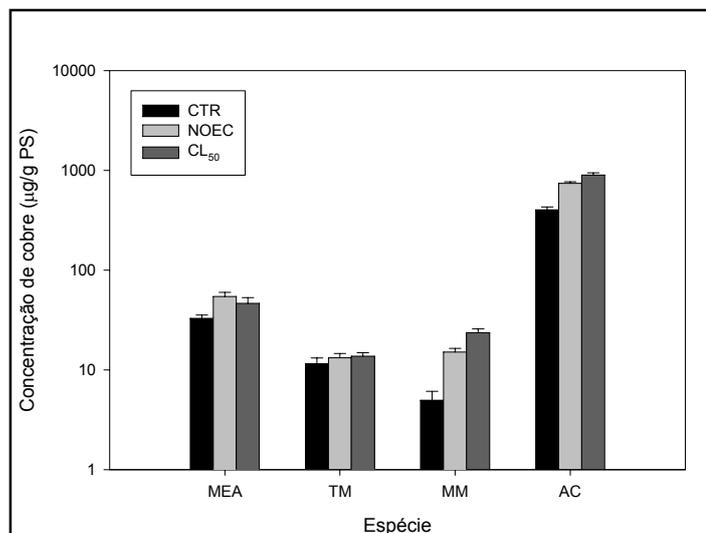


**Figura 3.2.9.** Acumulação de cobre em tecidos do siri-chita *Arenaeus cribrarius* expostos por 96 h a diferentes concentrações de cobre. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=6$ ). Letras minúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as diferentes concentrações de exposição, nas brânquias anteriores; Letras maiúsculas diferentes correspondem à diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as diferentes concentrações de exposição, nas brânquias posteriores. \* indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre a acumulação na hemolinfa e nos demais tecidos, para a mesma concentração de exposição. + indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre a acumulação na hemolinfa e na brânquia posterior, para a mesma concentração de exposição.

Os níveis teciduais de cobre no siri-chita, em diferentes concentrações de exposição ao metal em laboratório estão apresentados na Figura 3.2.9. Pode ser observado que não houve variação na acumulação de cobre na hemolinfa dos siris, independente da concentração de exposição. Entretanto, houve um aumento dos níveis de cobre acumulado nas brânquias anteriores e posteriores já na concentração mais baixa de exposição (0,5 mg/L de cobre nominal), em

relação ao controle. A acumulação deste metal respondeu ao modelo de acumulação linear, tanto nas brânquias anteriores ( $y = 478,9 + 897,4x$ ;  $R^2 = 0,94$ ), quanto nas posteriores ( $y = 194,2 + 2164x$ ;  $R^2 = 0,98$ ).

A Figura 3.2.10 apresenta um panorama geral da concentração corporal de cobre nos misídeos *Metamysidopsis elongata atlantica*, bem como nos níveis de cobre acumulado nas brânquias, principal ligante biótico do cobre, em pampos *Trachinotus marginatus*, mariscos *Mesodesma mactroides* e siris *Arenaeus cribrarius*, ao final do experimento de AL<sub>50</sub>. A partir destes dados, observa-se que a acumulação de cobre nas brânquias posteriores de *A. cribrarius* foi, em geral, duas ordens de magnitude maior que a acumulação observada nas brânquias de mariscos e pampos, indicando a presença de um número significativamente maior de sítios de ligação para o cobre nesta espécie.



**Figura 3.2.10.** Acumulação de cobre nas brânquias de pampos *Trachinotus marginatus*, mariscos *Mesodesma mactroides* e siris *Arenaeus cribrarius*, e nos misídeos *Metamysidopsis elongata atlantica*, ao final dos experimentos de determinação da AL<sub>50</sub>. Os resultados são expressos como média ± erro padrão (N=6).

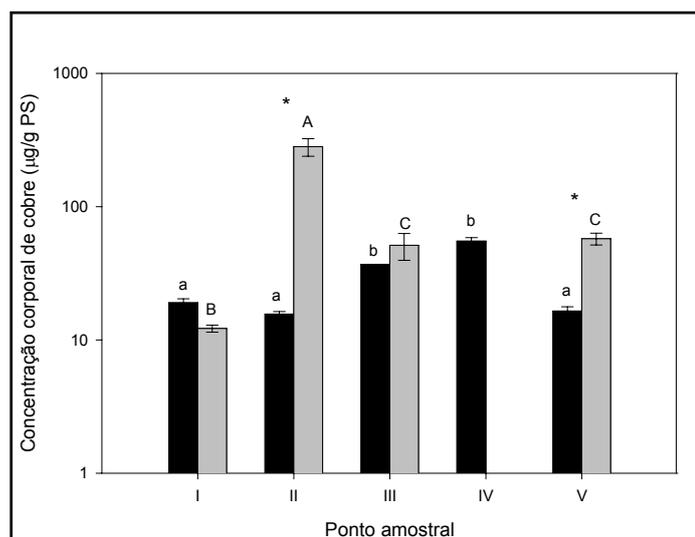
### 3.2.2. Bioacumulação de cobre *in situ*

Em diferentes pontos amostrais das praias do Cassino e do Mar Grosso, as espécies testadas foram coletadas em saídas durante o inverno e o verão para a determinação da concentração de cobre em seus tecidos, em função da sazonalidade e do local de coleta.

Durante as coletas de verão, a salinidade média registrada foi de  $31,4 \pm 1,69$  e a temperatura (°C) foi de  $25,6 \pm 0,81$ . No inverno, a salinidade média registrada foi de  $24,4 \pm 1,6$ , e a temperatura (°C) foi de  $14,83 \pm 0,87$ .

Os resultados da acumulação de cobre nos misídeos coletados no verão e no inverno nos diferentes pontos amostrais são apresentados na Figura 3.2.11.

A concentração de cobre acumulado nos organismos em seu ambiente natural se apresentou dentro da mesma faixa obtida para os organismos expostos aos testes de laboratório (Fig. 3.2.1), apontando os níveis basais de cobre para esta espécie, como sendo em torno de 10 a 50  $\mu\text{g/g}$  PS.



**Figura 3.2.11.** Acumulação de cobre no misídeo ( $n=6$ ) *Metamysidopsis elongata atlantica* no verão (barras pretas) e no inverno (barras cinzas) nos diferentes pontos amostrais. (I) Mar Grosso; (II) Molhe Leste; (III) Molhe Oeste; (IV) Balneário; (V) Navio. Letras minúsculas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os diferentes pontos amostrados no verão. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os diferentes pontos amostrados no inverno. \* indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as estações do ano, para a mesma estação de coleta. No inverno, não foi possível coletar misídeos na estação IV.

Em relação a acumulação de cobre em função da estação do ano, houve um aumento significativo na concentração de cobre nos misídeos coletados no inverno no Navio (ponto V) e no Molhe Leste (ponto II), imediatamente ao norte da desembocadura do estuário da Lagoa dos Patos, onde a concentração de

cobre acumulado no inverno excedeu em quase 20 vezes aquela encontrada no verão (Fig. 3.2.11).

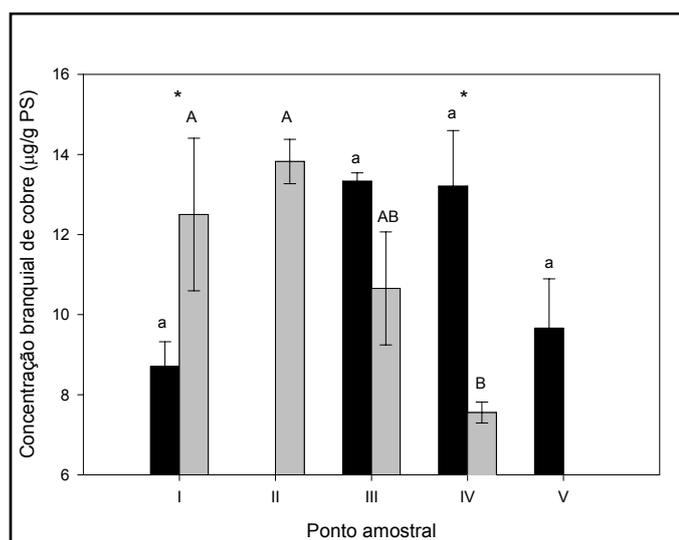
No verão, por outro lado, os maiores níveis de cobre foram encontrados nos organismos coletados nas estações III (Molhe Oeste) e IV (Balneário Cassino), que são as regiões que sofrem maiores impactos antrópicos.

Com relação ao pampo malhado *T. marginatus*, a concentração sanguínea de cobre nos peixes coletados e processados em campo não variou significativamente em função do ponto de coleta e, portanto, os dados foram agrupados por estação do ano. A acumulação sanguínea média de cobre foi de  $9,28 \pm 2,18$  e  $8,83 \pm 1,87$   $\mu\text{g/g PS}$ , respectivamente no verão e no inverno. Não houve diferença significativa entre as estações do ano.

Da mesma forma, a concentração hepática de cobre acumulado não variou significativamente em função do ponto de coleta e os dados foram também agrupados por estação do ano, sendo a acumulação hepática média de  $44,69 \pm 2,85$  e  $43,18 \pm 8,45$   $\mu\text{g/g PS}$ , respectivamente no verão e no inverno.

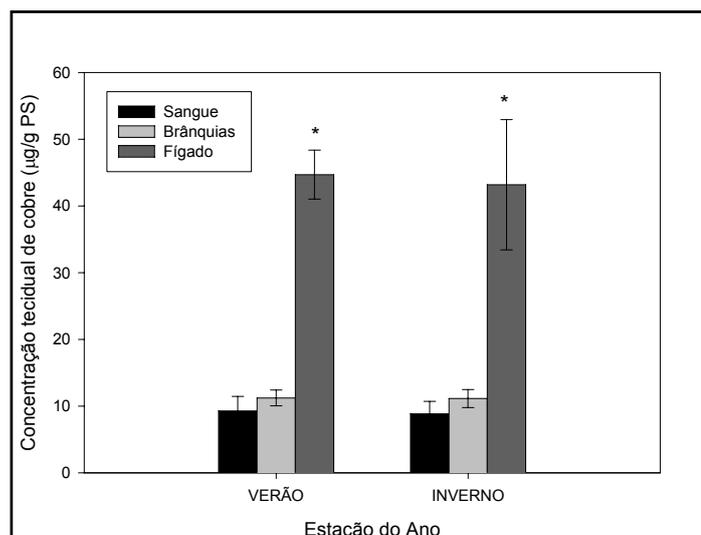
Diferentemente dos demais tecidos analisados, as brânquias mostraram variações na concentração de cobre acumulado tanto em função do local de coleta quanto em função da estação do ano (Fig. 3.2.12). Em função da grande variabilidade observada, não foi detectada diferença significativa entre os diferentes pontos amostrados no verão, mas, assim como verificado para misídeos (Fig. 3.2.11), houve uma tendência de maior acumulação de cobre nos pontos de coleta de maior atividade antrópica (Molhe Oeste (III) e Balneário (IV)). Também de forma similar ao observado no inverno para os misídeos, o maior nível de acumulação branquial do metal em *T. marginatus*

ocorreu no Molhe Leste (estação II). Porém, nas brânquias dos peixes, uma alta acumulação de cobre também foi observada na estação I (Mar Grosso), localizada ao norte da boca do estuário da Lagoa dos Patos.



**Figura 3.2.12.** Acumulação de cobre nas brânquias do pampo-malhado *Trachinotus marginatus* (n=6) no verão (barras pretas) e no inverno (barras cinzas) nos diferentes pontos amostrais. (I) Mar Grosso; (II) Molhe Leste; (III) Molhe Oeste; (IV) Balneário; (V) Navio. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras minúsculas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes pontos amostrados no verão. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes pontos amostrados no inverno. \* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes estações do ano, para a mesma estação de coleta. No inverno, não foi possível coletar pampos na estação III.

A Figura 3.2.13 mostra a comparação da acumulação média de cobre nos tecidos dos peixes coletados em todos os pontos de coleta, no verão e no inverno. Observa-se que a acumulação no fígado foi significativamente maior que nos demais tecidos analisados.



**Figura 3.2.13.** Acumulação média de cobre nos diferentes tecidos de *Trachinotus marginatus* (n=6) nos diferentes pontos amostrais, no verão e no inverno. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o fígado e os demais tecidos, para cada estação do ano.

