

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

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS FÍSICO-
QUÍMICOS NA ACUMULAÇÃO E MECANISMO
DE TOXICIDADE DO COBRE NO ISÓPODO
*Excirolana armata.***

INDIANARA FERNANDA BARCAROLLI

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

Agosto, 2009.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elcio e Laurita, por todo amor, incentivo e apoio ao longo da minha vida. Por respeitarem e apoiarem todas as minhas decisões. Amo muito vocês, muito obrigada por vocês serem as pessoas maravilhosas que são. Perto de vocês a vida fica mais colorida.

Ao meu irmão, Elcio Filho, por ser simplesmente a pessoa maravilhosa que é e por me fazer rir sempre. Obrigado também por resolver, mesmo a distância meus problemas com computador. Você me faz muita falta, nesta terra tão distante. Te amo muito.

Ao Gui, meu grande amor e amigo, que me fez ver a vida com outros olhos. Ao teu lado tudo é muito intenso e verdadeiro. Obrigado por me manter com os pés no chão e por me mostrar que diante das dificuldades não dá pra chorar e sim mostrar mais garra e determinação pra fazer dar certo e alcançar o objetivo.

Ao Adalto, pela orientação e amizade ao longo desses 7 anos de convivência. Por confiar a mim este trabalho, pelo incentivo e pela valiosa contribuição ao longo deste trabalho, muito obrigado.

Ao Bemvenuti, D'Incao e Niencheski, por aceitarem fazer parte da banca, pela amizade e também por todo aprendizado ao longo das disciplinas por vocês ministradas.

Ao Zé Monserrat por aceitar fazer parte da banca, e pelas contribuições.

A Marrrrrta, não só por aceitar fazer parte da banca, mas pela amizade e carinho ao longo de 11 anos de convivência. Pelos pitacos e contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho e por incentivar as reuniões de terça, que são fundamentais a todos do grupo.

A todos os professores do ICB, especialmente, Gilma, Carlinha, Elton, Euclides e Carioca, pelas contribuições e pelos bons momentos vividos.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Giba e ao seu João (taxista) por estarem sempre dispostos a ajudar nas coletas, seja em dias de sol ou de chuva, no calor ou no frio.

A todos meus queridos amigos, Samy, Camila, Kiti, Ju, Nino, Sandrinha, Biba, Lygia, Mari, Mari loira, Rafa Cederón, Flávio, Lilian, Cléverson, Rony, Roberta, Grasi, Duane. Muito obrigada por todos os momentos divertidos que passamos juntos. Sem vcs a vida não teria a menor graça.

Aos animais.

A DEUS TODO PODEROSO, pela minha vida e pela luz e força ao longo do caminho percorrido.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Parâmetros físico-químicos dos meios experimentais utilizadas nos testes com o isópodo <i>Excirrolana armata</i> . Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão. O.D.: oxigênio dissolvido; C.O.D.: carbono orgânico dissolvido.....	61
Figura 1- Espécime de <i>Excirrolana armata</i> Dana (1852).....	23
Figura 2- Esquema da estrutura branquial de teleósteos dulciaquícolas. Os sinais + e – indicam o gradiente eletroquímico. A presença de cobre altera os principais processos envolvidos na regulação iônica. Extraído de Grosell <i>et al.</i> (2002)	32
Figura 3- Local de coleta dos isópodos, Praia do Mar Grosso (São José do Norte-RS)	39
Figura 4- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C quando a concentração letal de cobre para 50% dos indivíduos testados (CL ₅₀ -48h) na respectiva salinidade foi adicionada ao meio experimental. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre considerando-se os respectivos intervalos de confiança de 95% das CL ₅₀ -48h. Letras diferentes indicam diferença entre as salinidades	62
Figura 5- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 10°C quando a concentração letal de cobre para 50% dos indivíduos testados (CL ₅₀ -48h) na respectiva salinidade foi adicionada ao meio experimental. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre considerando-se os respectivos intervalos de confiança de 95% das CL ₅₀ -48h. Letras diferentes indicam diferença entre as salinidades	63
Figura 6- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de 0,658 mg Cu/L, a qual corresponde à CL ₅₀ -48h na salinidade 3. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre, considerando-se os respectivos intervalos de confiança de 95% das CL ₅₀ -48h. Letras diferentes indicam diferença entre as salinidades	64
Figura 7- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida e de 0,658 mg Cu/L, a qual corresponde à CL ₅₀ -48 h na salinidade 3. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre, considerando-se o respectivo intervalo de confiança de 95% da CL ₅₀ -48 h. Para todas as espécies de cobre, não houve diferença significativa entre as concentrações de matéria orgânica dissolvida.....	65
Figura 8- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida e de 9,46 mg Cu/L, a qual corresponde à CL ₅₀ -48 h na salinidade 6. Para todas as espécies de	

cobre, não houve diferença significativa entre as concentrações de matéria orgânica dissolvida66

Figura 9- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida e de 9,54 mg Cu/L, a qual corresponde à CL₅₀-48 h na salinidade 15. Para todas as espécies de cobre, não houve diferença significativa entre as concentrações de matéria orgânica dissolvida67

Figura 10- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) às CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20° C. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle (P< 0,05). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades para os isópodos expostos ao cobre68

Figura 11- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) às CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 10°C. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle (P< 0,05). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades para os isópodos expostos ao cobre69

Figura 12- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) às CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades e temperaturas. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. * indica diferença significativa quando comparados os tratamentos com cobre nas diferentes temperaturas para a mesma salinidade (P< 0,05)70

Figura 13- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) a 0,658 mg Cu dissolvido/L (CL₅₀-48h da salinidade 3) em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam à diferença significativa entre os controles. Letras maiúsculas diferentes indicam à diferença significativa entre os tratamentos com cobre. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle (P< 0,05)71

Figura 14- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) a 0,658 mg Cu dissolvido/L, que corresponde a CL₅₀-48h na salinidade 3 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 3 a 20°C. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (P< 0,05). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L72

Figura 15- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) a 9,46 mg Cu dissolvido/L que corresponde a CL₅₀-48h na salinidade 6 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 6 a 20°C.

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.....73

Figura 16- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) a 9,54 mg Cu dissolvido/L, que corresponde a CL₅₀-48h na salinidade 15 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 15 a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.....74

Figura 17- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) a 11,79 mg Cu dissolvido/L, que corresponde a CL₅₀-48h na salinidade 30 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 30 a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam à diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.....75

Figura 18- Atividade lamelar da Na⁺,K⁺-ATPase do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) as CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.....76

Figura 19- Atividade lamelar da anidrase carbônica do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) as CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.....77

Figura 20- Concentração de sódio nas lamelas do isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) às CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.....78

Figura 21- Consumo corporal de oxigênio no isópodo eurialino *Exciorolana armata* exposto (48h) as CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidade.....79

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Contaminação ambiental pelo cobre.	13
1.2. Praias arenosas.....	18
1.3. Modelo biológico.....	22
1.4. Influência de parâmetros ambientais na toxicidade de metais.....	24
1.5. Mecanismos de toxicidade do cobre.....	29
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Coleta e Aclimação	37
3.2 Procedimentos gerais	39
3.3 Experimentos de acumulação de cobre	42
3.2.1. Influência da salinidade	42
3.2.2. Influência da matéria orgânica dissolvida (MOD)	42
3.2.3. Influência da temperatura	43
3.4. Análise da concentração de cobre.....	44
3.5. Determinação dos efeitos tóxicos do cobre	45
3.5.1. Atividade lamelar da Na^+ , K^+ - ATPase.....	45
3.5.2. Atividade da anidrase carbônica.....	47
3.5.3. Concentração lamelar de sódio	48
3.5.4 Consumo corporal de oxigênio	49
3.6. Análise dos parâmetros químicos dos meio	50
3.6.1. Concentração de cobre	50
3.6.2. Composição iônica dos meios experimentais	50
3.6.3. Alcalinidade total	51
3.6.4 Concentração de sulfato	52

3.6.5. Concentração de carbono orgânico dissolvido (COD)	52
3.7. Tratamento estatístico dos dados	52
4. RESULTADOS	54
4.1. Parâmetros físico-químicos dos meios experimentais.....	54
4.2. Acumulação lamelar de cobre	56
4.2.1. Efeito do cobre.....	56
4.2.2. Efeito da salinidade	56
4.2.3. Efeito da temperatura	57
4.2.4 Efeito da matéria orgânica	58
4.3. Efeitos tóxicos do cobre	59
4.3.1. Atividade da Na ⁺ , K ⁺ - ATPase lamelar.....	59
4.3.2. Atividade da anidrase carbônica lamelar	59
4.3.3. Concentração de sódio	60
4.3.4 Consumo corporal de oxigênio	60
5. DISCUSSÃO	80
5.1. Especificação do cobre.	80
5.2. Acumulação do cobre.	86
5.3. Mecanismo de toxicidade do cobre.	90
6. CONCLUSÕES	101
7. PERSPECTIVAS	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMO

O cobre é um elemento presente em ambientes aquáticos, sendo requerido pelos organismos para uma série de funções fisiológicas. Entretanto, em elevadas concentrações no ambiente este metal pode ser considerado tóxico, causando danos em estruturas celulares e moleculares. O presente estudo teve como objetivo verificar a influência da salinidade, da temperatura e da matéria orgânica dissolvida (MOD) na especiação do cobre no meio aquático, bem como na acumulação deste metal nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata*. Além disso, foram avaliados os efeitos tóxicos do cobre em diferentes parâmetros bioquímicos e fisiológicos (atividades da Na^+, K^+ -ATPase e anidrase carbônica lamelar, concentração lamelar de sódio e consumo corporal de oxigênio), em uma ampla faixa de salinidade. Para tanto, isópodos foram coletados na praia do Mar Grosso (São José do Norte, RS), e aclimatados em diferentes salinidades (3, 6, 15 e 30). Os testes foram geralmente realizados utilizando-se as CL_{50} -48h de cobre descritas para cada salinidade, em duas temperaturas (10 e 20°C) ou em diferentes concentrações de MOD (1,0; 2,5 e 5,0 mg C/L) a 20°C. Após 48 h de exposição, o consumo corporal de oxigênio foi medido e as lamelas dos isópodos foram dissecadas para determinação da concentração de cobre ou para as análises fisiológicas e bioquímicas. Os resultados mostraram que a salinidade e a MOD modificaram a especiação do cobre no meio aquático, sendo que as

variações de acumulação lamelar do cobre não puderam ser explicadas pelas mudanças na química da água. Além disso, os dados obtidos indicam claramente que a salinidade e a MOD atuam como agentes protetores contra a acumulação do cobre no isópodo *E. armata*. Quanto aos efeitos tóxicos do cobre, os dados do presente estudo sugerem que, em baixas salinidades, o mecanismo de toxicidade agudo do cobre está associado a uma inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase com distúrbios na regulação da concentração lamelar de sódio. Em salinidades mais elevadas, este mecanismo está associado a uma inibição da atividade da anidrase carbônica, também com conseqüente distúrbio na regulação da concentração lamelar de sódio. Por fim, verifica-se que a toxicidade aguda do cobre em *E. armata* está associada tanto a efeitos diretos do cobre em moléculas envolvidas nos processos ionorregulatórios em nível lamelar, quanto a efeitos indiretos do metal no metabolismo corporal dos isópodos.

Palavras-Chaves: acumulação, anidrase carbônica, cobre, consumo de oxigênio, especiação, *Excireolana armata*, matéria orgânica dissolvida, Na^+, K^+ -ATPase, salinidade, temperatura.

ABSTRACT

Copper is ubiquitous in aquatic environments, being required to organisms for several physiological functions. However, high environmental copper concentrations can be toxic, leading to structural and molecular injuries. The present study aimed to verify the influence of salinity, temperature and dissolved organic matter (DOM) on copper speciation in the water, as well on copper accumulation in lamellas of the eurihaline isopod *Excitrolana armata*. Copper toxic effects on biochemical and physiological parameters (lamellar Na⁺,K⁺-ATPase and carbonic anhydrase activities, lamellar copper concentration and whole body oxygen consumption) were also evaluated. Experiments were performed on isopods collected at the Mar Grosso Beach (São José do Norte, RS, Brazil) and acclimated to different salinities (3, 6, 15 and 30). In general, the LC₅₀-48 h of copper previously determined at the experimental salinities were tested at 10°C and 20°C or at different DOM concentrations (1.0, 2.5 and 5.0 mg C/L) at 20°C. After 48 h of exposure, whole body oxygen consumption was determined and isopod lamellas were dissected for analyses of either copper accumulation or biochemical and physiological parameters. Results showed that salinity and DOM influence copper speciation in water. However, variations in lamellar copper accumulation are not explained by changes in water chemistry. Data obtained clearly indicate that salinity and DOM act as protecting agents against copper accumulation in the isopod *E. armata*. Regarding toxic effects, our findings suggest

that the mechanism of acute copper toxicity in extremely low salinity is associated to an inhibition of the lamellar Na^+, K^+ -ATPase activity with disturbances on the regulation of the lamellar sodium concentration. At higher salinities, this mechanism is associated with an inhibition of the anhydrase carbonic activity, also leading to disturbances on the lamellar sodium concentration. Finally, data generated indicate that the acute copper toxicity in *E. armata* is associated to both direct effects of copper on molecules involved in the lamellar ionoregulatory processes and indirect effects on whole body metabolism of isopods.

Keywords: accumulation, carbonic anhydrase, copper, dissolved organic matter, *Excitrolana armata*, Na^+, K^+ -ATPase, oxygen consumption, salinity, speciation, temperature.

1-INTRODUÇÃO

1.1- Contaminação ambiental pelo cobre

A contaminação ambiental por agentes químicos tem ocorrido de forma intencional ou acidental em decorrência da atividade humana. Aproximadamente 40% da população mundial vive em regiões costeiras, sendo que estas áreas são propícias para atividades turísticas, bem como para o estabelecimento de transporte marítimo e de complexos industriais. Como consequência, os ecossistemas marinhos vêm recebendo uma carga constante de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas, seja de forma direta, através do lançamento de efluentes industriais e doméstica, ou indireta, através do deságüe de rios, da lixiviação de solos e da precipitação atmosférica, tornando-se o receptor final de diversos elementos de origem antrópica (Moraes *et al.*, 2001).

Sabe-se que sistemas lagunares ocupam cerca de 13% da costa do território mundial (Nixon, 1982), sendo considerados um dos mais produtivos ecossistemas (Beltame *at al.*, 2009). Eles variam em tamanho, forma, clima, e quanto ao nível de lançamento de efluentes. Outro fato interessante é que estes sistemas fazem a interface entre os ambientes continentais e marinhos. Estes ecossistemas são controlados por uma série de interações entre o continente, o oceano e a atmosfera, sendo, portanto, considerados ambientes vulneráveis

(Viaroli *et al.*, 2007). Eles são caracterizados por altas flutuações nos parâmetros físicos e químicos, e em muitos casos há significativa presença de contaminantes de origem antrópica, oriundos das atividades industriais, domésticas e agrícolas, que podem influenciar as interações acima mencionadas. Dentre os vários contaminantes aquáticos, os metais traço, apresentam particular interesse por serem persistentes no ambiente, biogeoquimicamente reciclados e apresentarem riscos ecológicos (Sunda, 1989). A avaliação da qualidade dos ambientes aquáticos deve considerar tanto o tipo quanto o nível de metais que está sendo aportado nos sistemas aquáticos. Além disso, o tipo de ambiente onde o elemento se encontra deve também ser considerado, pois diferentes ambientes apresentam características particulares, e assim diferentes formas do elemento podem estar presentes no meio contaminado (Beltame *et al.*, 2009). Os metais podem se apresentar no meio aquático sob diversas formas químicas, livres ou formando complexos, orgânicos e inorgânicos, tanto em ambientes dulciaquícolas como marinhos (Georgopoulos *et al.*, 2002).

Vários elementos químicos presentes nos ambientes hídricos em baixas concentrações, tais como os metais traço, são essenciais à vida, principalmente em função do seu papel em diversas reações bioquímicas, sendo, portanto, considerados tão importantes quanto os macronutrientes presente no meio. Estes elementos essenciais ao metabolismo são fatores limitantes do desenvolvimento e do crescimento dos organismos (Niencheski *et al.*, 2008). Dessa forma, os metais podem ser divididos em duas categorias, os essenciais aos organismos e aqueles não essenciais. Os metais essenciais são aqueles elementos que plantas ou

animais necessitam, mesmo em concentrações muito baixas, para realizar algum tipo de função biológica. Dentre os metais essenciais, podemos citar o ferro, manganês, zinco e cobre, sendo este último o metal avaliado no presente estudo. Metais como alumínio, chumbo, níquel, mercúrio, entre outros, não são requeridos pelos organismos para realizar qualquer função biológica, sendo estes, portanto, considerados tóxicos, mesmo em baixas concentrações (Smith *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, o cobre é um elemento essencial que participa de uma série de funções biológicas. Este metal é constituinte da hemocianina, pigmento respiratório responsável pelo transporte de oxigênio na circulação hemolinfática dos crustáceos (Schmidt-Nielsen, 1996). Além disso, este metal faz parte da composição estrutural de proteínas e enzimas, está envolvido em reações de oxidação/redução, atuando, portanto, nos processos de respiração celular, na defesa contra radicais livres, além de participar como co-fator enzimático (Morgan, 2000). Por exemplo, a enzima citocromo c-oxidase, que está presente na mitocôndria das células e tem o cobre como co-fator, faz parte da cadeia de transporte de elétrons. Neste processo, o O_2 é reduzido para formar água, permitindo assim a formação de ATP. A enzima superóxido dismutase (SOD), que está presente na maioria das células, e faz parte do sistema de defesa antioxidante, contém dois átomos de cobre por molécula (Georgopoulos *et al.*, 2002). Esta enzima é responsável pela proteção celular contra danos oxidativos, convertendo o íon superóxido à peróxido de hidrogênio.