Considerando os dados de acumulação *in situ* obtidos para o marisco branco *M. mactroides*, deve-se ressaltar que uma análise de correlação de Pearson foi realizada para verificar uma possível influência do tamanho dos mariscos sobre a acumulação de cobre nos tecidos destes animais coletados e processados em campo. Nas brânquias e na glândula digestiva, estas correlações foram positivas e significativas (0,56 e 0,38, respectivamente), e uma análise de covariância foi então utilizada para a interpretação dos resultados.

A concentração hemolinfática de cobre nos mariscos coletados e processados em campo não variou significativamente em função do ponto de coleta e, portanto, os dados foram agrupados por estação do ano. A acumulação hemolinfática média de cobre foi de  $11,16 \pm 2,05$  e  $6,95 \pm 2,3$   $\mu\text{g/g}$

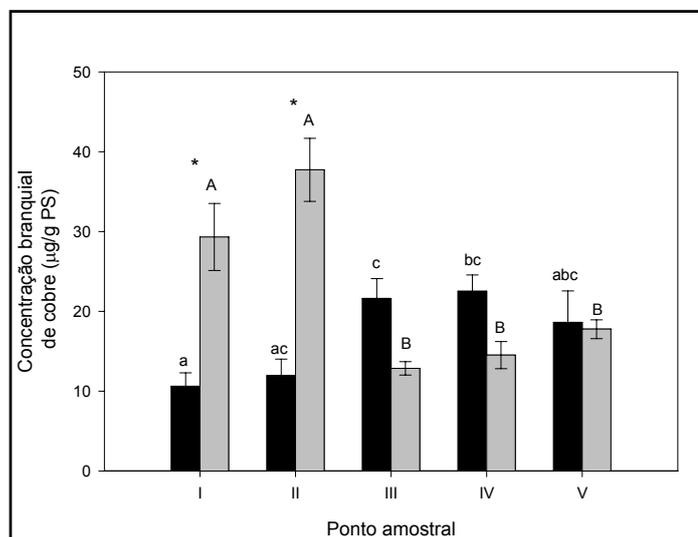
PS, respectivamente para o verão e inverno. Não houve diferença significativa entre as estações do ano. Denota-se que, para ambas as estações do ano, os níveis médios hemolinfáticos de cobre foram semelhantes nestes mariscos quando comparados àqueles expostos à elevadas concentrações de cobre em laboratório (Fig. 3.2.6).

Da mesma forma, na glândula digestiva as concentrações de cobre acumulado não variaram significativamente em função do ponto de coleta. Portanto, os dados foram agrupados por estação do ano. A acumulação média de cobre foi de  $86,22 \pm 25,6$  e  $106,71 \pm 25,2$   $\mu\text{g/g}$  PS no verão e no inverno, respectivamente. Não foi observada variação sazonal significativa ( $p > 0,05$ ).

Com relação à concentração de cobre acumulada nas brânquias, esta foi similar nos mariscos expostos à concentrações elevadas de cobre em laboratório (Fig. 3.2.7), e naqueles coletados e processados no ambiente (Fig. 3.2.14). Cabe lembrar que em laboratório os níveis de cobre acumulado foram letais em alguns casos, mas que se referem às concentrações basais acumuladas deste metal nas brânquias dos mariscos coletados e processados em campo. Como procedido para os pampos, a especiação do cobre foi então novamente simulada para a  $CL_{50}$  dos mariscos e comparada com a especiação sob baixas concentrações de cobre dissolvido no meio, para justificar respostas diferentes aos mesmos níveis de acumulação.

A especiação calculada para  $0,391$  mg Cu dissolvido/L ( $CL_{50}$ ) demonstrou que 18,9% do cobre se apresentou na forma de íon cúprico livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), considerada a mais tóxica (Paquin *et al.* 2002), e 5,9% ( $\text{CuOH}^+$ ) e 0,15% ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) foram as contribuições percentuais das demais espécies tóxicas (De

Schampelaere *et al.* 2002). A espécie inorgânica predominante foi o  $\text{CuCO}_3$  (60,04%), como esperado para água do mar (Libes 1992).

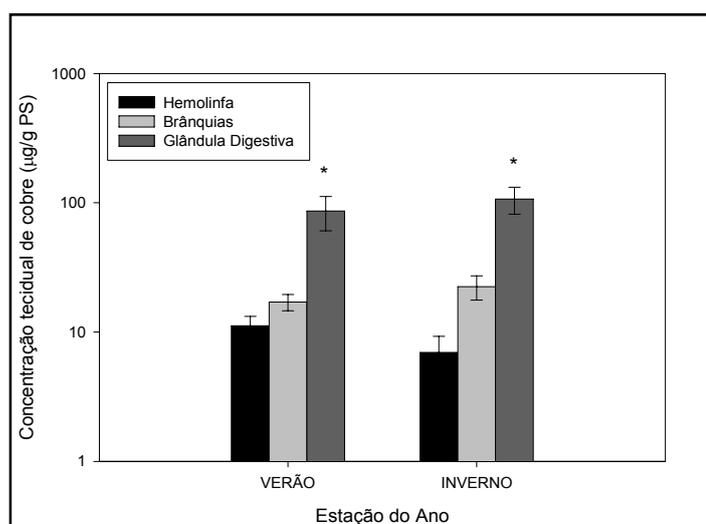


**Figura 3.2.14.** Acumulação de cobre nas brânquias do marisco branco *Mesodesma mactroides* (n=6) no verão (barras pretas) e no inverno (barras cinzas) nos diferentes pontos amostrais. (I) Mar Grosso; (II) Molhe Leste; (III) Molhe Oeste; (IV) Balneário; (V) Navio. Letras minúsculas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os pontos amostrados no verão. Letras maiúsculas indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os pontos amostrados no inverno. \* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as estações do ano, para o mesmo ponto de coleta.

Considerando as variações sazonais e espaciais, a acumulação de cobre nas brânquias de *M. mactroides* variou significativamente em função do ponto de coleta e da estação do ano (Fig. 3.2.14). Foi observada uma maior acumulação no inverno nos pontos de coleta de São José do Norte (I e II), como já havia sido observado nas demais espécies estudadas (misídeo e peixe). No verão, o padrão de acumulação de cobre nas brânquias também seguiu aquele encontrado para as demais espécies estudadas, apontando para

um maior aporte de cobre nos pontos de coleta de maior atividade antrópica, nos meses de verão (Fig. 3.2.14).

A comparação da acumulação de cobre nos diferentes tecidos do marisco branco *M. mactroides*, no verão e no inverno, estão apresentados na Figura 3.2.15. Os níveis de cobre foram maiores na glândula digestiva, independente da estação do ano, indicando que este tecido é um importante órgão de acumulação de metais no marisco branco *M. mactroides*, como já demonstrado para outros bivalves (Roméo & Gnassia-Barelli 1995, Géret *et al.* 2002).



**Figura 3.2.15.** Acumulação média de cobre nos diferentes tecidos de *Mesodesma mactroides* (n=6) coletados nos diferentes pontos amostrais, no verão e no inverno. \* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a glândula digestiva e os demais tecidos.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação da CL<sub>50</sub>

Os resultados apresentados na Tabela 3.1.2 indicaram que não houve diferença significativa entre as concentrações de cobre total e dissolvido para cada espécie animal testada, indicando que as espécies químicas biodisponíveis de cobre encontram-se na fração dissolvida, como previamente relatado por vários autores (Di Toro *et al.* 2000, De Schamphelaere *et al.* 2002, Arnold *et al.* 2005).

A Figura 3.1.1 apresenta os valores de CL<sub>50</sub> baseados na fração do íon cúprico livre, para cada espécie animal testada, comparando-se a especiação do metal realizada pelos modelos BLM e Visual MINTEQ. Em todos os casos, verificou-se que o BLM apresentou menores valores de CL<sub>50</sub>, superestimando a toxicidade do cobre, em relação aos valores calculados com base no Visual MINTEQ. Estes resultados demonstram que o BLM ainda apresenta limitações para seu uso em águas estuarinas e marinhas, como já vem sendo descrito na literatura (Arnold *et al.* 2005, Grosell *et al.* 2007).

Embora o BLM seja a ferramenta mais adequada para a análise da especiação de metais em ambientes dulciaquícolas (Di Toro *et al.* 2000, De Schamphelaere *et al.* 2002, USEPA 2003), uma vez que este modelo leva em consideração não somente a química da água, mas também a presença de um ligante biótico nas membranas biológicas, a base de dados geoquímicos e termodinâmicos usada pelo BLM não se aplica a ambientes com força iônica superior a 0,3 M (Söhnel & Novotný 1985, Grenthe *et al.* 1997). Por essa razão,

o Visual MINTEQ, que possui um banco de dados que responde bem a qualquer faixa de salinidade, foi utilizado no presente estudo.

Os metais-traço exercem sua toxicidade por apresentarem alta afinidade pelos grupamentos sulfidrilas das moléculas, de modo que atacam as pontes de enxofre presente nas enzimas, inibindo sua atividade. Além disso, os elementos-traço competem com macronutrientes por sítios de ligação no ligante biótico, alterando sua atividade. Outros sítios vulneráveis para a ação tóxica de metais são os grupos carboxila e amina das proteínas. Além da ligação a moléculas, os metais tendem a precipitar compostos fosfatados ou catalisar sua decomposição (Al-Mohanna & Subrahmanyam 2001). A partir destes mecanismos básicos, os metais podem acarretar diversos efeitos deletérios nos organismos, como distúrbios respiratórios e iônico e osmorregulatórios (Bianchini *et al.* 2003, Grosell *et al.* 2004a,b, De Boeck *et al.* 2007).

Nem todas as espécies metálicas exercem toxicidade no organismo, sendo o íon cúprico livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) considerado a espécie mais tóxica de cobre (Hall & Anderson 1999, Paquin *et al.* 2002). Algumas espécies hidroxiladas têm sido também sugeridas como potencialmente tóxicas (De Schamphelaere *et al.* 2002).

A Figura 3.1.2 apresenta a distribuição das espécies de cobre presentes nos meios experimentais contendo a concentração de cobre referente ao seu valor de  $\text{CL}_{50}$  para cada espécie animal testada, e mostra o predomínio de carbonato de cobre ( $\text{CuCO}_3$ ). O predomínio de espécies carbonatadas de cobre em água do mar também foi verificado por Blanchard e Grosell (2005).

Estes autores fizeram uma análise de correlação para verificar quais espécies de cobre poderiam estar sendo assimiladas pelos organismos. Visto que a distribuição das espécies de cobre no meio foi similar àquela encontrada no presente estudo, o  $\text{CuCO}_3$  parece ser a principal forma de cobre que contribui para a acumulação deste metal nos organismos marinhos.

Em relação a sensibilidade das espécies ao cobre, os resultados do presente estudo demonstraram que as espécies animais testadas respondem diferentemente em relação à tolerância ao cobre, mesmo habitando o mesmo ambiente. Grosell *et al.* (2002) demonstraram que organismos menores apresentam maior circulação de sódio, e visto que o cobre em concentrações ambientalmente relevantes é um tóxico osmorregulatório (Grosell *et al.* 2007), espera-se que as populações de organismos menores sejam mais afetadas. De fato, os misídeos apresentaram sensibilidade ao cobre significativamente maior que as outras espécies testadas no presente estudo (Tab. 3.1.2). Em função da alta sensibilidade a compostos tóxicos, ciclo de vida curto, pequeno tamanho e desenvolvimento direto (Nimmo & Hamaker 1982), pesquisas em ecotoxicologia marinha e estuarina vêm sendo realizadas no Brasil com várias espécies de misídeos (Badaró-Pedroso 1993, Nipper *et al.* 1993).

Os testes de toxicidade aguda do cobre realizados no presente estudo tiveram duração de 96 h para todas as espécies testadas, exceto para misídeos, onde os testes duraram apenas 24 h. Vários autores registraram a ocorrência de canibalismo sobre filhotes e adultos feridos, quando misídeos não são supridos com a quantidade adequada de alimento (Lussier *et al.* 1988, Domingues *et al.* 1998). Embora no presente estudo os organismos tenham

sido expostos individualmente às diversas concentrações de cobre testadas, a debilidade causada pela inanição poderia mascarar a interpretação dos resultados, e por este motivo optou-se por um período de exposição mais curto. De fato, testes pilotos com duração de 48 h foram realizados, e uma grande mortalidade foi verificada no grupo controle. Neste caso, a adição de alimento nos meios experimentais poderia ser adotada para evitar o efeito da inanição, porém estudos anteriores com copépodes têm demonstrado que a presença de alimento na água afeta tanto a especiação do cobre quanto a resposta dos animais à exposição a metais, incluindo o cobre (Pedroso *et al.* 2007, Pinho *et al.* 2007).