O cobre é um metal de transição e geralmente ocorre na natureza em quatro estágios de oxidação: cobre metálico (Cu^0), íon cuproso (Cu^+), íon cúprico

(Cu^{2+}) e cobre trivalente (Cu^{3+}), embora esta última forma seja rara. O íon cuproso sofre rápida desprotonação em soluções aquosas, formando o íon cúprico. Esta forma oxidada do cobre é a mais importante e também a mais facilmente encontrada no ambiente aquático. Outro aspecto importante é o fato de que o cobre pode se complexar com bases fortes como a amônia, carbonatos, cloretos, hidróxidos, nitratos e sulfatos. Além disso, este metal pode se ligar fortemente com ânions orgânicos como, por exemplo, aminoácidos, álcool e uréia. A formação destes complexos orgânicos é realizada através da ligação do metal com produtos e subprodutos do metabolismo biológico (Roesijadi & Robinson, 1994; Georgopoulos *et al.*, 2002). Entretanto, os íons metálicos são considerados os mais danosos ao ambiente aquático, pelo fato de estarem mais biodisponíveis (Cross & Sunda, 1982). Sendo assim, estes metais podem ser quantificados tanto por medidas de bioacumulação quanto através de respostas biológicas.

Estima-se que do total anual de cobre lançado nos oceanos, a grande porcentagem seja resultante de processos naturais, principalmente através do intemperismo. Esse tipo de atividade natural é responsável pelo lançamento de uma quantidade quatro vezes maior de cobre no ambiente que aquela advinda da atividade humana (Landner & Lindstrom, 1999). No entanto, o cobre presente no ambiente resultante de atividades antrópicas é significativo (Di Toro *et al.*, 2000).

Uma das principais fontes antrópicas de despejo de cobre nas zonas costeiras são os efluentes industriais e portuários. No município de Rio Grande (RS), ocorre intensa atividade industrial associada à produção de fertilizantes, derivados de petróleo e indústrias de pesca e cereais (Baumgarten & Niencheski,

1998). Além disso, efluentes domésticos também são uma fonte de despejo de contaminantes no ambiente, dentre eles o cobre. Tintas usadas nos barcos como anti-incrustantes também contribuem para o incremento de cobre no ambiente aquático. O cobre presente no ambiente pode estar na coluna d'água, na forma de complexos, no material particulado ou na forma livre. Além disso, o cobre que foi lançado no ambiente pode ficar retido no sedimento, e quando ocorre algum evento capaz de disponibilizar esse metal, ele é novamente introduzido na coluna d'água. Dessa forma, atividades como a mineração pode liberar grandes quantidades de metais, como o cobre, sendo estes considerados persistentes e com potencial tóxico a biota por períodos prolongados (Niencheski & Windom, 1994; Niencheski & Baumgarten, 1998; Wasserman & Wasserman, 2008).

Estudos realizados na Lagoa dos Patos (Rio Grande-RS) (Niencheski & Baumgarten, 1998, 2000) revelaram um aumento no fator de enriquecimento de alguns metais, incluindo o cobre, indicando assim uma contribuição antrópica neste ambiente. No início da década de 80, a concentração de cobre dissolvido na boca do estuário da Lagoa dos Patos se encontrava em torno de 2 µg/L (Seeliger & Knak 1982). Quase 20 anos mais tarde, valores de até 34 µg/L foram registrados na mesma área por Baumgarten e Niencheski (1998), que atribuíram este aumento principalmente às atividades portuárias.

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. Segundo a Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005, a concentração de cobre dissolvido permissível de ser lançada

no ambiente costeiro é de 5 µg/L, mas em condições especiais, a agência permite lançamentos de até 1 mg/L deste metal (CONAMA, 2005). Dessa forma, é de fundamental importância avaliar os possíveis efeitos dos diferentes níveis de cobre lançados no ambiente sobre a biota aquática. Para tanto, testes toxicológicos são utilizados a fim de avaliar o comportamento deste metal frente a variações ambientais, tais como salinidade, temperatura e concentração de matéria orgânica, bem como determinar a toxicidade e elucidar os mecanismos de ação deste metal em organismos aquáticos.

1.2- Praias arenosas

Praias arenosas constituem ecossistemas dinâmicos localizados na interface entre a terra e o mar, e compreendem a maior parte do litoral de regiões tropicais e temperadas (McLachlan, 1983). As praias arenosas ajustam-se às flutuações dos níveis locais de energia. As principais características físicas que definem a morfodinâmica de uma praia são o período e a dimensão das ondas, o tamanho do grão de areia, a declividade da praia e o alcance das marés (Short, 1996). A associação destes processos é responsável pelo estabelecimento, distribuição e diversidade da macrofauna marinha.

De acordo com o grau de exposição às ondas, as praias arenosas são divididas em duas categorias: protegidas e expostas. Praias arenosas protegidas são caracterizadas pela fraca ação das ondas, o que favorece a construção de tocas e galerias pelos organismos macrofaunais (McLachlan, 1980). Já as praias

arenosas expostas apresentam de uma forma geral, forte ação de ondas, alto grau de oxigenação na areia. Em função da sua morfodinâmica, as praias expostas são classificadas em três tipos básicos: dissipativa, intermediária e refletiva (Short & Wright, 1983).

No extremo sul do Brasil, as extensas praias arenosas são em sua maioria do tipo intermediária. Nesta região, a maior parte da costa é caracterizada por praias arenosas largas, com declividade suave e uma zona de arrebentação bem desenvolvida. As ondas possuem energia entre moderada e alta, quebrando em bancos de areia, depositados paralelamente à linha da praia, os quais são normalmente cortados por correntes de retorno (Garcia & Gianuca, 1998).

As extensas praias dessa região apresentam declividade suave e areias finas, favorecendo a ocorrência de uma macrofauna bentônica abundante. A distribuição vertical das espécies segue um padrão típico de zonação, incluindo uma zona supralitoral, uma mesolitoral ou intermareal, e zonas de arrebentação interna e externa. Estudos realizados por Gianuca (1983, 1985, 1987) e Santos (1990) revelaram que as praias do sul do Brasil estão entre as mais ricas e produtivas praias arenosas do mundo.

As praias arenosas intermediárias e dissipativas, em conjunto com sua zona de arrebentação das ondas, podem formar um sistema único, com propriedades ecológicas características (Garcia & Gianuca, 1998). Este sistema, localizado entre a zona de arrebentação externa e o limite superior da zona de varrido das ondas, pode funcionar como um ecossistema semi-fechado e auto-sustentável, em grande parte independente da introdução de material alimentar do

mar adjacente (McLachlan 1980, 1983). Componentes do nécton e das comunidades bentônica, planctônica e microbiana, tendem a conferir uma diversidade considerável a estes ecossistemas (Brown & McLachlan, 1990).

Na zona mesolitoral, observa-se a maior biomassa e produção de invertebrados bentônicos (Gianuca 1983, 1985). Muitas espécies são abundantes nesta região, como por exemplo, o poliqueta *Spio gaucha* e os filtradores *Emerita brasiliensis*, *Donax hanleyanus* o marisco branco *Mesodesma mactroides* e o isópodo *Excirrolana armata*. A maioria das espécies residentes neste ambiente exibe um padrão de distribuição vertical, mas como a sua migração vertical depende da inundação pela maré, o seu limite de distribuição segue o nível da água do mar e as alterações no perfil da praia (Gianuca, 1987).

A variação na distribuição, composição e estrutura das comunidades bentônicas de praias arenosas tem sido relacionada a mudanças em parâmetros ambientais, como precipitação, temperatura e morfodinâmica (McLachlan, 1990; Jaramillo & McLachlan, 1993). A geomorfologia das praias arenosas resulta da ação de fatores como vento, ondas e marés, que associados determinam a granulometria do sedimento (Brown & McLachlan, 1990). A diversidade e abundância biológica são inversamente proporcionais ao tamanho do grão de areia (McLachlan, 1983).

Perturbações físicas em habitats bentônicos são importantes para a estruturação de comunidades biológicas marinhas (Hall *et al.*, 1991). As comunidades bentônicas encontradas em ambientes rasos costeiros estão sujeitas a uma variedade de perturbações físicas (Hall *et al.*, 1994). As principais variações

que promovem distúrbios na distribuição, composição e estrutura das comunidades bentônicas de praias arenosas estão relacionadas com a morfodinâmica conforme citado anteriormente (Mclachlan, 1990; Jaramillo & Mclachlan, 1993). Por outro lado, a dinâmica das populações, principalmente das espécies dominantes, também tem papel importante neste processo (Yannicelli *et al.*, 2006).

Além de fatores físicos, também existem fatores biológicos que estruturam as comunidades bentônicas de praias arenosas. Essa estruturação é o resultado de propriedades como disponibilidade de alimento e atividade de forrageamento, efeitos advindos de movimentações e agregações, competição intra e inter específica e efeito da predação (Marsden & Rainbow, 2004).

De forma geral, os estudos realizados com invertebrados de praias arenosas são em sua maioria apenas para caracterização da fauna, o que é de extrema importância para o conhecimento das espécies que habitam este ambiente. No entanto, o conhecimento do comportamento fisiológico das espécies que aí habitam frente a variações ambientais ainda é escasso.

Diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de avaliar a toxicidade de metais em diferentes taxa de organismos que utilizam o ambiente marinho costeiro e intermareal, seja para alimentação, reprodução ou habitat. Sabe-se que existe uma grande variabilidade inter e intra específica de tolerância dos organismos ao cobre, tanto em água doce quanto em água salgada (Grosell *et al.*, 2002).

Estudo realizado por Martins (2008) com espécies de diferentes taxa da praia do Cassino (RS), como o peixe *Trachinotus marginatus*, o misídeo *Metamysidopsis elongata atlantica*, o siri-chita *Areneus cribarius* e o marisco branco *Mesodesmas mactroides*, mostrou que o cobre pode ser bioacumulado em diversos tecidos destes animais, podendo causar efeitos biológicos significativos.

1.3- Modelo biológico

Dentre as espécies de crustáceos que habitam as praias arenosas do Sul do Brasil, encontra-se o isópodo cirolanídeo *Excirolana armata* (Fig. 1), o qual foi escolhido como modelo biológico no presente estudo. Este isópodo é considerado um organismo eurialino, sendo capaz de tolerar uma ampla faixa de salinidade, variando de 1,5 a 70 (Santos & Bianchini, 1998). Esta espécie habita a região intermareal de praias intermediárias e dissipativas (Yannicelli *et al.*, 2002), especialmente as que apresentam grãos finos. Sua distribuição pode ser observada ao longo da costa Atlântica da América do Sul, a partir do Rio de Janeiro no Brasil até a costa de Buenos Aires na Argentina (Castro & Brum, 1969).

Assim como a maior parte da macrofauna de praias arenosas, *E. armata* apresenta crescimento rápido, alta mortalidade e baixa expectativa de vida. De acordo com McLaclan & Brown (2006), isópodos estão entre as espécies macrofaunais que apresentam maior taxa de renovação. Além disso, este isópodo apresenta atividade na maior parte do tempo quando o espriamento cobre mais

de 50% da área de enterramento do cirolanídeo, possui boa capacidade natatória e rápida taxa de enterramento (Yannicelli *et al.*, 2001, 2002).

Excirolana armata é um microcrustáceo de grande ocorrência na região costeira do Atlântico Sul, podendo alcançar densidades que variam de 7.000 a 20.000 indivíduos/m², atingindo picos de abundância nos meses de fevereiro a abril (Gianuca, 1987). Este fato coincide com a chegada de bandos de aves marinhas, que se alimentam deste isópodo. Durante a maré alta, a alta densidade e biomassa considerável de invertebrados intermareais, dentre eles *E. armata*, atraem predadores diversos como peixes e gastrópodes, enquanto que na maré baixa, os principais predadores são aves residentes e migratórias (Vooren, 1998).



Figura 1- Espécime de *Excirolana armata* Dana (1852).

Visto que *E. armata* é uma espécie que apresenta capacidade de suportar uma ampla variação na salinidade do ambiente (eurialina), importante na cadeia

trófica e apresenta grande abundância nas regiões onde ocorre, esta pode se constituir num excelente bioindicador para a análise dos riscos de impacto ambiental em zonas costeiras e marinhas. No entanto, até o presente, os estudos realizados com *E. armata* tem visado apenas a listagem bibliográfica, a coleta de dados para taxonomia, e o estudo da distribuição geográfica e zonação. Entretanto, estudos voltados para o conhecimento da fisiologia destes organismos ainda são escassos.

1.4- Influência de parâmetros ambientais na toxicidade de metais

Nos sistemas aquáticos, a especiação química de metais, como o cobre, é dependente de fatores físico-químicos que predominam no ambiente, tais como salinidade, compostos orgânicos dissolvidos, pH, dureza e fluxo de sedimentação. Estes fatores influenciam a forma química do metal dominante no meio aquático, determinando assim sua biodisponibilidade e toxicidade (Roesijadi & Robinson, 1994). Desta forma, os parâmetros físico-químicos do meio devem ser considerados na avaliação da toxicidade do cobre em ambientes aquáticos.

Variações dos valores de dureza da água são de fundamental importância para a determinação da forma sob a qual o cobre estará presente no ambiente. Prova disto é o fato de que a dureza da água é levada em consideração na regulamentação dos critérios de qualidade da água, pois um aumento na dureza reduz significativamente a toxicidade de vários metais, incluindo o cobre (Sprague,

1985; Wood *et al.*, 1997; USEPA, 1999). A relação dureza-toxicidade geralmente retrata também o efeito simultâneo de outros fatores, como da alcalinidade na especiação do íon metálico livre na solução e a interação competitiva dos cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} com o metal no sítio de ligação do organismo (Campbell, 1995; Wood *et al.*, 1997).

Além da dureza da água, outro fator capaz de alterar as reações químicas do cobre no meio aquático é o pH. Com o aumento do pH, a fração de cobre que existe sob a forma de complexos carbonatados aumenta, e embora esta seja considerada uma espécie tóxica, sua toxicidade é menor do que quando o íon cúprico está presente no meio (Santore *et al.*, 2001). Além disso, a desprotonação do carbono orgânico dissolvido (COD) em altos valores de pH aumenta a formação do complexo cobre-COD. Com a acidificação do meio, além de alterar a complexação do metal, altera também a interação do metal com membranas biológicas, podendo haver um aumento da permeabilidade de membranas aos íons e à água (Cusimano *et al.*, 1986; Santore *et al.*, 2001). Sabe-se também que em meio ácido, a estrutura de proteínas e enzimas envolvidas no equilíbrio osmorregulatório como é o caso da Na^+, K^+ -ATPase, pode sofrer danos, perdendo sua eficiência catalítica (Castilho *et al.*, 2001).

A presença de carbono orgânico dissolvido (COD) no ambiente também reduz a toxicidade do cobre, pois ocorre à formação de complexos Cu^{2+} -COD, que torna o metal indisponível para a biota. Como resultado do aumento de COD, mais cobre é necessário para promover algum tipo de dano biológico, pois a toxicidade

do cobre está diretamente relacionada com a concentração de cobre livre no ambiente.

Outro fator capaz de alterar a toxicidade do cobre é a alcalinidade. Em elevados valores de alcalinidade, altos valores de carbonatos e bicarbonatos são observados. Como resultado, o cobre forma complexos CuHCO_3 e CuCO_3 , tornando-o indisponível aos organismos aquáticos. A presença de elementos como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} podem também oferecer alguma proteção contra os efeitos tóxicos do cobre, pois estes íons são competidores pelos sítios ativos na membrana biológica, além de indicarem a dureza da água, dada principalmente pela razão destes dois cátions. Portanto, estes cátions são importantes na determinação da toxicidade do metal (Welsh *et al.*, 2000).

A variação na temperatura das águas costeiras marinhas depende principalmente das condições climáticas, das características hidrodinâmicas e das temperaturas das fontes de calor existentes (Carbonel, 2008). A temperatura das águas superficiais da plataforma é uma consequência das diferentes massas de águas presentes no local. No extremo sul do Brasil a temperatura média anual é de 17°C (Klein, 1998).

O incremento da temperatura das águas como consequência das fontes muda o padrão não só dos parâmetros físicos, mas também dos diversos componentes biológicos e ecológicos do ambiente marinho. À medida que a temperatura aumenta de 0 a 30°C , a viscosidade, tensão superficial, compressibilidade, calor específico, constante de ionização e calor latente de vaporização diminuem, enquanto que a condutividade térmica e a pressão de

vapor aumentam a solubilidade com a elevação da temperatura (Carbonel, 2008). Portanto, a temperatura tem um efeito direto sobre a taxa ou cinética das reações químicas, nas estruturas protéicas e nas funções enzimáticas nos organismos.

Dessa forma, as atividades biológicas dos organismos aquáticos sofrem constantes alterações decorridas das freqüentes modificações comportamentais do meio, como quando da elevação da temperatura, que no caso os obriga a um consumo maior de oxigênio, o qual encontra-se em concentração diminuída na água, pelo próprio efeito da temperatura na solubilidade dos gases.

Sabe-se que a elevação de 5°C na temperatura da água, pode alterar em 50% os efeitos tóxicos de certas substâncias e reduzir o tempo de sobrevivência de peixes e crustáceos, resultando em freqüentes e elevadas mortalidades em regiões cujo clima se apresente com tendência à elevações bruscas e onde a qualidade da água não possa ser considerada ótima.