A regulamentação da emissão de contaminantes nos ecossistemas costeiros deve ser baseada em populações sensíveis, de modo que a proteção de tais espécies assegure a proteção de toda a comunidade (Newman *et al.* 2000). Muitos estudos vêm apontando os misídeos como um grupo bastante sensível à exposição aos metais, em relação a outros grupos, como copépodes, cladóceros, bivalves, decápodes e peixes (Nipper *et al.* 1993, Cripe 1994, Garnacho *et al.* 2000).

Testes de toxicidade aguda do cobre foram também realizados em estudo prévio com o copépode *A. tonsa* (Rodrigues 2007), que é também uma importante guilda na zona de arrebentação de praias arenosas do Sul do Brasil (Montú *et al.* 1998). Neste caso, os resultados indicaram que o misídeo *M. elongata atlantica* é ainda mais sensível que o copépode *A. tonsa*, e pode ser indicado como um modelo para a avaliação dos potenciais riscos ecológicos

causados por este metal, bem como ser usado para definir um critério de qualidade de água para este ambiente.

De modo geral, os testes de toxicidade são realizados em organismos nos seus primeiros estágios ontogenéticos, onde a toxicidade dos contaminantes tende a ser maior (Grosell *et al.* 2002). Em misídeos imaturos (< 14 dias; Gama *et al.* 2002), a frequência de mudas é quase o dobro daquela realizada por adultos (Gama *et al.* 2002). Muitos autores associam maiores sensibilidades a metais com os ciclos de muda, uma vez que a perda da carapaça torna o organismo mais vulnerável a contaminantes e outros agentes externos (Saroglia & Scarano 1979, White & Rainbow 1984, Cripe 1994, Garnacho *et al.* 2000). Para a espécie estudada, no entanto, Zamboni *et al.* (1996) não verificaram diferença entre a toxicidade do cobre em juvenis (0,075 mg/L) e adultos (0,079 mg/L), indicando que este misídeo é sensível ao cobre mesmo no período intermudas.

Embora a concentração letal para 50% da população de misídeos (0,09 mg/L) encontrada no presente estudo não tenha alta relevância ecológica, testes não foram realizados com indivíduos recém-nascidos, nos quais a toxicidade tende a ser maior (Grosell *et al.* 2002). Além disso, valores crônicos de toxicidade são geralmente menores que os valores agudos, de modo que concentrações inferiores de cobre poderiam acarretar ao animal diversos distúrbios nos processos de reprodução e crescimento, por exemplo. Os valores crônicos são definidos como a média geométrica entre a maior concentração de cobre onde efeitos adversos não foram observados (NOEC) e a menor concentração do metal na qual foi possível observar efeitos deletérios

(LOEC) (USEPA 2003). Embora testes de toxicidade crônica não foram conduzidos no presente estudo, a  $CL_{50}$  crônica esperada seria em torno de 0,05 mg/L. Esta concentração de cobre ainda não é ecologicamente muito relevante, mas os efeitos crônicos começam a ser observados em níveis subletais, e, portanto esta espécie poderia estar respondendo negativamente às exposições ao cobre presente no ambiente. Sendo assim, a continuidade das pesquisas com o misídeo *M. elongata atlantica* é importante, uma vez que esta espécie é potencialmente um bom modelo para a derivação de critérios de qualidade de água para os ecossistemas costeiros arenosos do Brasil.

Com relação a toxicidade aguda do cobre para as demais espécies animais testadas, o resultados apresentados na Tabela 3.1.2 indicaram que os juvenis de mariscos, siris e peixes são tolerantes à altas exposições agudas a este metal. A concentração de cobre correspondente a 50% do valor da  $CL_{50}$  é geralmente considerada uma concentração onde efeitos adversos não são observados (NOEC) (USEPA 2003). Sendo assim, concentrações de cobre dissolvido de até 0,2 mg/L não causariam qualquer dano às espécies testadas, exceto para os misídeos. Esta alta tolerância evidencia que critérios de qualidade de água, ou seja, as concentrações limites de emissão, não poderiam ser baseadas na sensibilidade do marisco branco, pampo malhado ou siri-chita, em seus estágios juvenis.

No entanto, para que espécies sensíveis sejam detectadas, é importante que testes sejam conduzidos em diferentes representantes chaves do ambiente a ser regulamentado, envolvendo pesquisas com diversos grupos taxonômicos e estágios de vida das espécies (USEPA 2003).

Os crustáceos decápodes são conhecidos por apresentar grande tolerância à exposição aos metais, mesmo em estágios iniciais do desenvolvimento (Cripe 1994, Santos *et al.* 2000, Bianchini *et al.* 2003). Apesar da alta tolerância ao cobre apresentada pelo siri-chita *A. cribrarius*, este decápode apresentou-se menos tolerante que outras espécies de crustáceos decápodes. Enquanto a CL<sub>50</sub> não pôde ser determinada para o siri azul *Callinectes sapidus* (Camila Martins, FURG, com. pes.), nem para o catanhão *Neohelice granulata* em sua fase adulta (Bianchini *et al.* 2003), uma vez que uma mortalidade suficiente não foi atingida dentro do limite de solubilidade do cobre em água do mar, a toxicidade em juvenis de *A. cribrarius* foi mais alta que aquela registrada para pós-larva dos camarões *Penaeus duorarum* (Cripe 1994) e *Farfantepenaeus paulensis* (Santos 2000).

Apesar do siri-chita ser um organismo abundante da zona de arrebentação de praias arenosas do extremo sul do Brasil nos meses quentes (Souza 1998), a espécie parece ser a mais sensível aos fatores estressantes externos de todas as espécies testadas. Avila e Branco (1996) demonstraram que indivíduos desta espécie não toleram temperaturas inferiores a 11°C. Além disso, Souza (1998), em estudo realizado nas regiões de plataforma e talude da costa do Rio Grande do Sul, não verificou a presença desta espécie em condições de salinidade inferior a 25. Talvez essas condições mais restritivas da adaptação fisiológica deste organismo reflitam em uma maior sensibilidade aos contaminantes químicos, mas estudos futuros devem ser conduzidos para confirmar esta hipótese.

A zona de arrebentação das praias arenosas do extremo sul do Brasil confere aos pampos da espécie *T. marginatus*, ao longo de toda sua distribuição geográfica, o principal ambiente de recrutamento. Sendo assim, qualquer alteração neste ecossistema poderia refletir negativamente nas populações da espécie. A CL<sub>50</sub> baseada no cobre dissolvido foi de 0,449 mg/L para esta espécie. Trabalho realizado com o pampo da Flórida *Trachinotus carolinus* demonstrou uma sensibilidade ao cobre (0,427 mg/L; Birdsong & Avavit 1971) semelhante àquela observada para *T. marginatus* no presente estudo, o que pode indicar que indivíduos do gênero *Trachinotus* apresentam o mesmo nível de sensibilidade à exposição ao cobre. A espécie *T. carolinus* também ocorre em praias arenosas do sul do Brasil, porém em baixa abundância (Chao *et al.* 1982).

Nos primeiros estágios do desenvolvimento juvenil, os pampos alimentam-se especialmente de organismos do zooplâncton (copépodes e misídeos) e de recrutas da tatuíra *Emerita brasiliensis* (Monteiro-Neto 1983). Deste modo, mesmo com grande tolerância à exposição ao cobre, alterações na comunidade da zona de arrebentação poderiam estar impactando negativamente as populações de *T. marginatus*.

Com relação ao marisco branco *M. mactroides*, a adaptação a sistemas de praias arenosas específicos, com características dissipativas, torna a zona de arrebentação e intermareal das praias arenosas do extremo sul do Brasil um ambiente fundamental para o assentamento de juvenis desta espécie (Narchi 1981). A distribuição de *M. mactroides* é restrita, compreendendo desde a baía de Santos (Brasil) até a província de Buenos Aires (Argentina; de Castellano

1970). Sendo assim, alterações no ecossistema poderiam comprometer a sobrevivência desta espécie. Neste contexto, investigações sobre a qualidade do ambiente e sobre as respostas do organismo à possíveis alterações no ambiente são de extrema importância.

Os testes toxicológicos conduzidos com o marisco branco demonstraram que juvenis desta espécie são tolerantes ao cobre ( $CL_{50} = 0,505$  mg/L). Comparativamente, *M. mactroides* apresentou menor sensibilidade ao cobre que outras espécies de moluscos estudadas. Géret *et al.* (2002) demonstraram que o cobre induziu alta mortalidade após exposição de ostras e mexilhões a 15°C, por 21 dias, a 0,04 mg/L. Kumaraguru e Ramamoorthi (1978) determinaram a  $CL_{50} - 96$  h para três espécies de bivalves estuarinos, expostos a 27°C: 0,06 mg Cu/L para *Anadara granosa*, 0,072 mg Cu/L para *Meretrix casta* e 0,088 mg Cu/L para *Crassostrea madrasensis*.

Os bivalves do gênero *Mytilus* vêm demonstrando a maior sensibilidade ao cobre (0,0115 mg Cu/L) dentre todos os organismos marinhos testados até então (USEPA 2003). No entanto, os experimentos foram realizados em seus estágios embrionários ou no início do desenvolvimento larval, o que justifica a grande diferença entre a sensibilidade deste e a de outros moluscos, como o caso do marisco branco.

Considerando-se a alta sensibilidade de *Mytilus* e de outros moluscos em seus estágios larvais, como *Crassostrea gigas* ( $CL_{50} = 0,012$  mg Cu/L; Martin *et al.* 1981), *C. virginica* ( $CL_{50} = 0,014$  mg Cu/L; MacInnes & Calabrese 1978), e *Mercenaria mercenaria* ( $CL_{50} = 0,021$  mg Cu/L; La Breche *et al.* 2002), o uso de larvas do bivalve *M. mactroides* para a determinação da  $CL_{50}$  para esta espécie

nos seus primeiros estágios ontogenéticos poderia identificá-lo também como um modelo biológico potencial para o estabelecimento de critérios e qualidade de água e regulamentação da emissão de cobre em praias arenosas.

Os dados do presente estudo, entretanto, apontam os juvenis do marisco branco *M. mactroides* como um bom modelo biomonitor de qualidade ambiental. Os bivalves são amplamente empregados como espécies biomonitoras para acompanhar a qualidade do meio e detectar possíveis alterações neste, uma vez que estes organismos apresentam alta tolerância aos contaminantes, baixa mobilidade, ciclo de vida longo o suficiente para um monitoramento a médio prazo, e concentram metais geralmente em função da concentração ambiental (Phillips 1980, Pavicic *et al.* 1987,).

De modo geral, os testes realizados para a determinação da toxicidade aguda do cobre nas espécies testadas no presente estudo apontaram o misídeo *M. elongata atlantica* como um potencial modelo para regulamentação ambiental, desde que estágios iniciais do desenvolvimento sejam considerados, e que o marisco branco *M. mactroides* pode ser indicado para o uso em programas de monitoramento da qualidade de água em regiões costeiras.

#### **4.1.1. Distribuição da Sensibilidade de Espécies (SSD)**

Visando a regulamentação ambiental, a utilização de curvas de distribuição da sensibilidade de espécies (SSD) é uma ferramenta que vem sendo bastante utilizada para identificar espécies sensíveis, a partir das quais podem ser

estabelecidos os critérios de qualidade de água. (USEPA 2003). Em um gráfico de SSD, diversas espécies são consideradas, englobando diversos grupos taxonômicos, com níveis de tolerância diferentes. Deste modo, a importância da SSD reside no fato de que o limite máximo de emissão do contaminante é determinado para a proteção de toda a comunidade e não apenas de uma ou poucas espécies (Newman *et al.* 2000). Sendo assim, a curva é ajustada em função da probabilidade cumulativa de proteção das diferentes espécies testadas. Por essa razão, é importante que tanto espécies sensíveis quanto espécies tolerantes sejam detectadas e utilizadas para o melhor ajuste desta curva (USEPA 2003).

Trabalhos realizados pela USEPA (USEPA 2003) e por Grosell *et al.* (2007) utilizaram curvas SSD para apontar espécies marinhas sensíveis. No entanto, os autores consideraram o ambiente marinho como um ecossistema único, sem levar em consideração as diferenças latitudinais e as características particulares dos diversos tipos de ambientes costeiros e marinhos que existem ao longo de todo o mundo. Portanto, no presente estudo, as espécies utilizadas para a determinação da sensibilidade do cobre foram cuidadosamente selecionadas em função da sua importância para a zona de arrebentação e intermareal de praias arenosas do extremo sul do Brasil, e também em função da importância deste ecossistema para estas espécies.