Outro parâmetro importante que influencia a toxicidade e a acumulação dos metais é a matéria orgânica dissolvida (MOD). A presença de MOD na coluna d'água vem sendo avaliada em diversos trabalhos, visto que ela é capaz de alterar o transporte e a distribuição dos metais, como o cobre (Wetzel, 2001; VanGenderen *et al.*, 2003), tanto em água doce quanto em ambientes marinhos (Doig & Líber. 2005). A concentração de MOD pode variar nos diferentes ambientes aquáticos, sendo encontradas concentrações de 0,5 mg/L na água do mar, até 30 mg/L em alguns ambientes de água doce (VanGenderen *et al.*, 2003). A MOD apresenta diferentes frações, sendo que o ácido húmico e o ácido fúlvico correspondem de 70 a 80% desta constituição. Estas frações apresentam

diferenças com relação à complexação de cobre. Além disso, em diferentes tipos de ambiente há uma maior abundância de um determinado tipo de fração (De Schamphelaere *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2001).

A matéria orgânica natural (MON) pode ser produzida na coluna d'água pelo fitoplâncton (autóctone) ou ser proveniente do ambiente adjacente (alóctone). A MON autóctone é rica em carboidratos e nitrogênio, possui uma coloração amarela, enquanto que a MON alóctone é rica em substâncias húmicas e fúlvicas aromáticas e possui coloração de amarelo a marrom (Rodrigues, 2007)

A associação do metal-MOD é bastante complexa e varia de acordo com o metal e o tipo de matéria orgânica (MO). Dentre os cátions divalentes, o cálcio em ambientes marinhos é conhecido por ser o maior complexante com a MO, fator que faz deste o íon dominante na competição com metais traço. Por outro lado, a toxicidade do íon cúprico, considerado a forma mais tóxica do metal, se mostrou constante quando na presença de diferentes concentrações de compostos orgânicos. Entretanto, dependendo da composição da MOD, o complexo cobre-MOD, pode estar disponível no meio e também causar toxicidade (Matsuo *et al.*, 2004). Apesar da existência de estudos a fim de verificar a eficácia da MOD de diferentes origens na toxicidade e acumulação do cobre em várias espécies aquáticas, pouco se sabe sobre seus efeitos em ambientes estuarinos e marinhos.

Com base no exposto acima, verifica-se que os animais aquáticos estão naturalmente expostos a uma variedade de metais, cuja forma química e concentração são regidas pelos processos naturais, geoquímicos e atividades antrópicas. Por sua vez, as funções celulares são de extrema importância em

processos que envolvem captação, regulação, utilização e liberação de metais, sendo que a toxicidade do cobre pode ser atribuída a disfunções resultantes de interações inapropriadas do metal com estruturas celulares (Roesijadi & Robinson, 1994).

1.5- Mecanismos de toxicidade do cobre

Quando ocorre uma variação na salinidade do meio, um animal pode ajustar a concentração do seu fluido extracelular de modo que a concentração osmótica dos seus fluidos corpóreo se ajuste a esta nova condição, permanecendo isosmótico em relação ao meio externo, e desta forma eliminar o problema do movimento osmótico de água, sendo este animal chamado de osmoconformador. Outra adaptação que os organismos têm para enfrentar as variações ambientais de salinidade é a capacidade de regular a concentração do fluido extracelular, sendo estes animais chamados de osmorreguladores (Péqueux, 1995).

Os crustáceos eurialinos podem ser divididos em três categorias, sendo que a primeira categoria inclui aqueles considerados hiper-reguladores fracos, os quais apresentam capacidade limitada de regulação da concentração osmótica de seus fluidos extracelulares frente a grandes diluições da salinidade do meio. A segunda categoria inclui o grupo dos hiper-reguladores fortes. Estes animais têm a capacidade de manter sua osmolaridade hemolinfática bastante constante, independente da diluição da salinidade do meio externo. Já a terceira categoria

inclui os crustáceos eurialinos hiper-hipo-reguladores, os quais são capazes de manter a osmolaridade hemolinfática mais ou menos constante em uma ampla faixa de salinidade, desde a água doce até a água salgada (Péqueux, 1995). Algumas espécies de isópodos como *E. armata* apresentam essa capacidade de hiper e hipo regulação, dependendo da salinidade do meio em que estão (Giarratano *et al.*, 2007; Barcarolli, 2004).

Para que os animais possam regular as concentrações iônicas de seus fluidos corporais, eles necessitam dispor de uma série de mecanismos fisiológicos. Dentre estes, podemos citar a atividade de duas enzimas que estão diretamente relacionadas aos processos de íono e osmorregulação, a saber a Na^+, K^+ -ATPase e a anidrase carbônica.

A Na^+, K^+ -ATPase é um membro da família de enzimas denominadas ATPases tipo P, que são bombas de íons que realizam muitos processos fisiológicos fundamentais, variando desde a geração de potencial de membrana até a contração muscular e o transporte de íons através da membrana (Jorgensen *et al.*, 2003; Kühlbrandt, 2004). Fazendo uso da energia armazenada no ATP, elas transportam íons específicos através da membrana da célula contra um gradiente de concentração. De acordo com Skou (1988), a Na^+, K^+ -ATPase apresenta diversas funções fisiológicas, dentre elas destacam-se: a geração do potencial de membrana, a manutenção de altas concentrações intracelulares dos íons K^+ , regulação osmótica além de realizar transporte ativo.

A estrutura oligomérica da Na^+, K^+ -ATPase consiste de duas subunidades (α e β) ligadas não-covalentemente (Cornelius, 1991). Além destas duas

subunidades existe outra pequena (“ γ ”). Cada subunidade tem um papel importante no funcionamento da enzima. A subunidade “ α ” é um polipeptídeo de função catalítica que contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , ATP e também para o inibidor específico a ouabaína. Já a subunidade “ β ” é uma glicoproteína, importante na biogênese da enzima, desempenhando papel fundamental na formação e maturação da enzima, na translocação e incorporação à membrana plasmática, além de regular a estabilidade conformacional e a atividade da subunidade “ α ”. Além disso, ela pode estar envolvida na afinidade da enzima pelos íons Na^+ e K^+ (Kawakami *et al.*, 1985).

Com relação à anidrase carbônica (AC), esta é considerada uma enzima primitiva, presente em todos os tecidos e tipos celulares de organismos unicelulares a mamíferos (Henry, 1996). Esta enzima catalisa a hidratação reversível do CO_2 e como produto desta reação tem-se a formação de H^+ e HCO_3^- . Existem muitas evidências que mostram que a AC desempenha papel importante nos processos de respiração e regulação iônica (Gervais & Tufts, 1999; Skaggs & Henry, 2002; Genovese *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2007). Além disso, esta enzima atua na regulação do equilíbrio ácido-base, modulação da hemoglobina e afinidade pelo oxigênio (Henry, 1996).

A Figura 2 apresenta um modelo esquemático de como ocorre o transporte de íons, (sódio e o cloreto) através do epitélio branquial, de um peixe de água doce e como o cobre pode interferir neste processo.

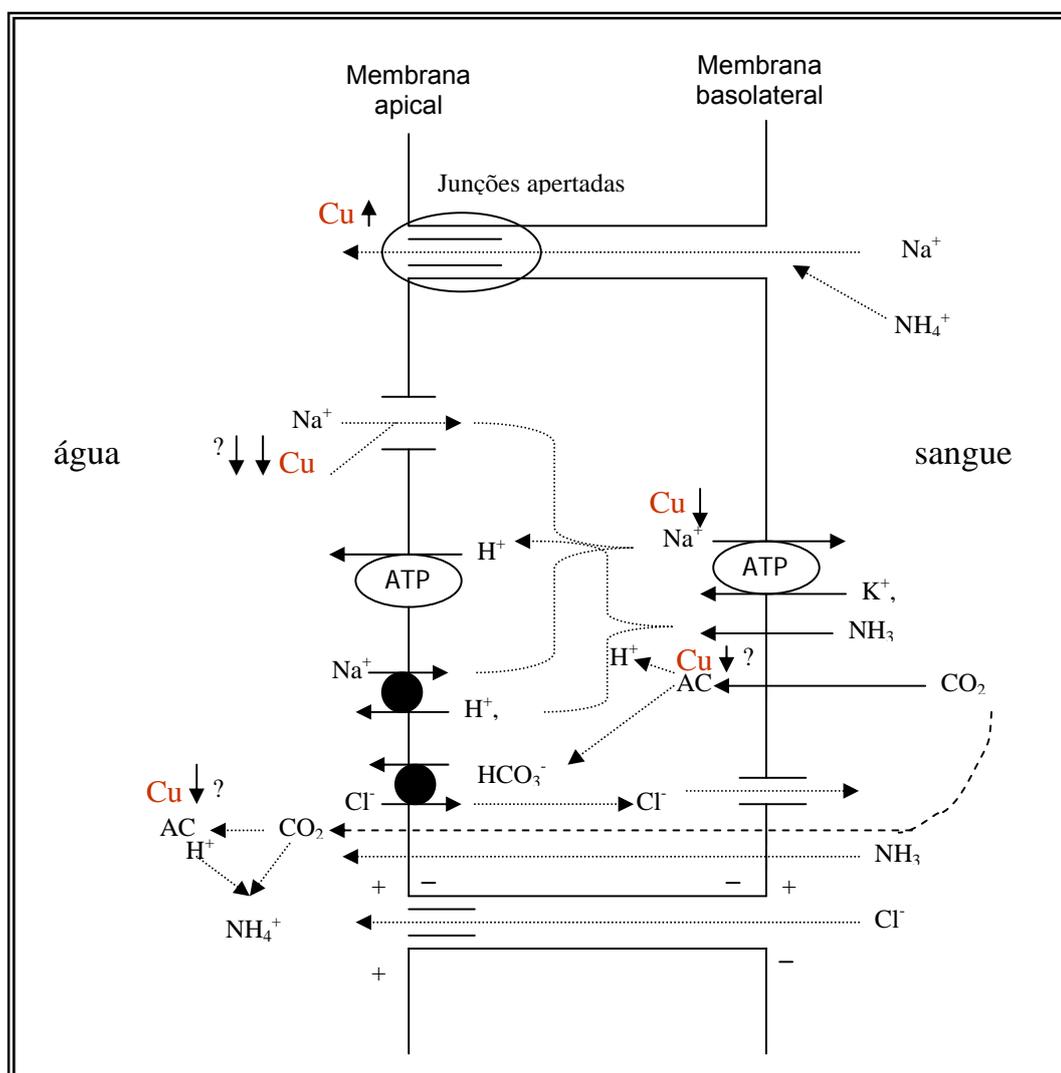


Figura 2- Esquema da estrutura branquial de teleostes dulciaquícolas. Os sinais + e - indicam o gradiente eletroquímico. A presença de cobre altera os principais processos envolvidos na regulação iônica. Extraído de Grosell *et al.* (2002).

A Na^+, K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral das brânquias é a enzima responsável pela captação ativa de Na^+ intracelular em troca de K^+ extracelular na relação 3:2. Essa troca gera um gradiente eletroquímico que

favorece o transporte de Na^+ do meio ambiente para o líquido intracelular através do trocador Na^+/H^+ ou ainda pelos canais de Na^+ acoplados a uma bomba protônica (H^+ -ATPase) presentes na membrana apical do epitélio branquial. O transporte de Cl^- também é favorecido pela geração do gradiente. Desta forma, ele é captado através do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ou pelo cotransporte com o K^+ em nível da membrana apical. No entanto, para que estes processos ocorram, é necessária a participação da anidrase carbônica. Através da reação catalisada por esta enzima há a liberação de HCO_3^- e H^+ , sendo o HCO_3^- utilizado no processo de captação de Cl^- e os H^+ na captação de Na^+ (Karl & Karnaky, 1998; Grosell *et al.*, 2002).

Quando o cobre está presente no ambiente em concentrações elevadas, este pode promover distúrbios nos processos de captação iônica descritos acima. O cobre pode agir de diferentes formas na fisiologia branquial, sendo uma delas a inibição da Na^+,K^+ -ATPase, por competição com o Mg^{2+} que é co-fator desta enzima, prejudicando assim a captação de Na^+ e Cl^- . O cobre também pode alterar a permeabilidade da membrana, facilitando a entrada de água e a perda difusiva de íons. A anidrase carbônica também é um alvo do cobre, sendo que a inibição desta enzima reduz a formação de HCO_3^- e H^+ , os quais são importantes para a captação branquial de Cl^- e Na^+ (Grosell *et al.*, 2002).

Tendo em vista o exposto acima, o presente trabalho pretendeu avaliar o efeito de variações nos parâmetros físico-químicos do meio, tais como salinidade, temperatura e concentração de matéria orgânica, tanto na acumulação quanto nos mecanismos de toxicidade deste metal no isópodo eurialino *E. armata*.

Hipóteses

- As lamelas de *Excirolana armata* podem ser consideradas como sendo um importante órgão alvo de acumulação e toxicidade do cobre, visto que estas encontram-se na interface entre o animal e o meio;

- A salinidade altera a concentração de cobre acumulado no sítio ativo (ligante biótico), visto que à medida que a salinidade aumenta, há também um incremento na concentração de íons complexantes do cobre no meio e de competidores pelos sítios de ligação do cobre no ligante biótico;

- Em temperaturas baixas, como 10° C, a acumulação de cobre nas lamelas é menor que em temperaturas mais altas, como 20° C, visto que as taxas das reações químicas e do transporte de solutos nas membranas biológicas ficam reduzidas;

- A presença de matéria orgânica no meio é um agente protetor contra a acumulação de cobre em uma ampla faixa de salinidade; uma vez que a mesma atua como um agente complexante do metal no meio, reduzindo sua biodisponibilidade;

- Os sítios ativos de toxicidade (ligante biótico) do cobre nas lamelas são a Na^+, K^+ -ATPase e a anidrase carbônica, visto que este metal é capaz de promover danos em processos fisiológicos que envolvem a atividade destas enzimas, tais como a íono e osmorregulação, bem como a respiração em animais aquáticos de respiração branquial e lamelar;

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Verificar “in vivo” a influência de parâmetros físico-químicos do meio na acumulação do cobre nas lamelas no isópodo eurialino *Excirolana armata*, bem como os mecanismos de toxicidade deste metal em diferentes condições ambientais.

Objetivos específicos:

- Identificar, a partir de modelagem geoquímica, as principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais, utilizando-se os dados dos parâmetros físico-químicos avaliados nestes meios.

- Avaliar o efeito da salinidade na acumulação lamelar de cobre no isópodo *Excirolana armata*;

- Determinar a influência da matéria orgânica dissolvida na acumulação lamelar de cobre em uma ampla faixa de salinidade;

- Verificar a influência da temperatura na acumulação lamelar de cobre em uma ampla faixa de salinidade.

- Avaliar os efeitos agudos do cobre sobre a atividade lamelar da Na^+ , K^+ -ATPase e da anidrase carbônica em uma ampla faixa de salinidade;

- Verificar o efeito do cobre no consumo corporal de oxigênio corporal de *E. armata* em uma ampla faixa de salinidade;

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta e Aclimação

Espécimes de *Excirolana armata* (100 ± 3 mg de peso úmido) foram coletados na praia do Mar Grosso, localizada no Município de São José do Norte (RS), juntamente com sedimento e água do local. As coletas foram realizadas esporadicamente ao longo do ano. Os isópodos foram coletados preferencialmente a 20 km do molhe Leste da Barra, a fim de que todos os animais fossem provenientes da mesma região (Fig. 3). Durante as coletas foram utilizadas iscas de peixe, que foram colocadas sobre a areia, a fim de atrair e concentrar os isópodos. Após alguns minutos, com o auxílio de uma pá, a areia do local foi removida e colocada sobre uma malha de 400 μ m. Toda a areia foi retirada, tornando, dessa forma, fácil a identificação e separação dos isópodos que ficaram retidos na malha. Os isópodos foram imediatamente acondicionados em um balde com água do mar do local da coleta.

Após a coleta, os isópodos foram levados para o Biotério Aquático do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-FURG), e acondicionados em aquários de plástico, contendo água do local da coleta, com aeração constante e uma camada de areia suficiente para que os mesmos pudessem se enterrar. Os isópodos permaneceram em aclimação em água do mar (salinidade 30-35), durante uma semana, sob temperatura (20°C) e fotoperíodo (16C: 8E) constantes, de acordo com a ASTM (1997). Após esse período, a salinidade da água foi gradativamente

reduzida até que se atingissem os valores desejados para os testes. É importante salientar que cada vez que a salinidade era reduzida, os isópodos permaneciam nas mesmas condições durante uma semana.

Durante todo o período em que os isópodos permaneceram em aclimação, estes foram alimentados uma vez por semana, com músculo de peixe picado. Após alimentação, toda a água dos aquários era trocada, visando a remoção de resíduos de alimento e renovação do meio.

A salinidade da água dos aquários de aclimação era verificada diariamente e, quando necessário, era parcial ou totalmente renovada nesse período, a fim de que se pudesse manter a qualidade dos meios de aclimação, bem como obter a salinidade experimental desejada. Para tanto, águas de diferentes salinidades (3, 6, 15 e 30) foram preparadas misturando-se água do mar com água destilada. A salinidade da água era verificada através de refratômetro portátil. A água utilizada, tanto para aclimação dos isópodos quanto para a realização dos testes, foi proveniente da Estação Marinha de Aqüicultura (EMA) da FURG.



Figura 3- Local de coleta dos isópodos, Praia do Mar Grosso (São José do Norte-RS).

3.2- Procedimentos gerais

Todos os testes utilizados para determinar a acumulação lamelar de cobre, bem como os possíveis efeitos deste metal nos parâmetros avaliados no presente estudo foram realizados da mesma forma. Foram utilizados isópodos aclimatados durante uma semana à salinidade experimental desejada, sendo que a alimentação dos animais foi interrompida 48 h antes do início dos testes. Foram

utilizados béqueres de vidro contendo 250 mL de água na salinidade desejada (3, 6, 15 e 30).

Os isópodos foram expostos a concentração letal de cobre para 50% dos organismos após 48h de exposição (CL_{50-48h}), previamente determinada por Barcarolli (2004). A exposição à CL_{50-48h} de cobre na respectiva salinidade do teste foi conduzida sob as mesmas condições experimentais, conforme descrito para o período de aclimação. Os valores nominais de CL_{50-48h} utilizados foram de (0,673; 12,37, 12,42 e 18,94, mg Cu/L) para as salinidades 3, 6, 15 e 30 respectivamente. Para o teste do efeito da salinidade na acumulação lamelar de cobre foi utilizada a concentração de 0,673 mg Cu/L para todas as salinidades experimentais.

O cobre foi adicionado ao meio experimental a partir de duas soluções estoques do metal (20 g e 200 mg Cu/L) na forma de $Cl_2Cu \cdot 6H_2O$ (Vetec, Brasil). Para que ocorresse o equilíbrio entre o cobre e os demais elementos presentes no meio experimental, o metal foi adicionado à água 3 h antes da introdução dos isópodos. Os testes foram do tipo estático com renovação total do meio a cada 24 h, na ausência de sedimento e com duração de 48 h.

Os experimentos foram conduzidos em uma incubadora do tipo DBO com temperatura (20°C) e fotoperíodo (16C:8E) constantes, conforme descrito para o período de aclimação. Cinco réplicas (n=5) foram testadas, tanto para o grupo controle quanto para cada um dos tratamentos. Dez isópodos foram testados por réplica. Após exposição ao cobre (48h), as lamelas dos isópodos de cada réplica

foram dissecadas sob lupa e com auxílio de pinças. Todo o material biológico coletado para cada unidade experimental foi agregado, acondicionado em tubo plástico tipo “eppendorf” e congelado (-80°C), até o momento das análises.

Para que se pudesse determinar a concentração de cobre, bem como a composição iônica dos diferentes meios experimentais, foram coletadas amostras de água (10 mL) de cada tratamento no início e no final de 24 h de teste. A coleta da água foi feita com o auxílio de seringa descartável previamente limpa com ácido nítrico a 1%. A amostra de água foi transferida para um tubo plástico de 15 mL, onde foram previamente pipetados 50 µL de ácido nítrico 65% (Suprapur, Merck, USA). O mesmo procedimento foi utilizado para a coleta de uma segunda amostra de água, porém neste caso a água coletada foi filtrada (filtro de 0,45 µm) antes de ser acidificada e acondicionada.

Para se determinar outros parâmetros químicos dos meios experimentais, como a alcalinidade e as concentrações de carbono orgânico dissolvido e de sulfato, uma terceira amostra de água foi coletada, aliqüotada separada em tubos plásticos os quais foram armazenados para posterior análise. Todas as amostras de água foram mantidas sob refrigeração (4°C) e no escuro até a realização das análises.

3.3- Experimentos de acumulação de Cobre

No presente estudo foram realizados experimentos visando determinar a influência da salinidade, concentração de matéria orgânica dissolvida e temperatura na acumulação lamelar de cobre.

3.3.1- *Influência da Salinidade*

A fim de se avaliar a influência da salinidade na acumulação lamelar de cobre, os testes foram realizados nas diferentes salinidades experimentais (3, 6, 15 e 30) utilizando-se as respectivas CL_{50-48h} de cobre, conforme previamente determinado (Barcarolli, 2004), ou utilizando-se apenas uma concentração de cobre para todas as salinidades. Neste caso, foi escolhida a concentração de 0,673 mg Cu/L, a qual corresponde a CL_{50-48h} de cobre na salinidade 3, onde foi, portanto, observada a maior toxicidade do cobre. Os testes foram realizados a 20°C.

3.3.2- *Influência da Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)*

Para a determinação da influência da MOD na acumulação lamelar de cobre, diferentes concentrações de matéria orgânica natural (MON) foram adicionadas aos meios experimentais. A MON utilizada foi àquela obtida por Rodrigues & Bianchini (2007), a qual foi extraída de água coletada no Arroio Vieira, após o lançamento dos efluentes da Estação de Tratamento de Esgoto

“Navegantes” da Companhia de Saneamento (CORSAN) de Rio Grande (RS). Segundo estes autores aproximadamente 200 L de água foram coletados e filtrados (filtros de polipropileno 10, 1 e 0,5 μm , respectivamente; Polyclean[®], Cuno). Após a filtração a água foi passada por uma resina trocadora de íons tipo sódio, sendo que a matéria orgânica dissolvida (MOD) presente na água foi concentrada pelo processo de osmose reversa. As soluções estoques de (MOD) foram mantidas a 4°C, no escuro, até o momento de serem usadas.

Os experimentos com a MOD foram realizados a 20°C e divididos em 6 diferentes tratamentos: um grupo controle (CTR) sem adição de cobre ou MOD, um grupo CTR com adição apenas de MOD (5 mg de C/L), um grupo com adição apenas de cobre (valor da CL_{50-48h} correspondente a salinidade experimental), e os grupos tratados com diferentes concentrações de MOD (1, 2,5 e 5 mg C/L) e com adição do valor da CL_{50-48h} correspondente a salinidade experimental. Para que o grupo controle (ausência de MOD e cobre) pudesse ser testado e a influência da MOD na acumulação de cobre pudesse ser avaliada, testes foram realizados utilizando-se água do mar artificial preparada através da dissolução de sal marinho comercial (Coral Life[®]) em água tipo MilliQ até atingir a salinidade experimental desejada.

3.3.3- Influência da Temperatura

Para determinar a influência da temperatura na acumulação lamelar de cobre, os isópodos foram submetidos a testes em diferentes temperaturas (10 e

20°C), Para tanto, isópodos aclimatados a 20° C, conforme descrito anteriormente foram transferidos para uma incubadora tipo DBO onde a temperatura foi sendo reduzida gradativamente até se chegar a temperatura experimental desejada. Os isópodos permaneceram nas temperaturas dos testes (10 e 20°C) por um período de cinco dias até o início dos experimentos. Para todas as salinidades testadas (3, 6, 15 e 30) e nas diferentes temperaturas acima citadas, foram realizados testes onde os isópodos foram mantidos na ausência (grupo controle) ou na presença de cobre (valor da CL₅₀-48h correspondente a salinidade experimental).

3.4.- Análise da concentração lamelar de cobre

Para a determinação da concentração de cobre nas lamelas dos isópodos expostos às diferentes condições experimentais descritas acima, as amostras foram descongeladas, secas em estufas (65°C), durante 24 h, pesadas (peso seco), digeridas com 250 µL de ácido nítrico 65% (Suprapur[®], Merck) e diluídas com água tipo MilliQ, até completar o volume a 1,5 mL.

A determinação da concentração de cobre nas amostras biológicas foi realizada através de espectrofotometria de absorção atômica de chama (AAS 932 Plus – GBC, IL, EUA), com limite de detecção de 10 µg/L. Para calibração do equipamento foram utilizadas soluções padrões de cobre preparadas a partir de uma solução estoque de referência de 1 g Cu/L (CELM; São Paulo, Brasil), rastreada a partir de padrão certificado internacional (NIST, EUA). As soluções

padrões de cobre foram acidificadas conforme descrito par as amostras. Os resultados foram expressos em mg Cu/g peso seco.

3.5 Determinação dos efeitos tóxicos do cobre

No presente estudo foram realizados experimentos para avaliar os efeitos agudos do cobre sobre a taxa respiratória corporal e mecanismos associados à regulação iônica no isópodo *E. armata*. Os testes foram realizados como descrito anteriormente. Portanto, os isópodos foram submetidos aos diferentes tratamentos (CTR e exposto ao cobre) nas diferentes salinidades experimentais (3, 6, 15 e 30) a 20°C durante 48h. Após exposição, foi medido o consumo corporal de oxigênio dos isópodos, conforme descrito abaixo. Em um segundo experimento, após o período de exposição, os isópodos foram coletados e as lamelas foram dissecadas, conforme descrito anteriormente, para análise dos parâmetros associados à regulação iônica, conforme descrito abaixo.

3.5.1- Atividade lamelar da Na^+,K^+ -ATPase

A atividade lamelar da Na^+,K^+ -ATPase foi determinada seguindo-se o protocolo descrito por McCormick (1993). Para determinar a atividade desta enzima, as amostras de lamelas foram homogeneizadas em 100 μ L de tampão (300 mM de sacarose, 20 mM de EDTA, 100 mM de Imidazol e 0,5 g de ácido deoxicólico), com auxílio de sonicador (Sonozap 25 KHZ modelo 4180). Os

homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm a 4° C durante 1 minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado, armazenado em tubo plástico tipo “ependorf” e mantidos sob gelo.

Os meios de reação foram previamente preparados em tampão Imidazol (50 mM; pH 7,5) e mantidos sob gelo e ao abrigo de incidência de luz direta. O meio de reação A foi preparado com uma mistura de enzimas que continha: 4 U/mL de lactato desidrogenase (LDH), 5 U/mL de piruvato quinase (PK), 2,8 mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 3,5 mM de ATP e 0,22 mM de NADH. O meio de reação B continha as mesmas enzimas, sendo que neste meio foi adicionado 1 mM de Ouabaína, conhecido inibidor da atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Ambas soluções (A e B) foram preparadas no dia do ensaio. Além dos meios de reação, foi preparada uma solução salina contendo: 100 mM de NaCl, e 10,5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em tampão Imidazol (50 mM - pH 7,5). Esta solução foi dividida em duas alíquotas. Em uma das alíquotas foi adicionado 30 mM de KCl.

As reações foram preparadas em uma placa de 96 poças, sendo que em cada poça foram adicionados 10 μL de amostra, 150 μL do meio de reação A e 50 μL de solução salina contendo potássio ou 10 μL de amostra, 150 μL do meio de reação B e 50 μL de solução salina sem potássio. Paralelamente, foi construída uma curva padrão de ADP (0, 5, 10 e 20 nmoles), nas mesmas condições de reação das amostras. Tanto para as amostras quanto para os padrões, os testes foram realizados em duplicata. Após a montagem das diferentes reações na placa,

a absorvância dos meios de reação foi medida em espectrofotômetro (340 nm) (Victor² TM 1420, Perkin-Elmer, USA), a cada 1 min, durante 10 min.

A concentração de proteínas totais nos extratos empregados para análise da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se um kit comercial de reagentes (DOLES Ltda, Goiania, GO) de acordo com método de Bradford. A atividade enzimática foi expressa em μ moles ADP/mg proteína/h.

3.5.2- Atividade da Anidrase Carbônica

A determinação da atividade da anidrase carbônica (AC) foi baseada no método descrito por Henry (1991). Este método baseia-se na catálise de uma solução saturada de CO₂ pela AC, através da liberação de H⁺ e conseqüente diminuição do valor de pH.

As lamelas foram homogeneizadas com auxílio de sonicador em 250 μ L de tampão (pH 7,4) contendo 225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris e 10 mM de fosfato, diluídos em água tipo MilliQ. Este tampão também foi utilizado como meio de reação no momento das análises. Para tanto, 200 μ L de homogeneizado foram adicionados a um tubo de plástico contendo 14 mL da solução de reação. Foi realizada uma medida inicial (tempo zero) do pH da solução de reação contendo a alíquota do homogeneizado. Em seguida, foram adicionados 2 mL de substrato, que consiste de água tipo MilliQ saturada com CO₂ puro a 2,5°C. Feito isso, a cada 5 segundos, durante 30 seg, foi registrada a

diminuição do pH da solução de reação. Paralelamente foi realizada a determinação do branco de reação, onde foram adicionados 2 mL de água tipo MilliQ saturada de CO₂ ao meio de reação sem adição de amostra. As medidas foram realizadas sob agitação magnética, a fim de se evitar a formação de gradientes locais de pH.

As taxas de reação catalisada (amostra) e não catalisada (branco) foram determinadas através da regressão linear dos valores de pH da solução em função do tempo de reação. A concentração de proteínas no homogeneizado utilizado na reação foi determinada conforme descrito para a análise da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. A atividade da AC foi então calculada através da equação= (taxa catalisada/taxa não catalisada -1)/concentração de proteínas no volume total de amostra utilizado.

3.5.3- Concentração lamelar de sódio

Para determinar a concentração lamelar de sódio, as amostras foram descongeladas, secas em estufa (65°C), durante 24 h, pesadas (peso seco), digeridas em 250 µL de ácido nítrico 65% (Suprapur, Merck) e diluídas com água tipo MilliQ até completar o volume de 1,5 mL. A determinação da concentração de sódio foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica de chama (AAS 932 Plus – GBC, IL, EUA) (limite de detecção de 10 µg/L). O equipamento foi calibrado previamente utilizando-se padrões de NaCl (Tritisol[®], Merck). Os resultados foram expressos em mg Na/g peso seco.

3.5.4- Consumo corporal de Oxigênio

O consumo corporal de oxigênio dos isópodos foi determinado utilizando-se a metodologia descrita por Santos *et al.* (2000), com modificações. Para tal, os isópodos foram colocados individualmente em frascos de vidro, devidamente selados e contendo 55 mL de água na salinidade experimental. Com o auxílio de um eletrodo de O₂, mergulhado no meio experimental e conectado a um oxímetro (DIGIMED DMO-2, São Paulo, Brasil) foram feitas medidas do teor de O₂ dissolvido. O meio foi constantemente homogeneizado com auxílio de agitador magnético. A medida inicial (tempo zero) foi feita após 2 minutos de estabilização da concentração de O₂. A seguir, foram feitas novas medidas a cada 5 min, por um período de 30 min. As medidas foram realizadas a 20°C em sala climatizada. O teor de oxigênio dissolvido nos meios experimentais também foi medido, na ausência de isópodos, visando à correção dos dados quando da presença do isópodo. Ao fim dos testes, os isópodos foram coletados e pesados (peso úmido). Os valores de consumo corporal de oxigênio foram determinados através da regressão linear dos dados da concentração de O₂ dissolvido ao longo do tempo do testes (30 min). Os resultados foram expressos em mg O₂/g/h.

3.6- Análise dos parâmetros químicos dos meios

3.6.1- *Concentração de cobre*

Amostras de água dos diferentes tratamentos também foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama, conforme descrito para as amostras biológicas. Entretanto, para corrigir o efeito matriz, as soluções padrões de cobre foram preparadas nas mesmas salinidades das amostras. Foram determinadas as concentrações de cobre nas amostras não filtradas (cobre total) e filtradas (cobre dissolvido) dos diferentes meios experimentais utilizados. Os resultados foram expressos em mg Cu/L.

3.6.2- *Composição iônica dos meios experimentais*

Foram analisadas as concentrações de Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} e Mg^{2+} nos diferentes meios experimentais utilizados. As análises de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} foram realizadas por fotometria de chama (Micronal, Campo Grande, MS). As concentrações de Cl^- e de Mg^{2+} foram determinadas por espectrofotometria em leitora de microplacas (Bio-Tek Elx-800, Vermont, EUA), utilizando-se kits comerciais de reagentes (Doles Ltda, Goiânia, GO). Os resultados foram expressos em mg/L.

3.6.3- Alcalinidade Total

A alcalinidade total dos meios experimentais foi determinada através do método titrimétrico descrito pela American Public Health Association (APHA, 1989). O princípio da análise se baseia na neutralização das cargas negativas, tais como bicarbonato, carbonato e borato, utilizando-se uma solução ácida. A alcalinidade total refere-se a soma das cargas negativas equivalentes dos íons bicarbonato e carbonato (Baumgarten *et al.*, 1996), sendo que sua determinação foi feita em um pHmetro (DIGIMED DM20, São Paulo, SP). Ácido clorídrico (0,02 mol/L) foi utilizado para neutralizar as cargas negativas, até que o meio chegasse a um pH de 4,5. Para isso, o ácido foi colocado em uma bureta e adicionado aos poucos em 200 mL de cada um dos meios experimentais utilizados. Quando o pH desejado era atingido, a quantidade de ácido era anotada e a alcalinidade total calculada através da seguinte fórmula:

$$[A] = T.M.1000/V, \text{ onde;}$$

[A]= alcalinidade total (mM)

T= volume médio (mL) da solução ácida UTILIZADA;

M= concentração da solução ácida (mol/L)

V= volume da amostra (mL)

Os resultados foram expressos em mg CaCO₃/L.

3.6.4- Concentração de sulfato

A concentração de sulfato nos meios experimentais foi determinada por método turbidimétrico em espectrofotômetro (410 nm), de acordo com a metodologia descrita por Tabatabai (1974). Este método é baseado na medida da turbidez formada quando uma alíquota de uma mistura de cloreto de bário e gelatina é adicionada à amostra de água previamente acidificada com ácido clorídrico (0,5 N). Para a determinação da concentração de sulfato foi feita uma curva padrão com diferentes soluções de sulfato (1, 2, 3, 4 e 5 mg/L). Os resultados foram expressos em mg/L.