O uso da SSD, inserindo as espécies testadas, outras espécies presentes no sistema costeiro estudado, e ainda dados de outros testes toxicológicos realizados por pesquisadores em outras partes do mundo, apontou os grupos taxonômicos mais sensíveis e os mais tolerantes. De modo geral, os peixes e

os crustáceos decápodes são bastante tolerantes à exposições aos metais, enquanto as espécies da comunidade planctônica são mais sensíveis. As duas espécies mais sensíveis observadas na curva obtida correspondem a dois moluscos bivalves. No entanto, os testes foram realizados nos estágios larvais, quando estes organismos compõem a comunidade zooplanctônica (Fig. 3.1.3, Tab. 3.1.3). Sendo assim, para se cumprir a meta de derivar uma SSD específica para o ecossistema de praias arenosas brasileiras, além da continuidade dos estudos com o misídeo *M. elongata atlantica*, o uso de larvas do bivalve *M. mactroides* em testes toxicológicos poderia também indicar outro modelo biológico bastante sensível e adequado para a determinação de um critério de qualidade de nossas águas.

Com base no descrito acima, será então possível detectar espécies sensíveis ao cobre no ambiente específico de praias arenosas do extremo sul do Brasil. Os dados poderão então ser encaminhados aos órgãos competentes, como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para que a regulamentação da emissão deste metal em ambientes marinhos brasileiros seja readequada, caso necessário. Neste caso, os resultados obtidos são também importantes para aumentar o banco de dados sobre a toxicidade do cobre em organismos marinhos, visto que atualmente a maioria dos esforços relacionados à ecotoxicologia de metais concentra-se em ambientes dulciaquícolas.

## **4.2. Acumulação de cobre em sistemas biológicos**

### **4.2.1. Determinação do ligante biótico e da cinética de acumulação de cobre**

O ligante biótico é definido como o local no organismo onde o metal se liga e exerce sua toxicidade (Di Toro *et al.* 2000). Geralmente, o ligante biótico consiste em sítios de ligações para outros cátions, localizados em enzimas, mas que em elevadas concentrações do contaminante, passam a competir com este metal, que por vezes consegue se ligar ao sítio ativo e alterar a atividade desta enzima (Wood 2001, Grosell & Wood 2002).

Sendo assim, a análise da acumulação de cobre em tecidos dos organismos testados é importante para que o(s) ligante(s) biótico(s) para este metal possa(m) ser identificado(s), e então se determinar a cinética de acumulação do metal nestes ligantes, em função do tempo ou das concentrações de exposição.

A cinética de acumulação de metais nos organismos geralmente responde a modelos matemáticos, podendo ser linear, quando a concentração no organismo aumenta proporcionalmente à concentração presente no meio, ou hiperbólica, quando a acumulação do metal segue o modelo de Michaelis-Menten, apresentando uma concentração máxima de saturação da acumulação. Outros modelos, como o sigmóide, podem também ser encontrados em sistemas biológicos (Borgmann *et al.* 2004, Braudimont *et al.* 2005).

No presente estudo, a cinética de acumulação do cobre foi determinada em diferentes tecidos das diferentes espécies animais testadas.

A acumulação de cobre em misídeos expostos a diferentes concentrações de cobre é apresentada na Figura 3.2.1. Como pode ser observado, os níveis corporais de cobre não variaram significativamente em relação ao tempo ou à concentração de exposição, visto que os níveis de cobre dissolvido registrados nos meios experimentais foram similares à concentração de cobre encontrada na água do grupo controle. No entanto, a acumulação deste metal nos misídeos parece seguir um modelo de saturação, tanto em função do tempo, quanto da concentração de exposição.

Com relação à acumulação de cobre em tecidos do pampo malhado *T. marginatus*, a Figura 3.2.2 mostra que após três horas de exposição a diferentes concentrações de cobre (0,4 a 1,6 mg/L de cobre nominal), não houve acumulação significativa deste metal nas brânquias dos peixes analisados, indicando que três horas não é tempo suficiente para que os sítios de ligação para o cobre sejam saturados, como já havia sido relatado para outras espécies de peixes (Morgan *et al.* 1997, Bury *et al.* 1999, Wood *et al.* 1999).

Quando os peixes foram expostos a 96 h de exposição à NOEC e à CL<sub>50</sub> (Fig. 3.2.3 e 3.2.4), a cinética de acumulação do metal nas brânquias dos peixes expostos a NOEC respondeu ao modelo linear. Por outro lado, nos peixes expostos a CL<sub>50</sub> a cinética de acumulação seguiu o modelo de saturação. E no grupo controle, a acumulação branquial de cobre manteve-se constante. Sendo assim, as brânquias do pampo malhado podem ser

apontadas como um ligante biótico adequado para modelar os efeitos tóxicos do cobre, pois em concentrações não tóxicas o metal se acumula proporcionalmente em função do tempo, mostrando uma saturação dos sítios de ligação após 6 h de exposição às concentrações tóxicas. De fato, as brânquias são o sítio primário de acumulação de metais, uma vez que estão em contato direto com o ambiente (Roméo *et al.* 1994), constituindo uma importante rota de assimilação de metais em peixes (Zia & McDonald 1994). Por isso, os níveis de metais acumulados nas brânquias de peixes podem ser utilizados para avaliar a exposição destes animais a estes contaminantes no ambiente (Catsiki & Stroglyoudi 1999).

Por outro lado, o nível de cobre acumulado no tecido não necessariamente reflete diretamente a toxicidade deste metal, uma vez que formas não tóxicas podem também ser assimiladas pelos organismos. A Figura 3.1.2 mostra as principais espécies de cobre presentes no meio experimental que poderiam ser assimiladas pelos animais expostos ao metal. Estes resultados mostram que o  $\text{CuCO}_3$  é a espécie inorgânica de cobre mais abundante na água costeira utilizada no presente estudo. Blanchard e Grosell (2005) sugeriram que o  $\text{CuCO}_3$  se acumula nos tecidos através de processos de difusão passiva, não se ligando a qualquer sítio ativo na célula. Deste modo, o  $\text{CuCO}_3$  poderia estar disponível para acumulação, porém sem exercer toxicidade. Neste contexto, é importante mostrar que, em alguns casos, as concentrações de cobre encontradas no sangue e nas brânquias (Fig. 3.2.12) dos peixes coletados e processados em campo foram similares àsquelas observadas nos peixes expostos em laboratório (Fig. 3.2.3 e 3.2.4). No entanto, somente no teste para

determinação da  $AL_{50}$ , em laboratório, foi observada mortalidade dos peixes expostos à  $CL_{50}$ .

Por um lado, este resultado pode indicar um potencial risco ecológico do cobre às populações de pampo-malhado da zona costeira em estudo. No entanto, não há relatos de mortalidade de pampos por contaminação pelo cobre nestes animais nas praias arenosas do extremo Sul do Brasil. Por outro lado, a não indicação de toxicidade do cobre acumulado em pampos expostos ao metal em campo, pode estar associada à especiação diferencial do metal em função da sua concentração no meio aquático.

No presente estudo, a análise de especiação do cobre foi realizada para diferentes concentrações do metal dissolvido, através do software Visual MINTEQ. Quando a especiação do cobre foi analisada para 0,369 mg Cu dissolvido/L, a maior concentração testada em laboratório e correspondente a  $CL_{50}$ , cerca de 25% do cobre presente no meio apresentou-se sob a forma de frações tóxicas, e quase 59,84% se apresentou na forma de  $CuCO_3$ , como esperado para água do mar (Libes 1992). Quando a especiação foi calculada para 0,02 mg Cu dissolvido/L, que pode ser considerada uma concentração ambientalmente relevante (Baumgarten & Niencheski 1998), a distribuição das espécies de cobre apresentou um comportamento diferente, sendo as espécies tóxicas representaram menos de 15% da especiação total do metal, 31,44% na forma de  $CuCO_3$ , e a maioria do cobre apresentou-se complexado à matéria orgânica (52%).

Da mesma forma, os mariscos expostos à  $CL_{50}$  em laboratório apresentaram mortalidade, e os organismos coletados no campo parecem não

sofrer stress por contaminação pelo cobre, embora os níveis teciduais deste metal tenham sido similares nas duas situações. Sendo assim, sugere-se também uma assimilação diferenciada de cobre pelo *M. mactroides* dependendo da concentração de exposição no meio.

As espécies tóxicas de cobre parecem ser assimiladas mais rapidamente pelos organismos (Blanchard & Grosell 2005), de modo que quando se apresentam em concentrações elevadas no ambiente, exercem sua toxicidade em curtos períodos de exposição. Sendo assim, é provável que o cobre acumulado nas brânquias dos peixes expostos em laboratório a diferentes concentrações do metal (Fig. 3.2.2) ou submetidos a diferentes tempos de exposição a concentrações elevadas do metal (Fig. 3.2.4), seja representado especialmente por espécies tóxicas deste metal ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{CuOH}^+$ ). Por outro lado, a maior parte do cobre encontrado em águas naturais está complexado à matéria orgânica, que apresenta alta afinidade por este metal (Ma *et al.* 2001, Hirose 2007), tornando-o indisponível à biota. Assim, a alta concentração de cobre observada em alguns casos nos peixes em seu ambiente natural, portanto, poderia então ser justificada pela presença de espécies carbonatadas (especialmente  $\text{CuCO}_3$ ) no ambiente, que são mais lentamente assimiladas pelos organismos e não exercem efeitos tóxicos. Como já mencionado anteriormente, Blanchard e Grosell (2005) sugeriram que o  $\text{CuCO}_3$  entra nas células por transporte passivo, sem prejudicar os mecanismos de transporte.

Em peixes teleósteos de água doce, as brânquias foram identificadas como sendo o principal ligante biótico para o cobre, visto que os distúrbios apresentados por este metal são especialmente osmorregulatórios, sendo

estes associados à inibição de alguns mecanismos de transporte iônico de membrana induzida pelo cobre (Grosell & Wood 2002, Wood 2001). Em água marinha, sabe-se que distúrbios osmorregulatórios também são causados pela exposição a elevadas concentrações de cobre (Steele 1983a,b, Larsen *et al.* 1997, De Boeck *et al.* 2007). Entretanto, o intestino também vem sendo apontado como um importante sítio de ligação do cobre, visto que peixes marinhos ingerem água do mar constantemente para compensar a perda osmótica branquial de água (Grosell & Wood 2001, Grosell *et al.* 2004a,b). Portanto, o intestino poderia ser considerado como outro importante ligante biótico que estaria sendo afetado primariamente pelo cobre. Apesar de amostras de intestino não terem sido analisadas no presente estudo, este tecido é também um sítio primário de acumulação de cobre em peixes marinhos (Grosell & Wood 2001, Grosell *et al.* 2004a,b). Assim, provavelmente a toxicidade observada nos testes de  $AL_{50}$  pode ter ocorrido devido à acumulação de espécies tóxicas de cobre no intestino. No entanto, testes futuros devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

Os resultados de acumulação de cobre observado para peixes corroboram com relatos prévios, apontando que modelos de saturação de acumulação de cobre são freqüentes em células e tecidos de organismos (Brouwer *et al.* 2002), de modo que inicialmente a acumulação é crescente em função da concentração ou tempo de exposição, até que todos os sítios ativos para a ligação do metal sejam ocupados, a uma determinada concentração específica de cobre acumulado, que varia de acordo com o organismo e tecido estudado. De acordo com Blanchard e Grosell (2005), a estabilização das concentrações

de cobre nas brânquias é um indicativo de controle homeostático. Para peixes, os autores demonstraram que os animais são capazes de utilizar os níveis aumentados de cobre para manter as concentrações necessárias nos tecidos, e assim evitar a toxicidade.

Quando os testes de acumulação de cobre foram realizados com o marisco branco *M. mactroides*, estes também apresentaram uma estabilização dos níveis de cobre branquial e níveis crescentes de cobre hemolinfático ao longo do tempo de exposição ao cobre, quando expostos a NOEC, sugerindo que as brânquias do *M. mactroides* também estão envolvidas com os processos de homeostasia e que podem constituir um importante sítio de toxicidade do cobre nesta espécie (Fig. 3.2.6 e 3.2.7).