3.6.5- Concentração de Carbono Orgânico Dissolvido (COD)

Para determinação da concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), 10 mL de água dos diferentes meios experimentais foram coletados, filtrados (0,45 μm) e acidificados com HCl até atingir um pH em torno de 3. A determinação foi realizada em analisador de carbono orgânico total (TOC 5000, Shimadzu, Japão), conforme descrito por Rodrigues & Bianchini (2007).

3.7- Tratamento Estatístico dos dados

A especiação do cobre e sua complexação com a matéria orgânica foram estimadas com base nos dados dos parâmetros químicos dos meios experimentais, utilizando-se o 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. A comparação da concentração das espécies de cobre nos diferentes meios experimentais foi realizada considerando-se os valores calculados com base nos intervalos de confiança de 95% dos valores de CL_{50-48h} . As superposições dos intervalos de confiança indicaram ausência de diferença significativa entre os tratamentos.

Os dados de acumulação de cobre nas lamelas dos isópodos nas diferentes condições experimentais e os efeitos do cobre sobre as concentrações lamelares de sódio, as atividades da Na^+,K^+ -ATPase e da anidrase carbônica, bem como o consumo corporal de O_2 foram expressos como média \pm erro padrão ($n= 5$). As médias nos diferentes tratamentos foram comparadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste *a posteriori* de Tukey ($\alpha= 0,05$). Para comparar as médias dos diferentes tratamentos (controle e exposto ao cobre) em uma mesma salinidade foi utilizado o teste *t de Student*. Previamente, foram testadas a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Estas análises foram efetuadas utilizando-se o software *Statística 7.0* (StatSoft Inc, EUA).

4- Resultados

4.1- Parâmetros físico-químicos dos meios experimentais

Para avaliar a especiação do cobre nos diferentes meios experimentais, os principais parâmetros físico-químicos destes foram analisados. Os resultados obtidos na temperatura de 20°C estão apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado os valores de pH obtidos para as diferentes salinidades apresentaram pouca variabilidade, sendo que estes tenderam a neutralidade. Com relação à concentração dos principais íons presentes nos meios experimentais, verifica-se que à medida que a salinidade aumentou houve um incremento nas concentrações desses íons. No entanto, a relação entre estas concentrações foi constante para cada salinidade. O mesmo tipo de resposta foi observada para os valores de alcalinidade de concentração de sulfato e carbono orgânico dissolvido.

Os dados apresentados na Tabela 1 foram utilizados para a determinação da especiação do cobre nas diferentes condições experimentais, a saber, variação de salinidade (3, 6 e 15), concentração de matéria orgânica dissolvida (1; 2,5 e 5 mg C nominal/L). Cabe ressaltar que não foi feita a especiação na salinidade 30, visto que houve precipitação do cobre tornando esta análise não confiável.

A Figura 4 mostra as diferentes espécies de cobre presentes nas diferentes salinidades testadas em 20°C. Podemos observar que as concentrações das espécies de cobre foram menores na salinidade 3 do que nas salinidades 6 e 15,

sendo Cu^{2+} , CuOH^+ e CuCO_3 as espécies encontradas em maior concentração, independente da salinidade. Cabe ressaltar que a concentração letal de cobre (CL_{50}) utilizada na salinidade 3 também foi menor do que aquelas utilizadas nas salinidades 6 e 15. Por sua vez, a Figura 5, mostra os resultados da especiação feita na temperatura de 10°C . Apesar dos resultados seguirem um padrão semelhante àquele observado em 20°C , verifica-se, no entanto, em função da salinidade que a concentração de todas as espécies de cobre na salinidade 3 foram maiores em 10°C (Fig. 5) do que em 20°C (Fig. 4). Além disso, nas salinidades 6 e 15 as concentrações de CuOH^+ , $\text{Cu}(\text{OH})_2$ e $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$, também foram menores em 10°C (Fig. 5) do que em 20°C (Fig. 4).

Para se determinar a influência da salinidade na especiação do cobre, foi adicionada a mesma concentração deste metal (0,658 mg Cu dissolvido/L), nas diferentes salinidades experimentais. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6. Pode ser observado que todas as espécies de cobre estão em menor concentração na salinidade 3 do que nas salinidades 6 e 15, as quais apresentam concentrações similares para as espécies de cobre, exceto para $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$. Para esta espécie de cobre, a concentração aumenta com o aumento da salinidade (Fig. 6).

Quanto à matéria orgânica dissolvida, observa-se que a concentração da mesma não altera significativamente a especiação do cobre nas diferentes salinidades testadas. Em todas as salinidades, as espécies de cobre mais presentes nos diferentes meios experimentais são Cu^{2+} e CuCO_3 (Figs. 7, 8 e 9).

4.2- Acumulação lamelar de cobre

4.2.1- Efeito do cobre

Os isópodos foram expostos (48h) às correspondentes CL_{50-48h} de cobre nas salinidades 3, 6, 15 e 30, as quais correspondem às concentrações de 0,658, 9,46, 9,54 e 11,79 mg Cu dissolvido/L, respectivamente. Após a exposição, as lamelas foram coletadas para determinação da concentração de cobre acumulado neste tecido.

Os resultados mostram que a concentração lamelar de cobre dos isópodos expostos ao cobre foi significativamente maior em relação aos seus respectivos controles, em todas as salinidades testadas ($p < 0,05$). Além disso, os resultados mostram ainda que a concentração de cobre acumulado nas lamelas aumenta significativamente com o incremento da salinidade. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as salinidades 15 e 30 (Fig. 10).

4.2.2- Efeito da salinidade

Para verificar o efeito da variação da salinidade na acumulação de cobre a 20°C, os isópodos foram expostos a 0,658 mg Cu dissolvido/L que corresponde a CL_{50-48h} de cobre da salinidade 3 nas diferentes salinidades testadas. A Figura 13 mostra os resultados obtidos a partir destes testes. Em todas as salinidades testadas houve aumento significativo na acumulação de cobre nas lamelas dos

isópodos, em relação aos seus respectivos controles. Entretanto, verifica-se que as maiores concentrações de cobre acumulado nas lamelas dos isópodos expostos ao cobre foram nas salinidades 3 e 6, sendo que não houve diferença significativa entre estas. Quanto aos isópodos expostos ao cobre na salinidade 15, estes apresentaram concentrações lamelares de cobre significativamente maiores do que aqueles expostos ao cobre na salinidade 30. Portanto, à medida que a salinidade aumentava ocorreu uma redução significativa na acumulação do cobre nas lamelas. Outro fato interessante foi observado nos isópodos dos grupos controles, onde a concentração lamelar de cobre seguiu o mesmo padrão de distribuição em função da salinidade em relação àquele observado nos isópodos expostos experimentalmente ao cobre (Fig. 13).

4.2.3- Efeito da temperatura

Os resultados obtidos nos testes de acumulação de cobre na temperatura de 10°C (Fig. 11) mostram que houve aumento significativo ($p < 0,05$) na acumulação lamelar de cobre em todas as salinidades testadas em relação aos seus respectivos controles. Além disso, houve um aumento significativo da acumulação de cobre com o incremento da salinidade. No entanto, observa-se que a acumulação foi maior na salinidade 6 do que nas salinidades 15 e 30 (Fig. 11). Quando os resultados nas duas temperaturas experimentais são comparados (Fig. 12), observa-se que houve uma maior acumulação do metal nas lamelas dos

isópodos expostos ao cobre na salinidade 6 a 10°C do que a 20°C. Por outro lado, a acumulação foi menor nos isópodos expostos ao cobre nas salinidades 3, 15 e 30 a 10°C do que a 20°C (Fig. 12).

4.2.4- Efeito da matéria orgânica

No presente estudo foi avaliado o efeito da concentração de matéria orgânica dissolvida (MOD) na acumulação lamelar de cobre, em diferentes salinidades. Para tanto, nas diferentes salinidades testadas foram adicionados aos meios experimentais três diferentes concentrações de MOD. (1, 2,5, e 5 mg C/L). Os testes foram conduzidos com água artificial, para evitar a presença de qualquer tipo de interferência da matéria orgânica dissolvida presente na água do mar natural. Diferentes tratamentos foram realizados, sendo eles: grupo controle em água artificial sem adição de MOD, grupo controle com adição de 5 mg C/L de MOD, grupo exposto à CL₅₀-48h de cobre da respectiva salinidade sem adição de MOD, e três grupos expostos à CL₅₀-48h de cobre das salinidades testadas combinadas com as três concentrações de MOD avaliadas.

Os resultados obtidos indicam que a presença de matéria orgânica dissolvida na maior concentração testada (5 mg C/L) não causou alteração significativa na acumulação lamelar de cobre, em todas as salinidades testadas (Figs. 14, a 17). Além disso, pode ser observado que a exposição dos isópodos ao cobre aumentou significativamente a concentração lamelar de cobre, em relação

àquelas do grupo controle na ausência de MOD. Entretanto, a acumulação lamelar de cobre em isópodos expostos ao cobre foi significativamente menor na presença do que na ausência de MOD, independentemente da concentração de MOD e da salinidade testada (Figs. 14 a 17).

4.3- Efeitos tóxicos do cobre

4.3.1- Atividade da Na^+, K^+ -ATPase lamelar

Nos isópodos dos grupos controles, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi significativamente maior nas salinidades extremas (3 e 30) do que nas salinidades intermediárias (6 e 15) (Fig. 18). Nos isópodos expostos ao cobre a atividade lamelar da Na^+, K^+ -ATPase foi significativamente reduzida nas salinidades extremas (3 e 30). Nas salinidades 3 e 30, a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi de 76 e 89% em relação aos seus respectivos grupos controles, respectivamente. Nas salinidades intermediárias (6 e 15) não foi observada alteração significativa da atividade desta enzima, em função da exposição ao cobre (Fig. 18).

4.3.2- Atividade da anidrase carbônica lamelar

Nos isópodos dos grupos controles, a atividade da anidrase carbônica lamelar foi significativamente maior nas salinidades mais elevadas (15 e 30). A

exposição ao cobre inibiu a atividade da anidrase carbônica nas salinidades testadas, exceto na salinidade 3. Nas salinidades 6, 15 e 30, a inibição enzimática foi de 58, 69 e 48% em relação aos grupos controles, respectivamente (Fig. 19).

4.3.3- Concentração de sódio

A concentração lamelar de sódio nos isópodos dos grupos controles foi significativamente menor na menor salinidade (3) do que nas demais salinidades testadas. A exposição (48h) ao cobre provocou uma redução significativa de 81 e 89 % da concentração lamelar de sódio nas salinidades 15 e 30, respectivamente (Fig. 20).

4.3.4- Consumo corporal de oxigênio

Nos isópodos dos grupos controles, o consumo corporal de oxigênio diminuiu significativamente com o aumento da salinidade. A exposição à CL₅₀-48h de cobre provocou uma redução significativa no consumo corporal de oxigênio dos isópodos, exceto na salinidade 30. Nas salinidades 3, 6 e 15 a redução foi de 51, 53 e 77%, respectivamente (Fig. 21).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos dos meios experimentais utilizadas nos testes com o isópodo *Excirolana armata*. Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão. O.D.: oxigênio dissolvido; C.O.D.: carbono orgânico dissolvido.

Parâmetros	Salinidade 3	Salinidade 6	Salinidade 15	Salinidade 30
Temperatura (°C)	20	20	20	20
Ph	7,29 \pm 0,16	6,87 \pm 0,34	7,28 \pm 0,14	7,28 \pm 0,12
D.O. (mg O ₂ /L)	7,70 \pm 0,27	8,44 \pm 0,46	8,14 \pm 0,13	6,46 \pm 0,18
Na ⁺ (mg/L)	862,9 \pm 24,5	1943,5 \pm 112,7	5520,0 \pm 897,0	10626,0 \pm 897,0
Cl ⁻ (mg/L)	2413,4 \pm 71,2	3552,1 \pm 152,4	10918,6 \pm 1666,2	18185,9 \pm 1737,1
K ⁺ (mg/L)	28,7 \pm 0,9	62,2 \pm 7,8	158,0 \pm 22,7	295,2 \pm 34,0
Ca ²⁺ (mg/L)	29,7 \pm 0,7	72,1 \pm 6,4	186,4 \pm 49,3	340,7 \pm 93,0
Mg ²⁺ (mg/L)	170,9 \pm 11,1	440,0 \pm 18	641,8 \pm 126,9	870,3 \pm 128,8
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	81,7	115,9	422,0	737,5
Alcalinidade (mg/L)	23,5	45,8	105,5	241,0
COD (mg/L)	0.085 \pm 0.063	0.158 \pm 0.072	0.736 \pm 0.113	1.172 \pm 0.098

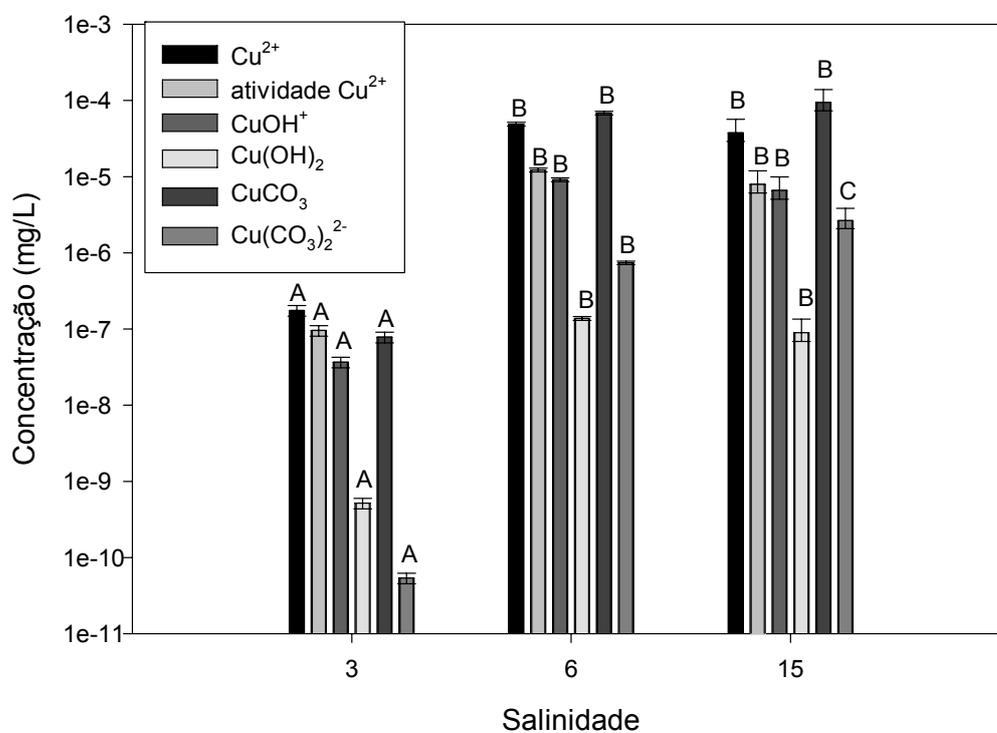


Figura 4- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C quando a concentração letal de cobre para 50% dos indivíduos testados (CL₅₀-48h) na respectiva salinidade foi adicionada ao meio experimental. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre considerando-se os respectivos intervalos de confiança de 95% das CL₅₀-48h. Letras diferentes indicam diferença entre as espécies de cobre nas diferentes salinidades.

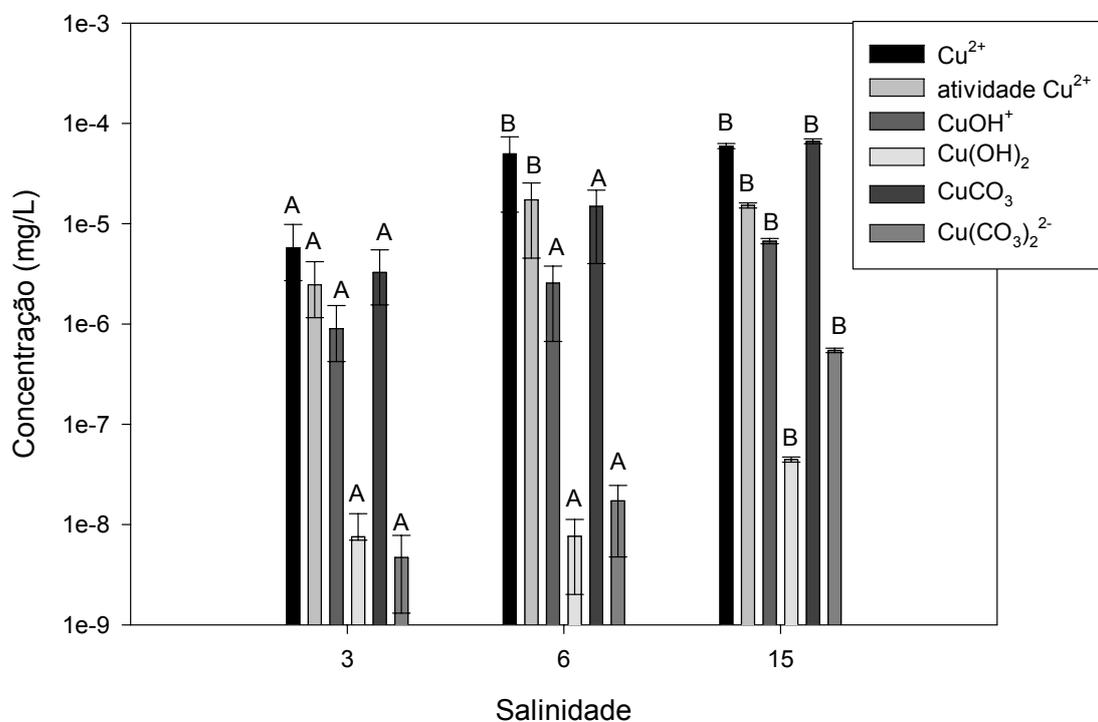


Figura 5- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 10°C quando a concentração letal de cobre para 50% dos indivíduos testados (CL₅₀-48h) na respectiva salinidade foi adicionada ao meio experimental. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre considerando-se os respectivos intervalos de confiança de 95% das CL₅₀-48h. Letras diferentes indicam diferença entre as espécies de cobre nas diferentes salinidades.

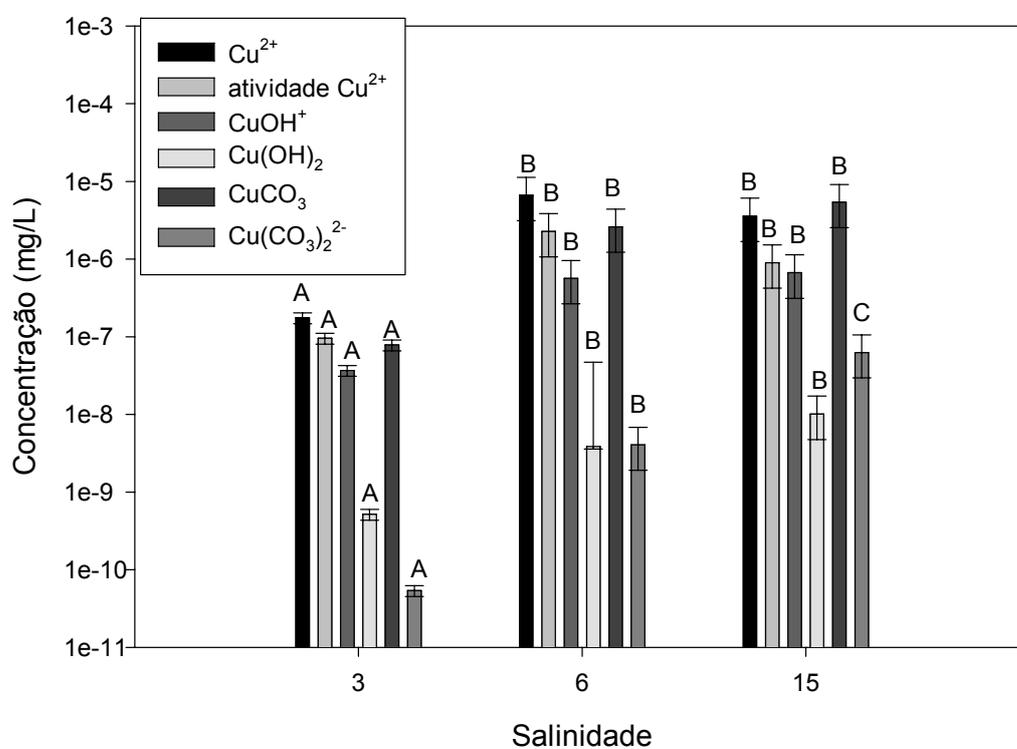


Figura 6- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de 0,658 mg Cu/L, a qual corresponde à CL₅₀-48h na salinidade 3. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre, considerando-se os respectivos intervalos de confiança de 95% das CL₅₀-48h. Letras diferentes indicam diferença entre as espécies de cobre nas diferentes salinidades.

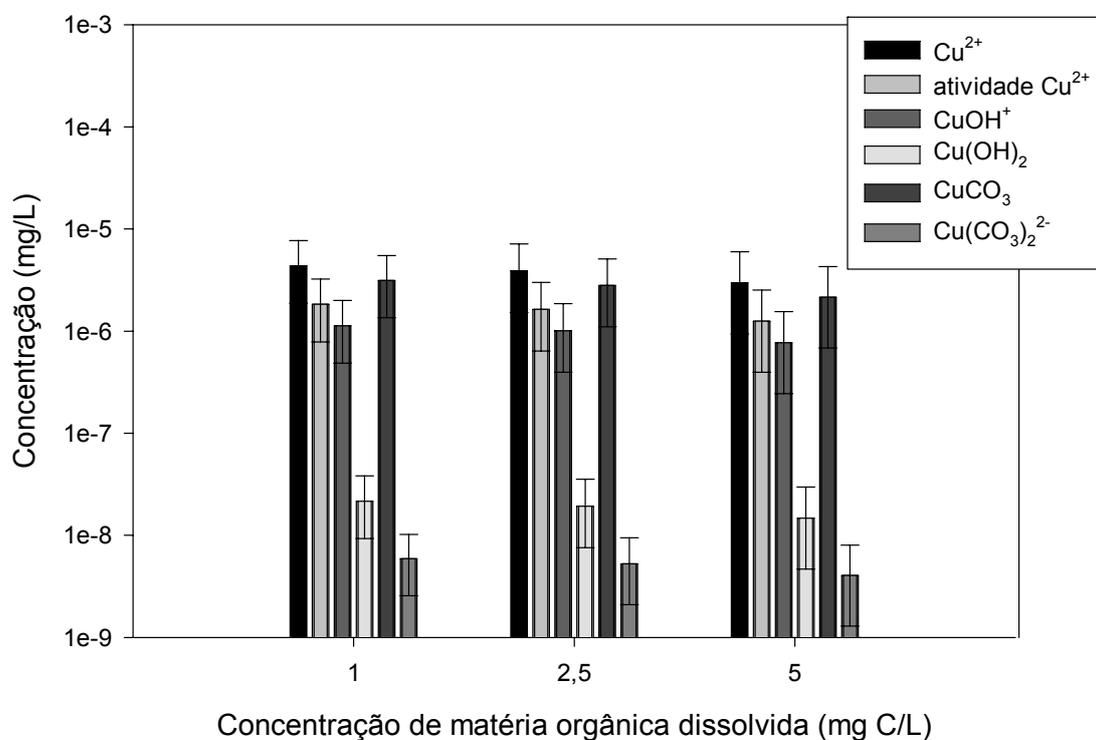


Figura 7- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida e de 0,658 mg Cu/L, a qual corresponde à CL₅₀-48 h na salinidade 3. As barras verticais indicam a variação nas concentrações das espécies de cobre, considerando-se o respectivo intervalo de confiança de 95% da CL₅₀-48 h. Para todas as espécies de cobre, não houve diferença significativa entre as concentrações de matéria orgânica dissolvida.

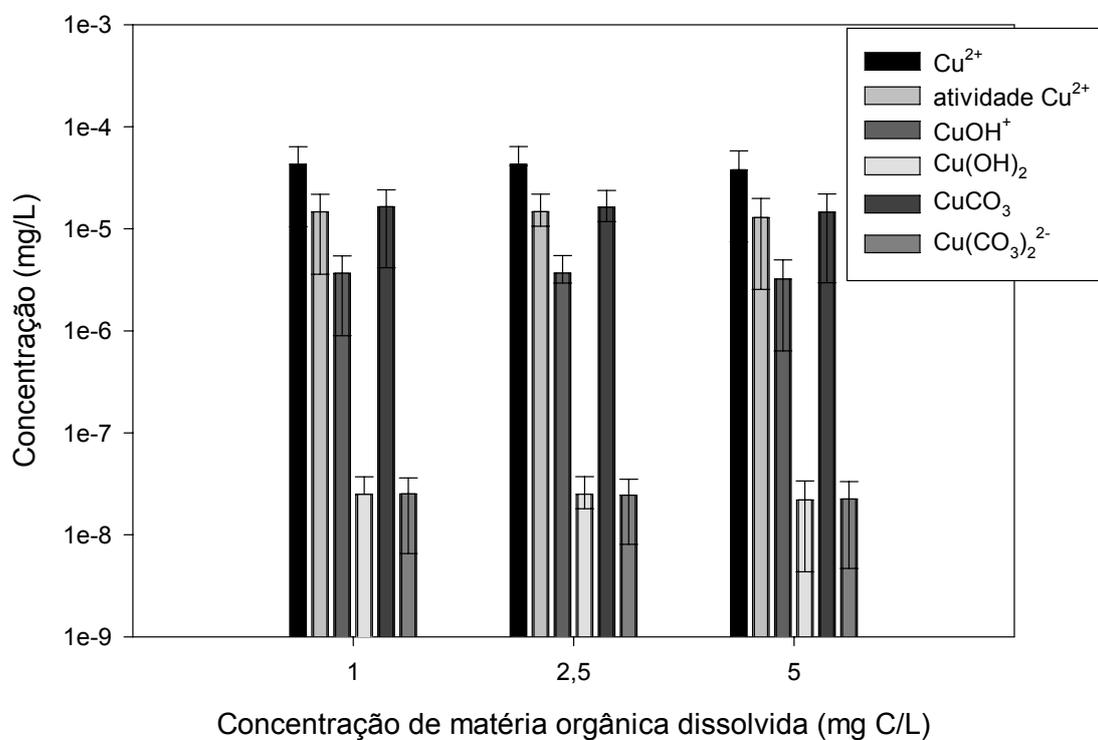


Figura 8- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida e de 9,46 mg Cu/L, a qual corresponde à $\text{CL}_{50-48 \text{ h}}$ na salinidade 6. Para todas as espécies de cobre, não houve diferença significativa entre as concentrações de matéria orgânica dissolvida.

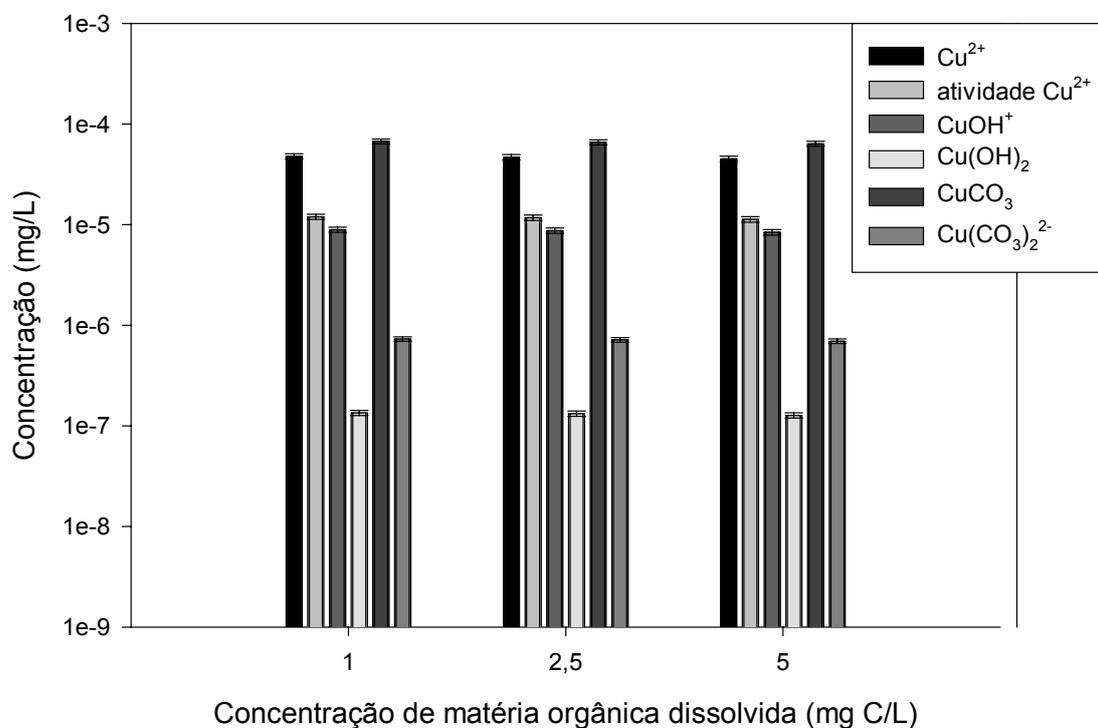


Figura 9- Principais espécies de cobre presentes nos meios experimentais a 20°C na presença de diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida e de 9,54 mg Cu/L, a qual corresponde à CL₅₀-48 h na salinidade 15. Para todas as espécies de cobre, não houve diferença significativa entre as concentrações de matéria orgânica dissolvida.

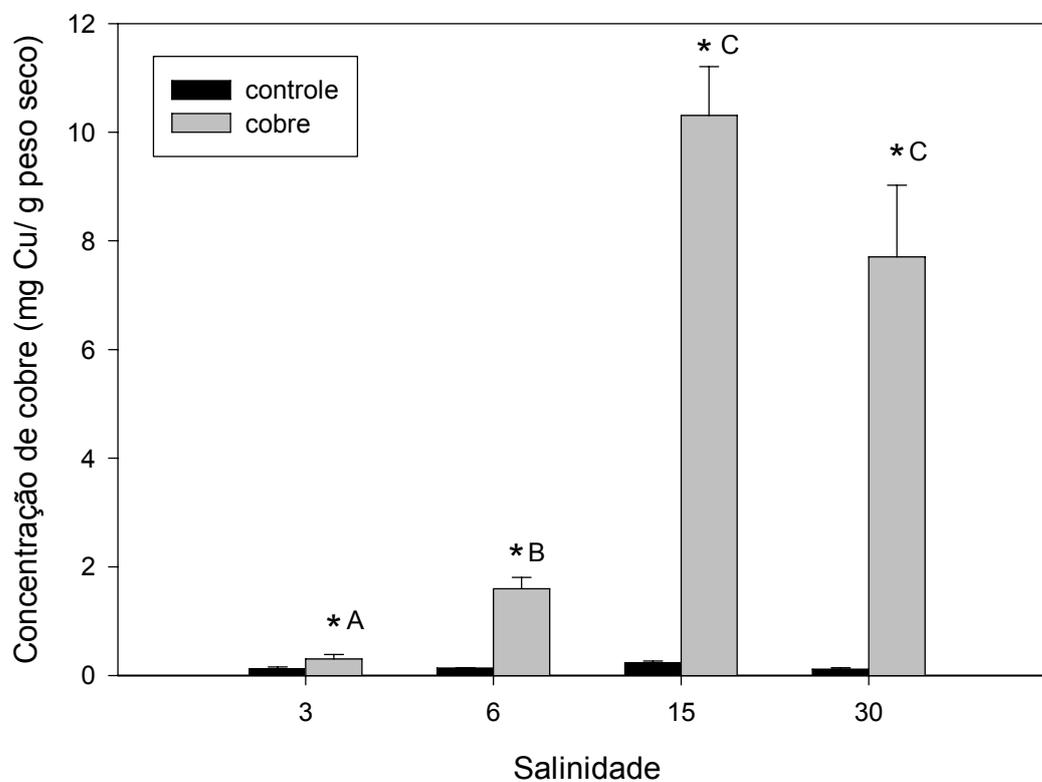


Figura 10- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) às CL_{50} -48h de cobre em diferentes salinidades a 20° C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades para os isópodos expostos ao cobre.

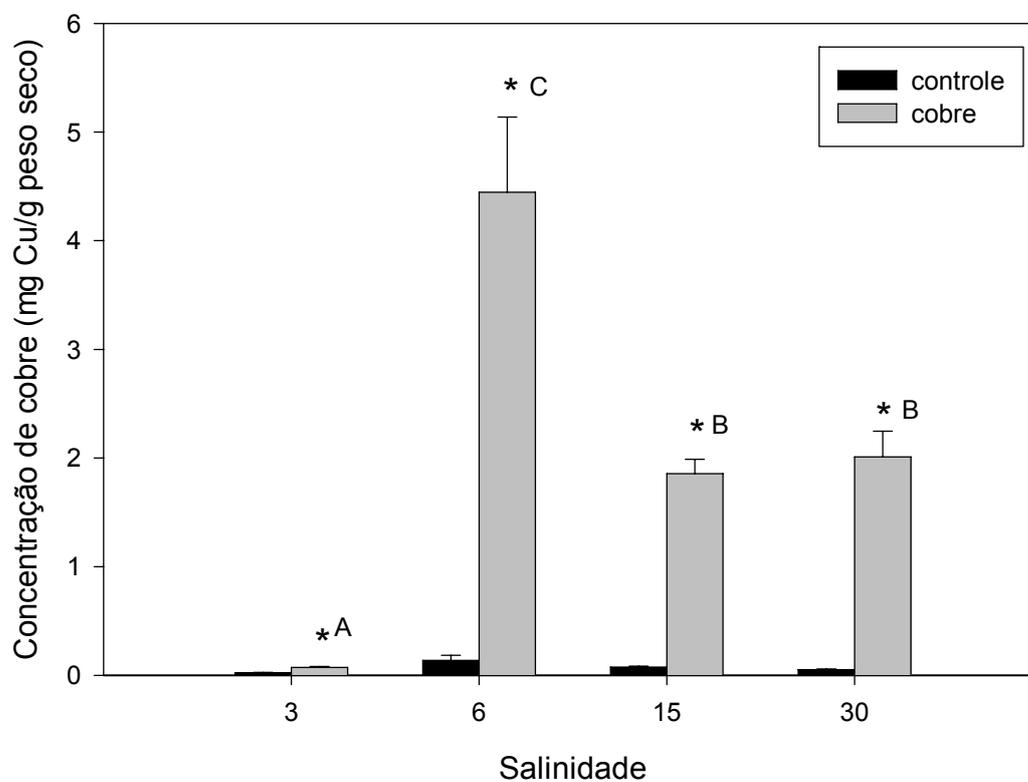


Figura 11- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) às CL_{50} -48h de cobre em diferentes salinidades a 10°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades para os isópodos expostos ao cobre.