Assim como observado para a hemolinfa (Fig. 3.2.6), a cinética de acumulação de cobre na glândula digestiva do marisco branco exposto a NOEC ou a  $CL_{50}$  seguiu um modelo linear de acumulação deste metal (Fig. 3.2.8). Esta resposta pode estar associada ao fato de que a glândula digestiva dos bivalves é o principal órgão envolvido na detoxificação de metais. Neste tecido, as metalotioneínas desempenham um papel fundamental na detoxificação do cobre, seqüestrando este metal, de forma que ele se torna indisponível para se ligar a sítios ativos nas membranas biológicas e exercer sua toxicidade (Gnassia-Barelli *et al.* 1995, Serafim & Bebianno 2001).

Com relação aos resultados observados para o siri-chita *A. cribrarius*, a acumulação nas brânquias continuou crescente em função da concentração de exposição, mostrando que não houve saturação dos sítios de ligação para este metal nas brânquias. Muitos trabalhos vêm demonstrando que o sítio primário

de toxicidade do cobre em crustáceos é a brânquia, e em função da disfunção dos mecanismos de transporte causada pela presença de cobre, os efeitos tóxicos podem ser osmorregulatórios ou respiratórios (Rtal & Truchot 1996, Bianchini *et al.* 2004). Como não houve saturação dos sítios de ligação branquiais, sugere-se que a toxicidade do cobre em crustáceos decápodes não estaria associada a distúrbios osmorregulatórios, mas que outras disfunções branquiais poderiam estar ocorrendo, ou ainda que outros órgãos também poderiam estar envolvidos na toxicidade do cobre no siri-chita *A. cribrarius*.

Os resultados da acumulação sazonal de cobre no siri-chita não foram apresentados na tese em função da ausência desta espécie nos meses de verão no litoral sul do Rio Grande do Sul. No entanto, coletas foram realizadas durante o verão e a acumulação média de cobre nas brânquias foi de  $\sim 180 \mu\text{g Cu/g PS}$ , valores bastante inferiores aos encontrados nos testes de cinética de acumulação deste metal, mesmo para o grupo controle. Em crustáceos, altas concentrações basais de cobre estão relacionadas ao pigmento respiratório hemocianina, que contém cobre em suas moléculas (Rtal & Truchot 1996). Talvez em condições estressantes de laboratório, os organismos tenham aumentado seu metabolismo, necessitando assim de concentrações mais elevadas de hemocianina para realizar as trocas gasosas e a excreção de metabólitos necessários à manutenção da homeostasia, porém estudos futuros são necessários para confirmar esta hipótese.

O aumento na concentração branquial de cobre em experimentos de laboratório também foram reportadas por Lundebye e Depledge (1998), que observaram  $372 \pm 32 \mu\text{g Cu/g PS}$  acumulados nas brânquias do caranguejo

*Carcinus maenas* expostos por seis semanas a 0,6 mg Cu/L, sendo que os indivíduos do grupo controle mostraram concentrações cerca de três vezes menores de cobre ( $130 \pm 37 \mu\text{g Cu/g PS}$ ). Com relação a trabalhos de campo, o decápode *Pachygrapsus marmoratus* coletado na boca do estuário Gironde (França) acumulou 20 e 29  $\mu\text{g Cu/g PU}$  nas brânquias no verão e no inverno, respectivamente (Mouneyrac *et al.* 2001). Considerando o teor branquial de água comum em crustáceos (80%), a acumulação de cobre em *P. marmoratus* seria estimada entre 100 e 145  $\mu\text{g Cu/g PS}$ , valores semelhantes ao observado no presente estudo.

A Figura 3.2.10 apresenta um panorama geral da concentração corporal de cobre nos misídeos *Metamysidopsis elongata atlantica*, bem como nos níveis de cobre acumulado nas brânquias, principal ligante biótico do cobre, em pampos *Trachinotus marginatus*, mariscos *Mesodesma mactroides* e siris *Arenaeus cribrarius*, ao final do experimento de AL<sub>50</sub>. A partir destes dados, observa-se que a acumulação de cobre nas brânquias posteriores de *A. cribrarius* foi, em geral, duas ordens de magnitude maior que a acumulação observada nas brânquias de mariscos e pampos, indicando a presença de um número significativamente maior de sítios de ligação para o cobre nesta espécie. Este fato sugere uma maior habilidade das brânquias de *A. cribrarius* em detoxificar o cobre, o que poderia ser a base da maior tolerância desta espécie ao metal, quando comparada com aquela apresentada pelas demais espécies testadas.

#### 4.2.2. Variações sazonais e espaciais na acumulação de cobre *in situ*

Amostras de água, sedimento ou biota são geralmente utilizadas para o monitoramento da qualidade do ecossistema (Phillips 1980). No presente estudo, a biota foi o compartimento escolhido para a determinação da saúde do ambiente em função dos níveis de cobre bioacumulados, levando-se ainda em consideração a influência da temperatura (estação do ano) sobre a especiação de metais (Grenthe & Plyasunov 1997, Tercier-Waeber *et al.* 2005, Dryden *et al.* 2007) e metabolismo dos organismos (Schmidt-Nielsen 1996).

As concentrações de cobre acumuladas nos misídeos e nas brânquias de peixes e mariscos coletados e processados *in situ* são apresentadas nas Figuras 3.2.11, 3.2.12 e 3.2.14, respectivamente. Pode ser observado que durante os meses de inverno, a acumulação deste metal no ligante biótico destas espécies aumenta nas estações localizadas ao norte da desembocadura do estuário da Lagoa dos Patos, em relação à acumulação no verão nos mesmos pontos amostrais. Por outro lado, durante o verão há uma tendência de aumento da acumulação branquial (ou corporal no caso dos misídeos) nos pontos de coleta III (Molhe Oeste) e IV (Balneário Cassino).

Em função do regime de ventos, da dinâmica e da localização geográfica do estuário da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, é esperado um maior aporte de água continental nos meses de inverno, quando aumenta a pluviosidade e os ventos dos quadrante sul são mais freqüentes, conferindo maior hidrodinâmica à região (Klein 1998). Com o aumento do aporte continental, maiores concentrações de contaminantes atingem as praias

arenosas da região nesta estação (Windom *et al.* 1999), e os organismos que acumulam metais em função de sua concentração no meio poderiam aumentar os níveis de cobre em seus tecidos. No entanto, este grande aumento só foi observado nos pontos amostrais localizados aos norte da desembocadura do estuário da Lagoa dos Patos (I e II), enquanto o esperado seria uma maior concentração de contaminantes também nas demais regiões amostradas, especialmente no Molhe Oeste (ponto III), que localiza-se imediatamente ao sul da desembocadura do estuário, adjacente a ela.

Niencheski *et al.* (2007) demonstraram a existência de aquíferos costeiros altamente permeáveis nas barreiras que separam a lagoa da região costeira e oceânica. Sendo assim, existe um aporte de água subterrânea em direção a linha de costa, que pode transportar nutrientes em quantidades mais elevadas que as próprias descargas fluviais de superfície, especialmente nos meses de inverno. Esta descarga subterrânea foi localizada ao norte da desembocadura do estuário, e poderia justificar o aumento da acumulação de cobre pelos animais coletados nestes pontos, no inverno. Além disso, ventos fortes do quadrante sul predominantes nos meses frios (Garcia 1998) poderiam estar deslocando a água oriunda do estuário no sentido norte, contribuindo para o aumento do aporte superficial de contaminantes na região, durante esta estação.

Estudo realizado por Furley (1993) já havia demonstrado alta concentração de cobre nos tecidos moles do mexilhão *P. perna* amostrados no Molhe Leste, em São José do Norte, independente da estação do ano, de modo que a autora

classificou esta estação como levemente contaminada por diversos metais, incluindo o cobre.

No verão, por outro lado, os maiores níveis de cobre foram encontrados nos organismos coletados nas regiões que sofrem maiores impactos antrópicos. Em misídeos, embora o aumento da acumulação de cobre nestes pontos ainda permaneça dentro da faixa de cobre basal observada no animal, a maior acumulação pode estar relacionada a uma maior concentração de cobre nestes pontos de coleta, apontando novamente que os misídeos acumulam cobre em função da disponibilidade deste metal no ambiente, especialmente nos meses de verão, onde o metabolismo dos animais é maior (Schmidt-Nielsen 1996).

Nestes pontos, a contribuição de esgotos urbanos possivelmente esteja aumentada em função do turismo, levando maiores concentrações de contaminantes para as áreas de maior impacto, através de sangradouros presentes na região. Embora se tenha conhecimento da importância dos esgotos urbanos no aporte de cobre (Kennish 1992, Alloway & Ayres 1993), mais estudos são necessários para confirmar este maior aporte pontual, nos meses de verão.

Trabalhos realizados por Corradi (2002) e Furley (1993) foram comparados e mostraram que a acumulação de cobre nos tecidos moles do mexilhão *P. perna* não diferiu significativamente nos dois estudos (cerca de 6,5 µg/g PS acumulados nos tecidos moles), independente da estação do ano, sugerindo que o grau de contaminação de cobre na região costeira não foi alterado ao longo destes anos. Apesar das concentrações de cobre em tecidos de

moluscos serem altamente variáveis de acordo com a espécie ou mesmo dentro da própria espécie, os resultados do presente estudo, conduzidos com outro bivalve, o marisco branco *M. mactroides*, porém com tamanho similar ao *P. perna*, sugerem que os níveis de contaminação de cobre na região costeira do sul do Rio Grande do Sul possam ter aumentado consideravelmente nestes últimos seis anos, já que os dados de marisco do presente estudo foram obtidos a partir de 2006 e que a acumulação média observada na glândula digestiva dos mariscos foi cerca de 100 µg/g PS. Os resultados do presente estudo estão de acordo com outro estudo de acumulação de cobre realizado em tecidos moles de *M. mactroides* da classe de tamanho entre 40 e 50 mm, na década passada. Este estudo registrou uma acumulação média de  $51,36 \pm 2,26$  µg/g de PS (Fiori & Cazzaniga 1999). Considerando que a glândula digestiva perfaz a maior parte dos tecidos moles em moluscos, os resultados obtidos nos dois estudos são bastante compatíveis.

A comparação da acumulação de cobre nos diferentes tecidos do pampo malhado *T. marginatus*, e do marisco branco *M. mactroides*, no verão e no inverno, são apresentadas nas Figuras 3.2.13 e 3.2.15, respectivamente. Os níveis de cobre foram maiores no fígado dos peixes e na glândula digestiva dos mariscos, independente da estação do ano, indicando que estes tecidos correspondem a importantes órgãos de acumulação de metais no pampo e marisco, respectivamente. Outros estudos vêm demonstrando a importância destes órgãos nos processos de estocagem e detoxificação de metais (Roméo *et al.* 1994, Heath 1995, Roméo & Gnassia-Barelli 1995, Hogstrand & Wood 1996, Géret *et al.* 2002, Blanchard & Grosell 2005, Chowdhury *et al.* 2005).

Sendo assim, estes órgãos podem ser potencialmente utilizados em programas de monitoramento a médio e longo prazo dos níveis de cobre no ambiente.

A alta concentração de cobre encontrada nos tecidos dos animais coletados e processados em campo pode estar relacionada à aclimatação do organismo ao contaminante. Segundo McDonald e Wood (1993), o termo aclimatação tem sido definido como um aumento da tolerância a concentrações letais ou mais elevadas, após a exposição a concentrações subletais. O critério para este tipo de aclimatação seria uma redução na magnitude dos distúrbios fisiológicos, em resposta a um aumento na concentração do contaminante. Deste modo, a alta concentração de cobre nos tecidos de *M. mactroides* pode refletir o aumento na contaminação deste metal no ambiente, que vem sendo registrado para a região (Baugartem & Niencheski 1998).

Ao contrário das demais espécies analisadas, não foi possível realizar a coleta de siri-chitas nos meses de inverno. Anderson *et al.* (1977) relataram que a tolerância mínima de *A. cribrarius* à temperatura é atingida em 11°C. Em amostragens realizadas na mesma região, porém em profundidades maiores, Souza (1998) não observou a presença de siri-chita em nenhum ponto de amostragem com temperatura inferior a 15°C. Estes dados justificam a ausência de indivíduos desta espécie durante as coletas de inverno no presente estudo, de modo que as comparações sazonais na acumulação de cobre nos tecidos de *A. cribrarius* não puderam ser realizadas.

De forma geral, os experimentos de acumulação de cobre nas diferentes espécies testadas no presente estudo foram importantes para identificar os possíveis sítios de toxicidade deste metal, a sua cinética de acumulação, bem

como os níveis de cobre encontrados nos tecidos de animais coletados e processados no ambiente. Além disso, os estudos de campo apontaram o ponto amostral II (Molhe Leste) como o mais contaminado nos meses de inverno, e os pontos III e IV (Molhe Oeste e Balneário Cassino, respectivamente) como os mais contaminados nos meses de verão.

## 5. CONCLUSÕES

- Indivíduos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos apresentam diferentes sensibilidades à exposição ao cobre, sendo que o misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica* foi o mais sensível dentre as espécies testadas, enquanto juvenis do marisco branco *Mesodesma mactroides*, pampo-malhado *Trachinotus marginatus* e siri-chita *Arenaeus cribrarius* demonstraram tolerância à altas concentrações deste metal. Este resultado sugere que o misídeo *M. elongata atlantica* pode ser utilizado como modelo para regulamentação ambiental da emissão de cobre em praias arenosas do extremo Sul do Brasil, em função da sua sensibilidade ao metal;

- O marisco branco *Mesodesma mactroides* é um organismo tolerante ao cobre, apresentando acumulação de cobre na hemolinfa e glândula digestiva diretamente proporcional à concentração de cobre dissolvido no meio, sendo, portanto, indicado como um bom modelo para estudos de biomonitoramento da contaminação de cobre em praias arenosas do extremo Sul do Brasil;

- O fígado e a glândula digestiva são os órgãos de maior acumulação de cobre em pamos *Trachinotus marginatus* e mariscos *M. mactroides*, respectivamente, indicando que estes tecidos são os órgãos de acumulação e detoxificação de cobre nestas espécies;

- As brânquias de pamos *T. marginatus* e mariscos *M. mactroides*, bem como os misídeos íntegros, apresentam uma cinética de saturação da acumulação do cobre em função da concentração do metal dissolvido no meio,

indicando que estes modelos podem ser usados para modelar a biodisponibilidade e toxicidade do cobre em praias arenosas;

- Os animais coletados nos locais com maior atividade antrópica apresentaram maiores níveis de acumulação no ligante biótico durante o verão, enquanto aqueles coletados no inverno apresentaram maiores concentrações de cobre acumulado no ligante biótico nos Molhe Leste, indicando um maior aporte de metal nesta região durante a estação de maior drenagem continental a aporte de água doce na região costeira;

- Em águas costeiras naturais, o maior percentual das espécies de cobre encontra-se complexado ao material orgânico, enquanto em elevadas concentrações experimentais deste metal, as formas tóxicas passam a ser relevantes e causam toxicidade às espécies costeiras de praias arenosas;

- O modelo geoquímico Visual MINTEQ é uma ferramenta mais adequada que o BLM para avaliação da biodisponibilidade e toxicidade do cobre em águas costeiras;

- Espécies sensíveis e tolerantes estão presentes na zona de arrebentação e intermareal de praias arenosas do sul do Brasil, e um modelo de distribuição normal pode ser utilizado para a regulamentação sítio-específica da emissão de cobre.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados do presente estudo apontaram o marisco branco *M. mactroides*, em sua fase juvenil, como um animal bastante tolerante à exposições ao cobre, e com grande capacidade de acumulação deste metal em sua glândula digestiva. Deste modo, esta espécie apresenta todos os requerimentos necessários para ser utilizada como biomonitora da qualidade das águas onde habita. Em virtude do crescente aumento na contaminação de cobre e outras substâncias na região costeira estudada, o monitoramento contínuo desta região torna-se importante, sendo que o marisco branco pode, neste caso, ser utilizado como biomonitor para avaliar a qualidade das águas da zona de arrebentação e de varrido das praias arenosas do extremo Sul do Brasil.

Além disso, o presente estudo apontou espécies sensíveis e tolerantes à elevadas concentrações de cobre no ambiente, de modo que testes de toxicidade em misídeos recém-nascidos da espécie *M. elongata atlantica* devem ser realizados, para que limites de emissão possam ser determinados com base nos estágios de vida mais sensíveis desta espécie. Além disso, estudos realizados com estágios embrionários e larvais de moluscos bivalves vêm demonstrando alta sensibilidade à exposição de cobre no início do desenvolvimento ontogenético deste grupo. Sendo assim, e devido à grande importância da zona de arrebentação de praias arenosas do Sul do Brasil para o marisco branco, e vice-versa, estudos toxicológicos para a determinação da sensibilidade ao cobre de larvas de *M. mactroides* também devem ser

conduzidos, pois estas podem representar outro grupo bastante sensível e adequado para fins de regulamentação ambiental.

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo, encorajam a continuidade deste trabalho, para que as espécies (ou estágios de desenvolvimento) mais sensíveis sejam identificadas, e a partir daí um critério de qualidade de água sítio-específico mais seguro possa ser estabelecido. Estes dados poderão então ser encaminhados para agências competentes para que a regulamentação da emissão de contaminantes em águas da costa gaúcha seja refinada, o que poderia também incentivar pesquisas similares em outras regiões do Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS

Aas E, Baussant T, Balk L, Liwenborg B, Andersen OK, 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 51: 241-258.

ABNT, 2008 – Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT 15308: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com misidáceos, 17pp.

Aldenbergh T, Slob W, 1993. Confident limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25: 48-63.

Alloway BJ, Ayres DC, 1993. Chemical principles of environmental pollution. Chapman & Hall, New York, 291 p.

Al-Mohanna SY, Subrahmanyam MNV, 2001. Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, *Portunus pelagicus* (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War. *Environ. Intern.* 27: 321-326.

Anderson WD Jr., Dias JK, Dias RK, Cupka DM, Chamberlain NA, 1977. The macrofauna of the surf zone of Folly beach. South Carolina NOAA Technical Report, NMFS, SSRF 704: 23 p.

APHA – American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, 1976. Standard methods for

the examination of water and wastewaters. American Public Health Association, Washington, DC, USA.

Arnold WR, Santore RC, Cotsifas JS, 2005. Predicting copper toxicity in estuarine and marine waters using the Biotic Ligand Model. *Mar. Poll. Bull.* 50: 1634-1640.

ASTM, 1997. American Society for Testing and Materials. Standard Guide for conducting acute tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Designation. E: 1192-1197.

Avila MG, Branco JO, 1996. Aspectos bioecológicos de *Arenaeus cribrarius* (Lamarck) (Decapoda, Portunidae) da praia da Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 13: 165-174.

Awosika L, Marone E, 2000. Scientific needs to assess the health of the oceans in coastal areas: a perspective of developing countries. *Ocean Coast. Manag.* 43:781-791.

Badaró-Pedroso C, 1993. Toxicidade crônica de amostras ambientais do canal de São Sebastião e de substâncias puras a *Mysidopsis juniae* (Crustacea:Mysida). Dissertação de Mestrado, USP, SP, 171 p.

Barcarolli IF, 2004. Mecanismos e limiares de toxicidade aguda do cobre no isópodo eurialino *Excirolana armata* Dana, 1852 (Decapoda, Cirolanidae): Implicações para o Modelo do Ligante Biológico. Dissertação de Mestrado. FURG, Rio Grande, Brasil, 71 p.

Baudrimont M, Schäfer J, Marie V, Ma R, 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Tot. Environ.* 337: 265-280.

Baugartem MGZ, Niencheski LF, 1998. Avaliação da qualidade hidroquímica da área portuária da cidade de Rio Grande - RS. Documentos Técnicos 09. Rio Grande, editora da FURG, pp. 5-66.

Beaumont MW, Butler PJ, Taylor EW, 2000. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquat. Toxicol.* 51: 259-272.

Bianchini A, Martins SE, Barcarolli IF, 2004. Mechanism of acute copper toxicity in euryhaline crustaceans: implications for the Biotic Ligand Model. *Int. Cong. Ser.* 1275: 189–195.

Bianchini A, Martins SE, Pedroso MS, Said JS, Spengler A, 2003. Biotic ligand model in fresh and sea water in Brazil. In Lagos GE, Warner AEM, Sánchez M, (Eds.). Health, environment and sustainable development, vol. II. Proceedings of the Copper 2003, The 5th International Conference, Santiago, Chile, pp. 543-552.

Bielmyer GK, Brix KV, Capo TR, Grosell M, 2005. The effects of metals on embryo-larval and adult life stages of the sea urchin, *Diadema antillarum*. *Aquat. Toxicol.* 74: 254-263.

Birdsong CL, Avavit JW, 1971. Toxicity of certain chemicals to juvenile pompano. *Prog. Fish Cult.* 33:76-80.

Blanchard J, Grosell M, 2005. Effects of salinity on copper accumulation in the Common Killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 1403-1413.

Boalch R, Chan S, Taylor T, 1981. Seasonal variation in the trace metal content of *Mytilus edulis*. *Mar. Poll. Bull.* 12: 276-280.

Borgmann U, Norwood WP, Dixon DG, 2004. Re-evaluation of metal bioaccumulation and chronic toxicity in *Hyalella azteca* using saturation curves and the biotic ligand model. *Environ. Poll.* 131: 469-484.

Boyden CR, 1977. Trace element content and body size in mollusks. *Nature* 251: 311.

Brouwer M, Syring R, Brouwer TH, 2002. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* 88: 228-239.

Brown AC, McLachlan A, 1990. *Ecology of sandy shores*. Elsevier, Amsterdam, NL, 328 p.

Bury NR, McGeer JC, Wood CM, 1999. Effects of altering freshwater chemistry on physiological responses of rainbow trout to silver exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:49-55.

Busoli RO, Muelbert JH, 1999. Composição taxonômica e distribuição do ictioplâncton na zona de arrebentação da Praia do Cassino (32°10'S, 52°20'W). *Atlântica* 21: 19-35.

Calliari LJ, Fachin S, 1993. Laguna dos Patos. Influência nos depósitos lamíticos costeiros. *Inst. Geoc. UFRGS* 20: 57-69.

Camp DK, Whiting NH, Martin RE, 1977. Nearshore marine ecology at Hutchinson Island, Florida: 1971-1974. V. Arthropods. *Fl. Mar. Res. Publ.* 25: 1-63.

Catsiki V, Stroglyoudi E, 1999. Survey of metal levels in common fish species from Greek waters. *The Sci. Tot. Environ.* 237/238: 387-400.

Cervignon F, Fischer W, 1979. Catálogo de espécies marinas de interés económico actual o potencial para América Latina, parte 1. Atlantico Centro y suroccidental. FAO, Roma, Itália, 372 p.

Chan HM, 1989. Temporal and spatial fluctuations in trace metal concentrations in transplanted mussels in Hong Kong. *Mar. Poll. Bull.* 20: 82-86.

Chao LN, Pereira LE, Vieira JP, Bemvenuti MA, Cunha LPR. 1982. Relação preliminar dos peixes estuarinos e marinhos da Lagoa dos Patos e região costeira adjacente, Rio Grande do Sul, Brasil. *Atlântica* 5: 56-75.

Cheung SG, Leung TCK, Siu YM, 2002. Effects of heavy metals on the survival and feeding behavior of the sandy shore scavenging gastropod *Nassarius festivus* (Powys). *Mar. Poll. Bull.* 45: 107-113.

Chowdhury MJ, Baldisserotto B, Wood CM, 2005. Tissue specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 381–390.

Clark J.R., 1996. Coastal zone management handbook. Lewis Publisher, Washington, D.C., U.S.A., 694p.

CONAMA, 1986. Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução nº 20, de 30 de julho de 1986, artigos 10, 20, 21. Diário Oficial da União.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, Brasil, 23 p.

Corradi CE, 2002. Avaliação das condições do litoral do Rio Grande do Sul através da bioacumulação de metais pesados por mexilhões e, por cracas e camarões no estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado, FURG, RS, Brasil, 82 p.

Coscarón S, 1959. La almeja amarilla (*Mesodesma (T.) mactroides*, Desahyes) de la costa de la provincia de Buenos Aires. *AGRO Publ. Tec.* 1: 1-66.

Cripe GM, 1994. Comparative acute toxicities of several pesticides and metals to *Mysidopsis bahia* and postlarval *Penaeus duorarum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1867-1872.

Cross SA, Sunda WG, 1982. The relationship between chemical speciation and bioavailability of trace metals to marine organisms: a review. *In: Proceedings of*

International Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems: Planning, Pollution and Productivity. FURG, Rio Grande, Brazil, pp. 169-182.

Cunha LPR, 1981. Variação sazonal da distribuição, abundância e diversidade dos peixes na zona de arrebentação da Praia do Cassino, RS, Brasil. Dissertação de Mestrado, UFRJ, RJ, 47 p.