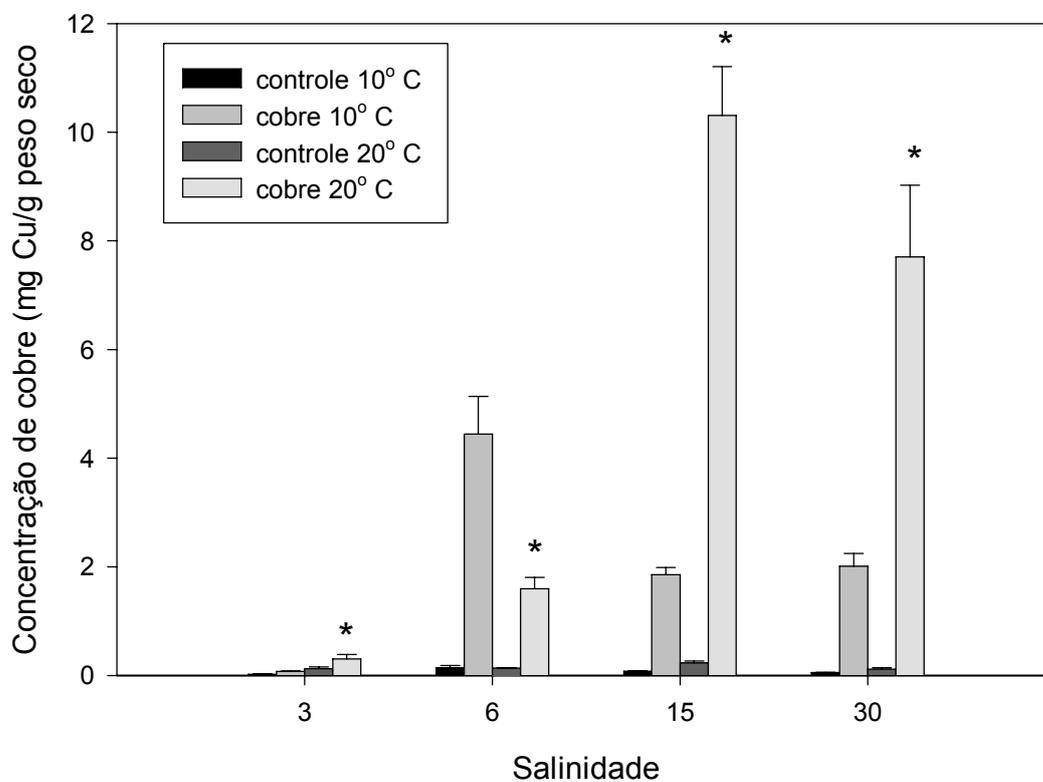


Figura 12- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) às CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades e temperaturas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparados os tratamentos com cobre nas diferentes temperaturas para a mesma salinidade ($P < 0,05$).

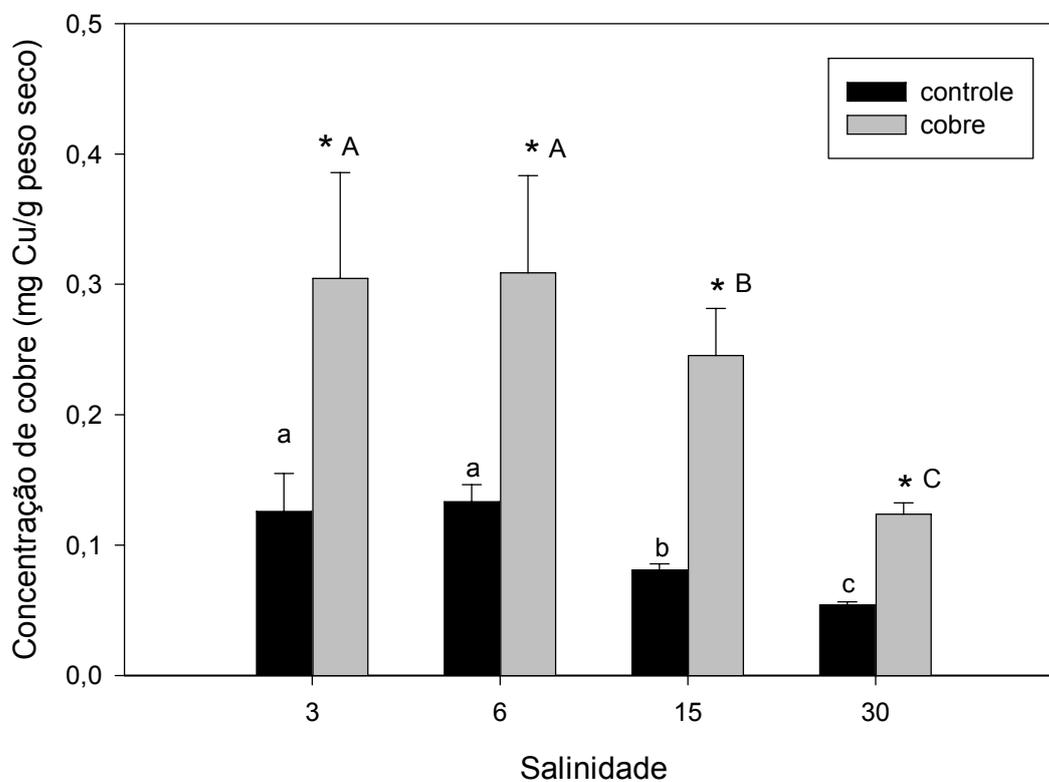


Figura 13- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) a 0,658 mg Cu dissolvido/L (CL₅₀-48h da salinidade 3) em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras minúsculas diferentes indicam à diferença significativa entre os controles. Letras maiúsculas diferentes indicam à diferença significativa entre os tratamentos com cobre. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($P < 0,05$).

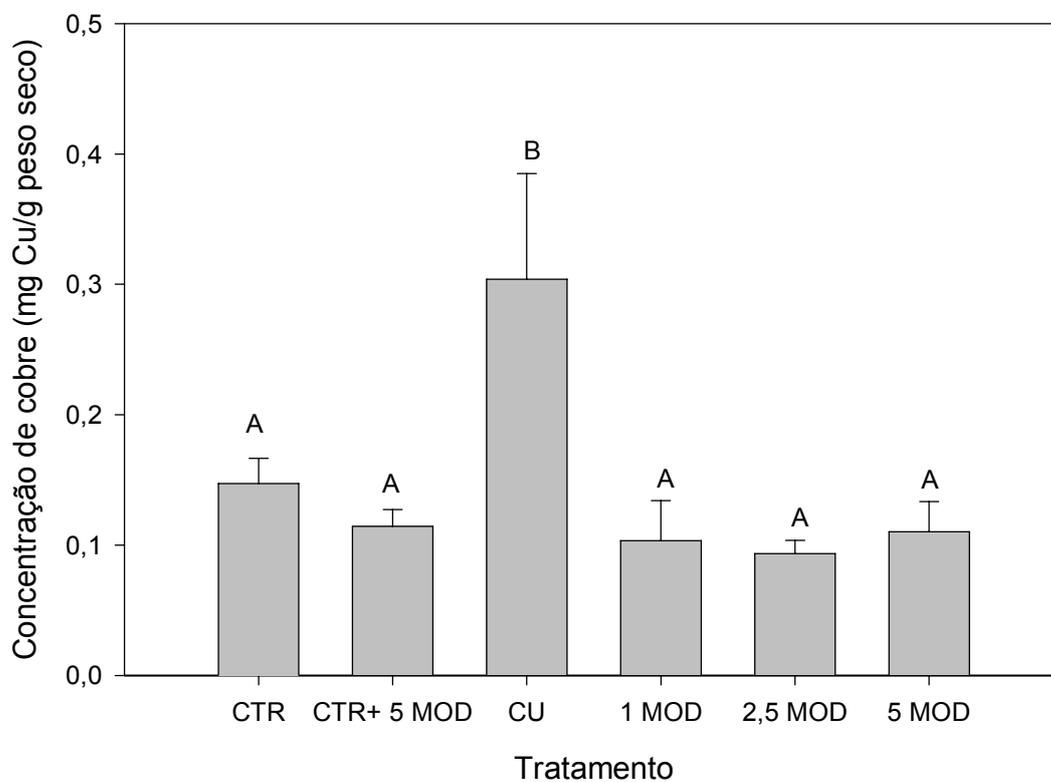


Figura 14- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) a 0,658 mg Cu dissolvido/L, que corresponde a CL_{50-48h} na salinidade 3 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 3 a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.

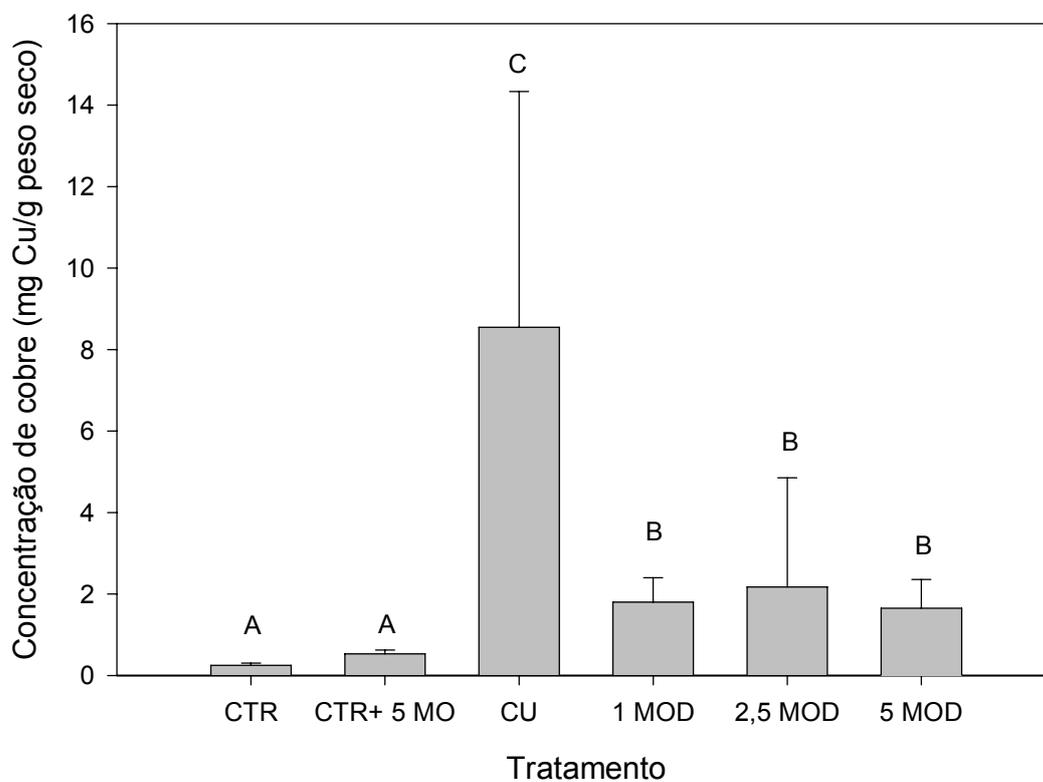


Figura 15- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) a 9,46 mg Cu dissolvido/L que corresponde a CL_{50-48h} na salinidade 6 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 6 a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.

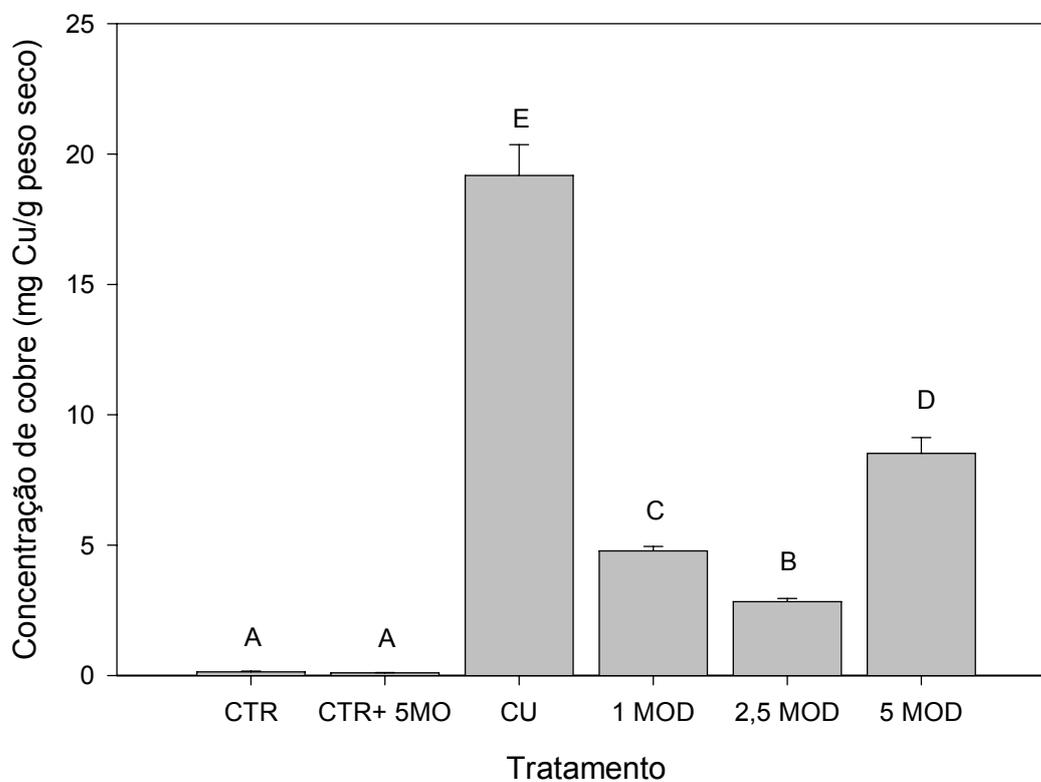


Figura 16- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) a 9,54 mg Cu dissolvido/L, que corresponde a CL_{50-48h} na salinidade 15 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 15 a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.

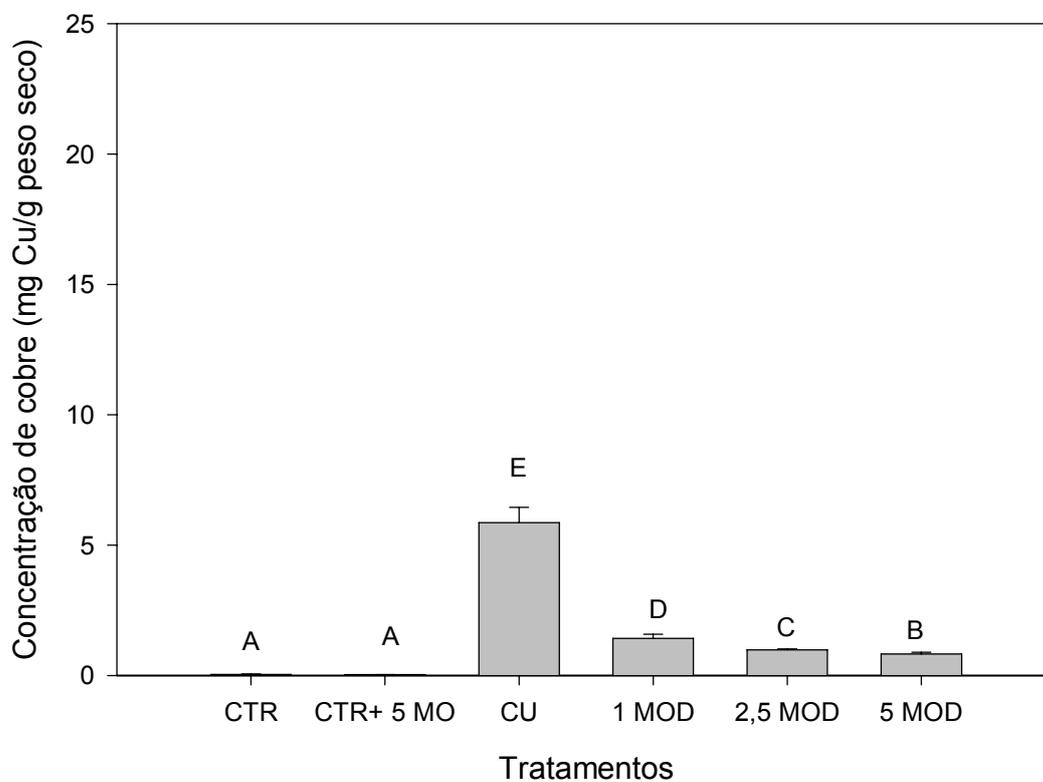


Figura 17- Acumulação de cobre nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) a 11,79 mg Cu dissolvido/L, que corresponde a CL_{50-48h} na salinidade 30 em diferentes concentrações de matéria orgânica dissolvida na salinidade 30 a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam à diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). CTR= controle e MOD= matéria orgânica dissolvida. O valor que precede a MOD indica a concentração da mesma em mg C/L.