Cunha LPR, 1987. Importância da zona de arrebentação de praias para o desenvolvimento de juvenis de *Trachinotus* (Pisces, Carangidae): aspectos da bioecologia e distribuição geográfica do gênero, com ênfase às espécies que ocorrem no litoral sul/sudeste do Brasil e no Atlântico Ocidental. Tese de Doutorado, USP, SP, 147p.

Dave G, 1986. Toxicity testing procedures. In: Nilsson S, Holmgren S (Eds.). Fish physiology: recent advances. Croom Helm Publishers, London, UK, pp. 170-195.

De Boeck G, Hattink J, Franklin NM, Bucking CP, Wood S, Walsh PJ, Wood CM, 2007. Copper toxicity in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*): Urea loss contributes to the osmoregulatory disturbance. *Aquat. Toxicol.* 84: 133-141.

De Castellanos ZJA, 1970. Catalogo de los moluscos marinos bonarenses. *Anales Com. Invest. Cient. Prov. Buenos Aires* 8, Argentina, 365 p.

De Schampelaere KAC, Heijerick DG, Janssen CR, 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: 243-258.

Defeo O, 1985. Aspectos biocenologicos e dinámica de da población de “Almeja amarilla”, *Mesodesma mactroides* (Desahyes, 1854) en La zona de la Barra Del Chuy, Depto. De Roca, Uruguay. II. Dinamica de la población. Contr. Depto. Oceanog. 2: 76-98.

Defeo O, 1996. Recruitment variability in sandy beach macroinfauna: much to learn yet. Rev. Chil. Hist. Nat. 69: 615-630.

Defeo O, Ortiz E, Castilla JC, 1992. Growth, mortality and recruitment of the yellow clam *Mesodesma mactroides* on Uruguayan beaches. Mar. Biol. 114: 429-437.

Defeo O, Scarabino V, 1990. Ecological significance of a possible deposit-feeding strategy in *Mesodesma mactroides* (Desahyes 1854) (Mollusca:Pelecypoda). Atlântica 12:55-65.

Delistraty D, 2000. Acute toxicity to rats and trout with focus on inhalation and aquatic exposures. Ecotoxicol. Environ. Saf 46: 225-233.

Di Toro DM, Allen HE, Bergmann HL, Meyer JS, Santore RC, Paquin P, 2000. The Biotic Ligand Model: A computational approach for assessing the ecological effects of copper and other metals in aquatic systems. International Copper Association, Ltd., New York. 106 p. + appendices.

Domingues PM, Turke PE, Andrade JP, Lee PG, 1998. Pilot-scale production of mysid shrimp in a static water system. Aquacult. Intern. 6: 387-402.

Dryden CL, Gordon AS, Donat JR, 2007. Seasonal survey of copper-complexing ligands and thiol compounds in a heavily utilized, urban estuary: Elizabeth River, Virginia. *Mar. Chem.* 103:276-288.

Evans RE, Brown ST, Hara TJ, 1988. The effects of aluminum and acid on the gill morphology of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Biol. Fishes* 22: 299-311.

Figueiredo JL, 1981. Estudo das distribuições endêmicas de peixes da província zoogeográfica marinha argentina. Tese de Doutorado, USP, SP, 121 pp.

Finney DJ, 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 333 p.

Fiori SM, Cazzaniga NJ, 1999. Mass mortality of the yellow clam, *Mesodesma mactroides* (Bivalvia:Maत्रracea) in Monte Hermoso beach, Argentina. *Biol. Cons.* 89: 305-309.

Flammarion P, Devaux A, Nehls S, Migeon B, Noury P, Garric J, 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51: 145-153.

Förstner U, Whittmann GTW, 1979. *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer-Verlag, Berlin, GE, 486 p.

Franco BC, Muelbert JH, 2003. Distribuição e composição do ictioplâncton na quebra de plataforma do sul do Brasil. *Atlântica* 25: 75-86.

Fransozo A, Negreiros-Fransozo ML, Mantelatto FLM, Pinheiro MAA, Santos S, 1992. Composição e distribuição dos Brachyura (Crustacea, Decapoda) do sublitoral não consolidado na Enseada da Fortaleza, Ubatuba, SP. Rev. Bras. Biol. 52: 667-675.

Furia RR, 2005. Efeitos da fração solúvel, em água do mar, do petróleo e do diesel sobre a morfologia das brânquias de *Trachinotus sp.* (Perciformes: Carangidae). Tese de Doutorado, USP, SP, 135p.

Furley TH, 1993. Utilização do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) como bioindicador dos metais pesados cádmio, chumbo, zinco, cobre e manganês no litoral do Rio Grande do Sul (Brasil). Dissertação de Mestrado. FURG, RS, Brasil, 131 p.

Gama AMS, Montú MA, Gusmão LFM, 2002. Ciclo de vida pós-marsupial e crescimento de *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea, Mysidacea, Mysidae) em cultivo de laboratório. Iheringia 92: 77-83.

Gama MAS, Zamboni AJ, 1999. Aspectos da biologia e do cultivo de *Metamysidopsis elongata atlantica* para uso em testes de toxicidade. Nauplius 7: 127-139.

Garcia CAE, 1998. Ambientes costeiros e marinhos e sua biota: Oceanografia Física. In: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 104-107.

Garcia VMT, Gianuca NM, 1998. Relações e funcionamento dos ambientes costeiro e marinho: A praia e a zona de arrebentação. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 184-189.

Garnacho E, Peck LS, Tyler PA, 2000. Variations between winter and summer in the toxicity of copper to a population of the mysid *Praunus flexuosus*. *Mar. Biol.* 137: 631-636.

Géret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP, 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Liv. Res.* 15: 61-66.

Gianuca NM, 1983. A preliminary account of the ecology of sandy beaches in southern Brazil. *In*: McLachlan A, Erasmus T (Eds.). Sandy beaches as ecosystems. Dr. W. Junk Publishers, Hague, NL, pp. 413-419.

Gianuca NM, 1985. The ecology of a sandy beach in southern Brazil. Tese de Doutorado, University of Southampton, USA, 330 p.

Gianuca NM, 1987. Zonação e produção nas praias arenosas do litoral sul e sudeste do Brasil: síntese dos conhecimentos. *In*: Simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira. Publ. ACIESP 54: 313-332.

Gnassia-Barelli M, Roméo M, Puiseux-Dao S, 1995. Effects of cadmium and copper contamination on calcium content of the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ, Res.* 39: 325-328.

Greco LSL, Sánchez MV, Nicoloso GL, Medesani DA, Rpdrigues EM, 2001. Toxicity of cadmium and copper on larval and juvenile stages of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 333-338.

Grenthe I, Plyasunov A, 1997. On the use of semiempirical electrolyte theories for the modeling of solution chemical data. Pure & App/. Chern. 69: 951-958.

Grenthe I, Plyasunov A, Spahiu K, 1997. Estimations of medium effects on thermodynamic data. In: Grenthe I, Puigdomenech I (Eds.). Modelling in aquatic chemistry, OECD Nuclear Energy Agency, pp. 325-426.

Grosell M, Blanchard J, Brix KV, Gerdes R, 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. Aquat. Toxicol. 84: 162-172.

Grosell M, McDonald MD, Walsh PJ, Wood CM, 2004a. Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) I: Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste products. Aquat. Toxicol. 68: 249-262.

Grosell M, McDonald MD, Walsh PJ, Wood CM, 2004b. Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues. Aquat. Toxicol. 68: 263-275.

Grosell M, Nielsen C, Bianchini A, 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. Comp. Biochem. Physiol. 133C: 287-303.

Grosell M, Wood CM, 2002. Copper uptake accross rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. J. Exp. Biol. 205: 1179-1188.

Grosell M, Wood CM; 2001. Bronchial vs. intestinal silver uptake in the marine teleost *Parophrys vetulus*. J. Comp. Physiol. 171B: 585-594.

Gusmão LFM, Gama MAS, Montú MA, 1999. Variação sazonal dos comprimentos médios e biomassa de populações de *Metamysidopsis elongata* (CRUSTACEA: MYSIDACEA) da zona de arrebentação da praia do Cassino (RS – Brasil). In: XII Semana Nacional de Oceanografia, Rio de Janeiro, RJ. Resumos Expandidos, pp. 165-167.

Haaparanta A, Valtonen ET, Hoffman RW, 1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. J. Fish Biol. 50:575-591.

Haimovici M, Habiaga RP, 1982. Rejeição a bordo na pesca de arrasto de fundo no litoral do Rio Grande do Sul num cruzeiro de primavera. Doc. Tec. Oceanog., FURG, RS, 2: 1-14.

Hall LW, Anderson RD, 1999. A Deterministic Ecological Risk Assessment for Copper in European Saltwater Environments. Mar. Poll. Bull. 38: 207-218.

Hartmann C, 1988. Utilização de dados digitais do mapeador temático para obtenção dos padrões de distribuição do material em suspensão na desembocadura da Laguna dos Patos, RS. Dissertação de Mestrado, INPE/SJC/SP, Brasil, 190 p.

Heath AG, 1995. Water pollution and fish physiology. Lewis Publishers, CRC Press, Florida, USA, 359 pp.

Hines AH, 1989. Geographic variation in size maturity in brachyuran crabs. *Bull. Mar. Sci.* 45: 356-368.

Hirose K, 2007. Metal–organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Appl. Geochem.* 22: 1636-1645.

Hogstrand C, Wood CM, 1996. The physiology and toxicology of zinc in fish. *In*: Taylor EW (Ed.), *Toxicology and aquatic pollution: Physiological, cellular and molecular approaches*. Cambridge University Press, London, UK, pp. 61–84.

Howells G, 1976. Introduction. *In*: Lockwood APM (Ed.). *Effects of pollutants on aquatic organisms*. Society for Experimental Biology Seminar Series, Cambridge University Press, U.K., pp. 1-6.

Juanicó M, 1978. Ampliación de La distribución geográfica de tres especies de *Brachyura* (Crustacea:Decapoda) para las aguas uruguayas. *Iheringia* 51: 45-56.

Kennish MJ, 1992. *Ecology of estuaries: Anthropogenic effects*. CRC Press, Boca Raton, FL, 494 p.

Klein AHF, 1998. Clima Regional. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). *Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil*. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 5-7.

Kooijman SALM, 1987. A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Res.* 21: 269-276.

Kumaraguru AK, Ramamoorthi K, 1978. Toxicity of copper to three estuarine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 1: 43-48.

Kwok KWH, Leung KMY, Bao VWW, Lee JS, 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Mar. Poll. Bull.* 57: 632-636.

La Breche TMC, Dietrich AM, Gallagher DL, Sheperd N, 2002. Copper toxicity to larval *Mercenaria mercenaria* (Hard clam). *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 760-766.

Lana GMT, 2005. Comparação do uso de duas redes de arrasto de praia e descrição das variações de curto prazo da assembléia de peixes na zona de arrebentação da praia do Cassino, Rio Grande – RS. Dissertação de Mestrado, FURG, Rio Grande, Brasil, 71p.

Larsen BK, Portner HO, Jensen FB, 1997. Extra- and intra-cellular acid-base balance and ionic regulation in cod (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. *Mar. Biol.* 128: 337-346.

Lasiak TA, 1981. Nursery grounds of juveniles teleosts: evidence from the surf zone of Kings Beach, Port Elizabeth. *S. Afr. J. Sci.* 77: 388-390.

Leber KM, 1982. Seasonality of macroinvertebrates on a temperate, high wave energy sandy beach. *Bull. Mar. Sci.* 32: 86-98.

Libes SM, 1992. An introduction to Marine Biogeochemistry. John Wiley and Sons, NY, U.S.A., 734 p.

Lundebye AK, Depledge MH, 1998. Molecular and Physiological responses in Shore Crabs *Carcinus maenas* following exposure to copper. Mar. Environ. Res. 46: 567-572.

Lussier SM, Gentile JH, Walker J. 1985. Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (Crustacea: Mysidacea). Aquat. Toxicol. 7: 25-35.

Lussier SM, Khun A, Chammas MJ, Sewall L, 1988. Techniques for the laboratory culture of *Mysidopsis* species. Environ. Toxicol. Chem. 7: 969-977.

Ma H, Allen HE, Yin Y, 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. Water Res. 35: 985-996.

MacInnes JR, Calabrese A, 1978. Response of embryos of the American oyster, *Crassostrea virginica*, to heavy metals at different temperatures. In: McLusky DS, Berry AJ (Eds.). Physiology and behavior of marine organisms. Pergamon Press, New York, NY. pp. 195-202.

Marins LF, Levy JA, 2000. Análise do fluxo gênico de *Mesodesma mactroides* Deshayes, 1854 (Bivalvia, Mesodesmatidae) na zona costeira adjacente à saída do estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande – RS). Atlântica 22: 13-26.

Martin M, Osborn KE, Bilig P, Glickstein N, 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Mar. Poll. Bull. 12: 305-308.

Masello A, Defeo O, 1986. Determinación de la longitud de primera madurez sexual en *Mesodesma mactroides* (Desahyes, 1854). Com. Soc. Malac. Uruguay 6: 387-392.

Masello A, Defeo O, 1986. Determinación de la longitud de primera madurez sexual en *Mesodesma mactroides* (Deshayes, 1854). Common. Soc. Malcolm. Uruguay 6: 387-392.

Mauchline J, 1980. The biology of mystics and eufasiids. In: Blaxter J, Russel F, Yonge M (Eds). Advances in Marine Biology 18, Academic Press, London, UK, 681p.

McDonald DG, Wood CM, 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin JC, Jensen FD (Eds). Fish ecophysiology. Chapman & Hall, London, UK, pp. 295-319.

McLachlan A, 1980. The definition of Sandy beaches in relation to exposure: a simple rating system. S. Afric. J. Sci. 76: 137-138.

McLachlan A, 1983. Sandy beach ecology: a review. In: McLachlan A, Erasmus T (Eds.). Sandy beaches as ecosystems. Dr. W. Junk Publishers, Hague, NL, pp. 321-380.

Menezes NA, Figueiredo JL, 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: IV. Teleostei (3). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 96 p.

Modde T, Ross ST, 1981. Seasonality of fishes occupying a surf zone habitat in the northern Gulf of Mexico. Fish Bull. 78: 911-922.

Monteiro-Neto C, 1983. Hábito alimentar de juvenis de *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) na zona de arrebentação da praia do Cassino, RS, Brasil. In: Resumo do X Congresso Brasileiro de Zoologia, pp. 264-265.

Monteiro-Neto C, Cunha LPR, 1990. Seasonal and ontogenetic variation in food habits of juvenile *Trachinotus marginatus* Cuvier, 1832 (Teleostei, Carangidae) in the surf zone of Cassino Beach, RS, Brazil. Atlântica 12: 45-54.

Monteiro-Neto C, Cunha LPR, Musick J, 2000. Community structure of surf zone fishes at Cassino (32°S), Rio Grande do Sul, Brazil. Simpósio Brasileiro sobre praias arenosas. UNIVALI, Itajaí,SC, p. 367.

Montú M, Gloeden IM, Duarte AK, Resgalla Jr. C, 1998. Ambientes costeiros e marinhos e sua biota: Zooplâncton. In: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 123-127.

Morgan IJ, Henry RP, Wood CM, 1997. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> transport. Aquat Toxicol 38:145–163.

Mouneyrac C, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Rainbow PS, 2001. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. *Comp. Biochem. Physiol.* 129C: 193-209.

Narchi W, 1981. Aspects of the adaptative morphology of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Malcolm.* 21: 95-110.

Neves LP, Silva PSR, Bemvenuti CE, 2007. Zonation of benthic macrofauna on Cassino beach, Southernmost Brazil. *Brazil. J. Ocean.* 55: 293-307.

Neves LP, Silva PSR, Bemvenuti CE, 2008. Temporal variability of benthic macrofauna on Cassino beach, southernmost Brazil. *Iheringia Ser. Zool.* 98: 36-44.

Newman MC, Ownby DR, Mézin LCA, Powell DC, Christensen TRL, Lerberg SB, Anderson BA, 2000. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient number of species. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 508-515.

Niencheski LFH, Fillmann G, 1998. Ambientes costeiros e marinhos e sua biota: Características Químicas. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). *Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil.* Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 107-109.

Niencheski LFH, Windom HL, Moore WS, Jahnke RA, 2007. Submarine groundwater discharge of nutrients to the ocean along a coastal lagoon barrier, Southern Brazil. *Mar. Chem.* 106: 546-561.

Nimmo DR, Hamaker TL, 1982. Mysids in toxicity testing – a review. *Hydrobiol.* 93: 171-178.

Nipper MG, Badaró-Pedroso C, Jose VF, Melo SLR, 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Mysids and copepods. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 99-106.

Olivier S, Capezzani D, Carreto J, Christiansen H, Moreno V, De Moreno JA, Penchaszadeh P, 1971. Estructura de La comunidad, dinámica de La población y biología de La almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) en Mar Azul. *Proy. Desrr. Pesq. FAO, Ser. Inf. Tecn. Public.* 27: 1-90.

Pais I, Jones Jr JB, 1997. *The Handbook of trace elements.* St. Lucie Press, Florida. 223 p.

Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL, Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM, Wu KB, 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C: 3–35.

Pavicic J, Skreblin M, Raspor B, 1987. Metal pollution assessment of the marine environment by determination of metal-binding proteins in *Mytilus sp.* *Mar. Chem.* 22, 235-248.

Pedroso MS, Pinho GLL, Rodrigues SC, Bianchini A, 2007. Mechanism of acute silver toxicity in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*. *Aquat. Toxicol.* 82: 173-180.

Pereira LE, Ramos LA, Pontes SX, 1998. Lista comentada dos peixes e crustáceos decápodos do estuário do arroio Chuí e região costeira adjacente, RS. *Atlântica* 20: 165-172.

Phillips DJH, 1980. Quantitative Aquatic Biological Indicators. *In*: Mellanby K (Ed.), England Applied Science Publishers, U.K., 488 p.

Pinheiro MAA, Fransozo A, 1999. Reproductive behavior of the swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Crustacea, Brachyura, Portunidae) in captivity. *Bull. Mar. Sci.* 64: 243-253.

Pinheiro MAA, Fransozo A, Negreiros-Fransozo ML, 1997. Dimensionamento e sobreposição de nichos dos portunídeos (Decapoda, Brachyura), na enseada da Fortaleza, Ubatuba, São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 14: 371-378.

Pinheiro MAA, Terceiro OSL, 2000. Fecundity and reproductive output of the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) (Brachyura, Portunidae). *Crustaceana* 73: 1121-1137.

Pinho GLL, Pedroso MS, Rodrigues SC, Souza SS, Bianchini A, 2007. Physiological effects of copper in the euryhaline copepod *Acartia tonsa*: Waterborne versus waterborne plus dietborne exposure. *Aquat. Toxicol.* 84: 62-70.

Ramos LA, Vieira JP, 2001. Composição específica e abundância de peixes de zonas rasas dos cinco estuários do Rio Grande do Sul, Brasil. *B. Inst. Pesca* 27: 109-121.

Rodrigues SC, 2007. Influência da matéria orgânica dissolvida na toxicidade aguda e acumulação do cobre no copépode eurialino *Acartia tonsa*: Implicações para o Modelo do Ligante Biótico. Dissertação de Mestrado, FURG, RS, Brasil. 100pp.

Romeo M, Gnassia-Barelli M, 1995. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper, or zinc. *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 457-463.

Roméo M, Mathieu A, Gnassia-Barelli M, Romana A, Lafaurie M, 1994. Heavy metal content and biotransformation enzymes in two fish species from the NW Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 107:15-22.

Rtal A, Truchot Jp, 1996. Haemolymph transport and tissue accumulation of exogenous copper in the Shore Crab, *Carcinus maenas*. *Mar. Poll. Bull.* 32: 802-811.

SAIC, 1993. Toxicity testing to support the New York/New Jersey Harbor site-specific copper criteria study. Final Report to U.S. EPA (68-C8-0066).

Santore RC, Di Toro DM, Paquin PR, Allen HE, Meyer JS, 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ Toxicol Chem.* 20: 2397-2402.

Santos MHS, Cunha NT, Bianchini A, 2000. Effects of copper and zinc on growth, feeding and oxygen consumption of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae (Decapoda: Penaeidae). *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247: 233-242.

Saroglia MG, Scarano G, 1979. Influence of moulting on the sensitivity to toxics of the crustacean *Penaeus kerathurus* (Forskal). *Ecotoxicol. Environ. Sat.* 3: 310-320.

Schmidt-Nielsen K, 1996. *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*. Santos Editora, São Paulo, SP, 600 p.

Seeliger U, Knak RB, 1982a. Estuarine metal monitoring in Southern Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 13: 197-206.

Seeliger U, Knak RB, 1982b. Origin and concentration of copper and mercury in water and biota of the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Atlântica* 5: 35-42.

Seeliger U, Odebrecht C, 1998. Introdução e aspectos gerais. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). *Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil*. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 1-3.

Serafim MA, Bebianno MJ, 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 544-552.

Short AD, Wright LD, 1983. Physical variability of Sandy beaches. *In*: McLachlan A, Erasmus T (Eds.). *Sandy Beaches as Ecosystems*. Dr. Junk, The Hague, NL, pp. 133-144.

Söhnel O, Novotný P, 1985. Densities of aqueous solutions of inorganic substances. *Physical Sciences Data* 22, Elsevier, Amsterdam, NL.

Souza JAF, 1998. Agrupamentos de Brachyura relacionados com período nictemeral, sazonalidade, profundidade, temperatura e salinidade (31°30'S – 30°00'S, Rio Grande do Sul, Brasil). *Nauplius* 6: 139-153.

Steele CW, 1983a. Comparison of the behavioral and acute toxicity of copper to Sheepshead, Atlantic croaker and Pinfish. *Mar. Poll. Bull.* 14: 425-428.

Steele CW, 1983b. Acute toxicity of copper to Sea Catfish. *Mar. Poll. Bull.* 14: 168-170.

Swart DH, 1983. Physical aspects of sandy beaches: a review. In: McLachlan A, Erasmus T (Eds.). *Sandy beaches as ecosystems*. Dr. W. Junk Publishers, Hague, NL, pp. 5-44.

Tercier-Waeber ML, Confalonieri F, Riccardi G, Sina A, Noël S, Buffle J, Graziottin, 2005. Multi Physical–Chemical profiler for real-time in situ monitoring of trace metal speciation and master variables: Development, validation and field applications. *Mar. Chem.* 97:216-235.

USEPA, 1986. Quality criteria for water. EPA 440/5-86-001. U.S. Environmental protection agency, Washington, D.C.

USEPA, 2003. 2003 Draft update of ambient water quality criteria for copper. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 86 p.+appendices.

Vieira EF, 1984. Rio Grande do Sul: geografia física e vegetação. Sagra, Porto Alegre, RS, Brasil, 183 p.

Vieira JP, Castello JP, Pereira LE, 1998. O Ambiente e a Biota do Estuário da Lagoa dos Patos: Ictiofauna. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 60-68.

Vooren CM, 1998. Ambientes costeiros e marinhos e sua biota: Aves marinhas e costeiras. *In*: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP (Eds). Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia, Rio Grande, RS, pp. 170-176.

Wagner C, Løkke H, 1991. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data. *Water Res.* 25:1237-1242.

White SL, Rainbow PS, 1984. Regulation of Zn concentration by *Palaemon elegans*: zinc flux and effects of temperature, Zn concentration and moulting. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16: 145-147.

Willcock JA, 1987. Processos costeiros e a formação das praias arenosas e campos de dunas ao longo da costa sul e sudeste brasileira. *In*: Simpósio sobre ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira. Publ. ACIESP 54: 380-398.

Windom HL, Niencheski LFH, Smith Jr RG, 1999. Biogeochemistry of Nutrients and Trace Metals in the Estuarine Region of the Patos Lagoon (Brazil). *Est. Coast. Shelf Sci.* 48: 113-123.

Wood CM, 2001. Toxic responses of the Gill. *In*: Schlenck D, Benson WH (Eds.). Target organs toxicity in marine and freshwater teleosts, vol. I. Taylor & Francis, London, U.K., pp. 1-89.

Wood CM, Playle R, Hogstrand C, 1999. Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 71-83.

Zamboni A, Devilla RA, Gama AMS, Asp NE, Omachi CY, Pinheiro FMR, Salomon PS, Vanz A, 1996. Efeito da temperatura na toxicidade aguda de cobre e zinco sobre diferentes estágios de vida de *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea: Mysidacea). Anais do III Simpósio sobre Oceanografia, IOUSP, SP, Brasil, p. 284.

Zamboni AJ, 2000. Caracterização ecotoxicológica do estuário da Lagoa dos Patos no entorno de Rio Grande, RS: fundamentos e técnicas. Tese de Doutorado. USP - São Carlos, Brasil. 185p.

Zia S, McDonald DG, 1994. Role of the gills and gill chloride cells in metal uptake in the freshwater adapted rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51:2482-2492.