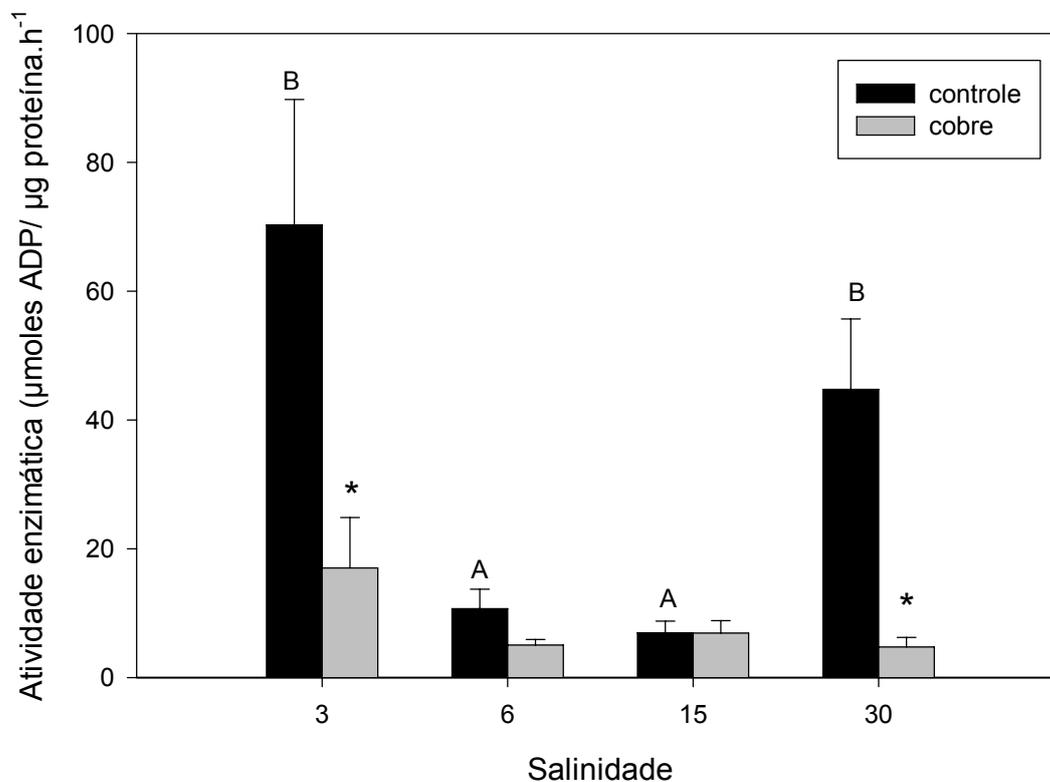


Figura 18- Atividade lamelar da Na⁺,K⁺-ATPase do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) as CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle (p< 0,05). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.

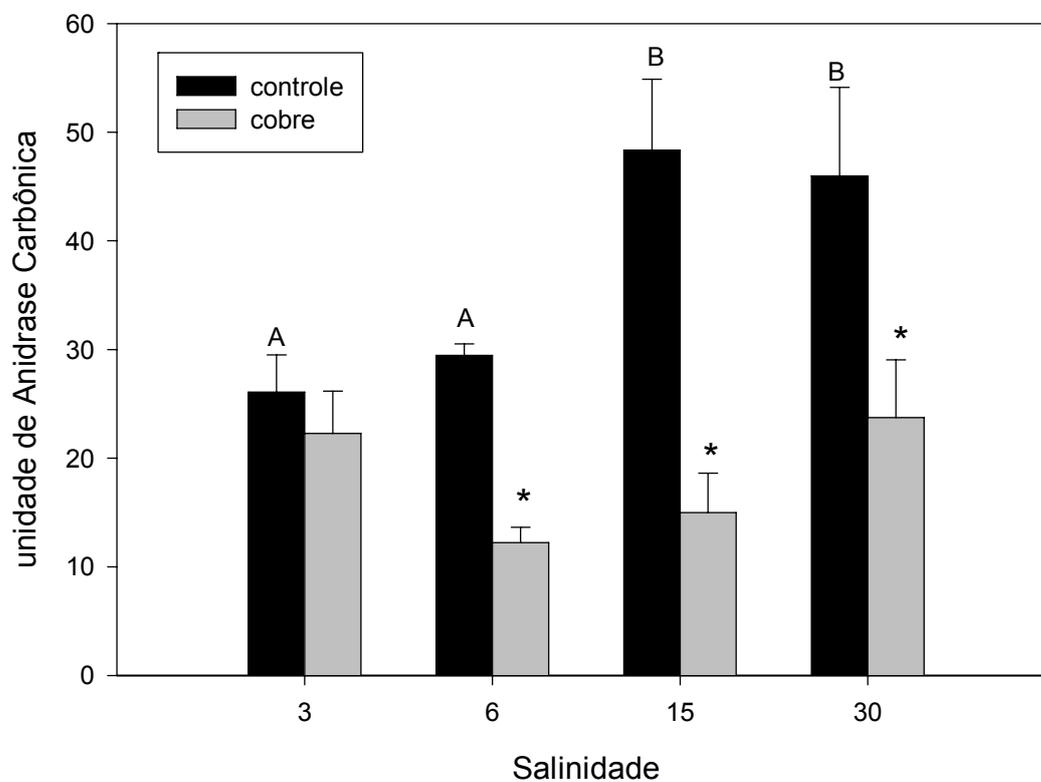


Figura 19- Atividade lamelar da anidrase carbônica do isópodo eurialino *Excirrolana armata* exposto (48h) as CL_{50} -48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.

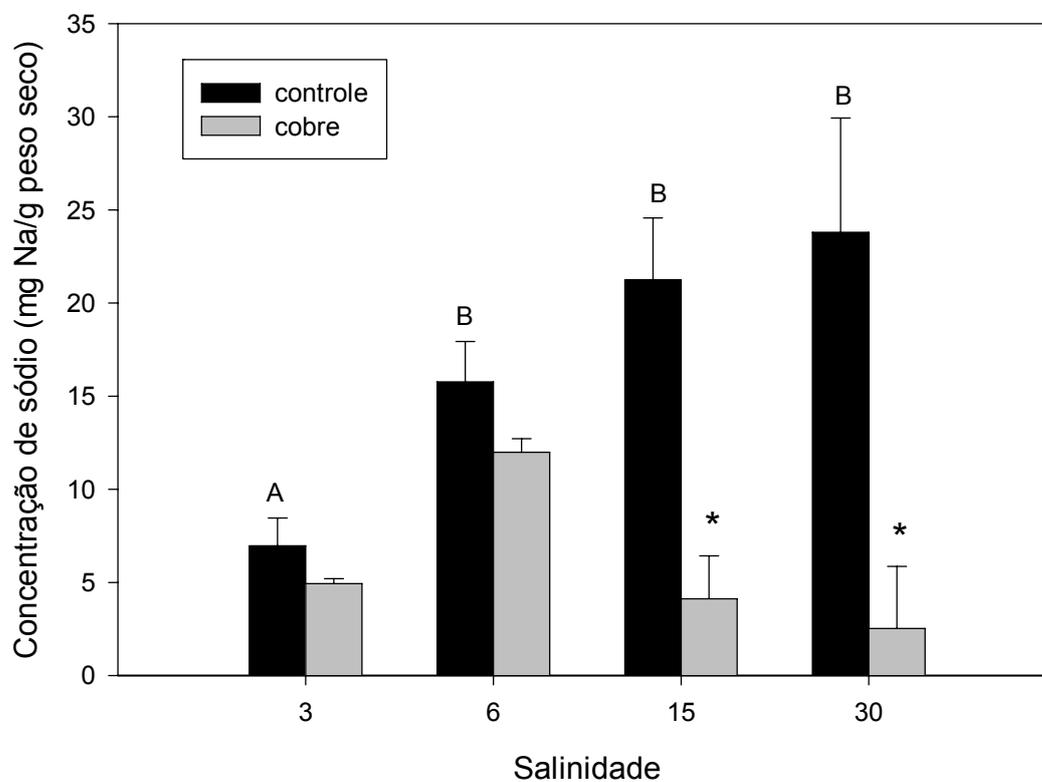


Figura 20- Concentração de sódio nas lamelas do isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) às CL_{50} -48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.

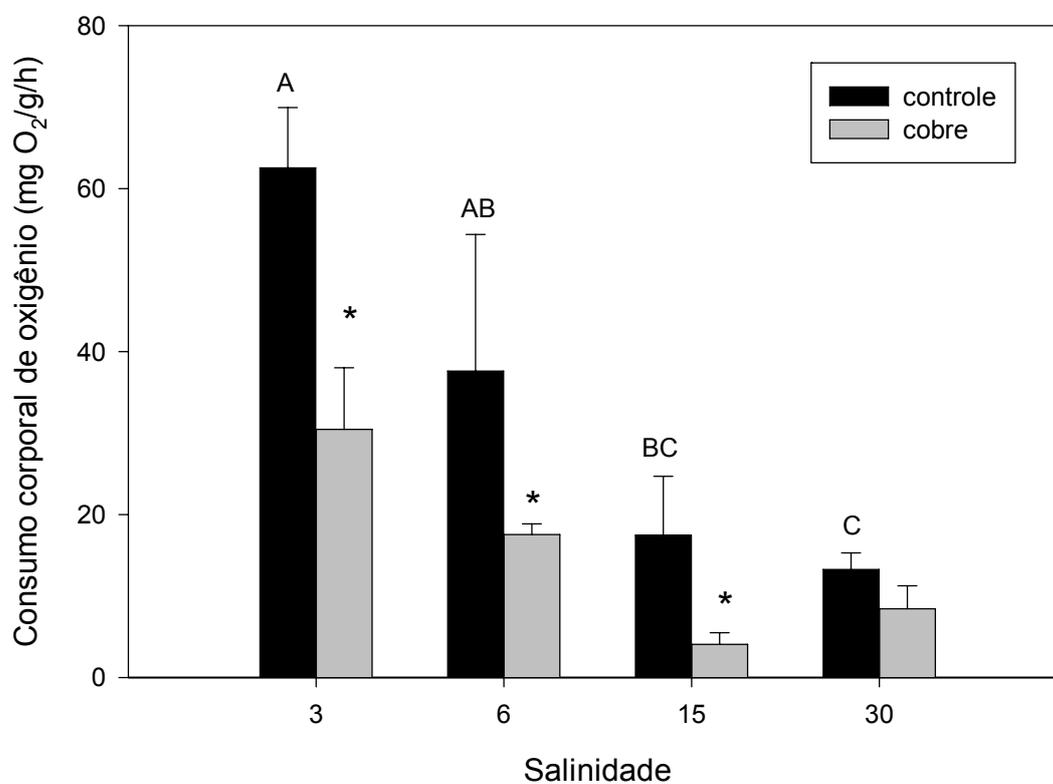


Figura 21- Consumo corporal de oxigênio no isópodo eurialino *Excirolana armata* exposto (48h) as CL₅₀-48h de cobre em diferentes salinidades a 20°C. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão. * indica diferença significativa quando comparado ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes entre as salinidades.

5-DISCUSSÃO

5.1- Especiação do cobre

Uma vez o cobre liberado no ambiente, um complexo conjunto de reações químicas ocorre, e como resultado, o cobre estará presente sob diferentes espécies químicas, isto é, livre e/ou complexado (Morel, 1983; Morel & Herring, 1993; Stumm & Morgan, 1996). Portanto, a avaliação da biodisponibilidade e da toxicidade do cobre está diretamente relacionada com a concentração do metal livre presente no ambiente, mais do que a concentração total ou complexada do metal (Kim *et al.*, 1999). Sendo assim, parâmetros físico-químicos, tais como temperatura, pH e matéria orgânica, têm grande influência na biodisponibilidade e toxicidade do cobre em ambientes aquáticos (Di Toro *et al.*, 2000; Santore *et al.*, 2001).

Os parâmetros físico-químicos da água influenciam muitas das reações que ocorrem no ambiente (Di Toro *et al.*, 2000). De um modo geral, a alcalinidade, o pH, a presença de matéria orgânica (COT-COD) e os íons maiores presentes na água, atuam como agentes protetores contra a toxicidade aguda do cobre em organismos aquáticos. Desta forma, é importante conhecer os níveis destes parâmetros na água, para que seja feita uma avaliação mais adequada da toxicidade e dos efeitos do cobre em organismos aquáticos, sobretudo em ambientes onde a salinidade é variável. A Tabela 1 apresenta as concentrações

dos principais íons da água nas diferentes salinidades testadas, bem como os valores obtidos para os principais fatores que regem os processos químicos no ambiente aquático.

O aumento da alcalinidade propicia a formação de complexos carbonatados de cobre. Embora os complexos formados (CuCO_3 e $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{-2}$) sejam considerados tóxicos, a toxicidade destes é considerada baixa em relação àquela do íon cúprico livre, (Cu^{2+}). Embora o íon cúprico seja considerado um elemento traço, por estar em baixas concentrações no ambiente, tem sido mostrado em vários estudos o envolvimento direto desta espécie na toxicidade do metal em uma série de organismos (Lawson *et al.*, 1995; Erickson *et al.*, 1996; Di Toro *et al.*, 2000; Grosell *et al.*, 2004). O Visual Minteq é uma ferramenta computacional que foi desenvolvida para avaliar os efeitos da química da água na biodisponibilidade e toxicidade do cobre. Esta ferramenta utiliza os dados físico-químicos da água para calcular a especiação do metal no meio. No presente estudo, a especiação do cobre feita utilizando-se o Visual Minteq mostrou que o íon cúprico livre (Cu^{2+}) e o CuCO_3 são as espécies de cobre predominantes nas três salinidades avaliadas (3, 6 e 15) (Figs. 4 a 6).

O aumento da espécie CuCO_3 nas salinidades 6 e 15 pode ser explicado pelo aumento de aproximadamente 2 e 4 vezes, respectivamente no valor da alcalinidade nessas salinidades (6 e 15), em relação a salinidade mais baixa (3). Estes resultados foram observados para ambas as temperaturas testadas (10 e 20°C). Dessa forma, pode-se verificar que a variação da temperatura parece não

exercer influência significativa sobre a química da água, bem como sobre a formação das espécies de cobre, visto que os valores obtidos para cada espécie de cobre em cada salinidade nas duas temperaturas testadas foram semelhantes (Figs. 4 e 5).

Apesar das espécies de cobre Cu^{2+} e CuCO_3 , serem as mais representativas, estas encontram-se em baixas concentrações nas salinidades testadas. Altos valores de pH favorecem a formação de cobre hidroxilado (CuOH^+), tendo um efeito similar ao da alcalinidade na redução da concentração de cobre livre (Cu^{2+}) no ambiente. Com o aumento do pH, a fração de cobre que existe como complexos carbonatados aumenta, limitando a biodisponibilidade do cobre (Paquin, *et al.*, 1999). Além disso, a desprotonação do carbono orgânico dissolvido (COD) em altos níveis de pH, aumenta o complexo cobre-COD, reduzindo a toxicidade do metal. Os resultados apresentados nas Figs. 4 e 5, mostram que para todas as salinidades testadas, em ambas temperaturas, houve a formação de CuOH^+ e de espécies carbonatadas (CuCO_3 e $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{-2}$) na água, como citado anteriormente.

As espécies de cobre encontradas no ambiente aquático e consideradas tóxicas são Cu^{2+} , CuOH^+ e CuCO_3 , sendo esta última a espécie mais abundante em altos níveis de pH (De Schamphelaere *et al.*, 2002). De Schamphelaere *et al.* (2002), verificou ainda que apesar da espécie de cobre CuCO_3 apresentar menor afinidade pelos sítios de ligação no ligante biótico que o íon cúprico livre (Cu^{2+}), este pode ser acumulado e causar danos em diversos tecidos, especialmente em organismos de água doce, como o cladóceros *Daphnia magna*.

Além dos parâmetros acima citados, os íons presentes na água, apesar de não influenciarem a especiação e biodisponibilidade do cobre, também conferem proteção aos organismos aquáticos contra os efeitos tóxicos do cobre. A presença de íons na água, tais como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , são competidores do cobre nos sítios de ligação do metal no organismo. De acordo com dados de Erickson *et al.* (1996), a toxicidade do cobre para o peixe de água doce *Pimephales promelas* diminuiu com o aumento da concentração de cálcio no meio. Como mencionado acima, cátions divalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , competem pelo sítio de ligação na brânquia, reduzindo assim a acumulação do cobre nos seus sítios de ação e conseqüentemente sua toxicidade. Além disso, a presença de agentes complexantes com o cobre, tais como Cl^- , SO_4^{2-} , sulfetos, Br^- e $\text{B}(\text{OH}_4)^-$, também reduzem a biodisponibilidade e conseqüentemente a toxicidade do cobre (Paquin *et al.*, 1999). É importante lembrar que a concentração destes agentes competidores e complexantes aumenta com o incremento da salinidade. De fato, no presente estudo foi estimado que nas salinidades 6 e 15 houve uma maior formação de CuCO_3 em relação à salinidade 3. Além disso, outras espécies de cobre foram formadas nestas salinidades, a partir da complexação com outros elementos presentes no meio (Fig. 6). Este fato resulta na diminuição da competição do cobre pelo sítio de ligação no órgão alvo do cobre no organismo, reduzindo assim sua acumulação e toxicidade. Portanto, estes resultados indicam que a salinidade pode ser considerada um importante agente protetor contra a toxicidade do cobre em organismos aquáticos. Isto explicaria o marcado aumento

dos valores de CL_{50} -48h de cobre, ou seja, menor toxicidade deste metal com o incremento de salinidade descrito por Barcarolli (2004).

A presença de matéria orgânica dissolvida (MOD) e material em suspensão propicia a formação de complexos orgânicos (Cu^{2+} -MOD) e inorgânicos com o cobre, os quais correspondem a quase todo o cobre que está presente nas águas doce e marinha. Portanto, apenas uma pequena fração do cobre está presente na forma dissolvida (Paquin *et al.*, 1999). Assim, a presença de matéria orgânica na água é considerada um agente protetor contra a toxicidade do cobre (Doig & Liber, 2005). Entretanto, os resultados obtidos nas três salinidades avaliadas no presente trabalho (Figs. 7 a 9), indicaram que, mesmo na presença de alta concentração (5mg C/L) de MOD, as espécies de cobre consideradas mais tóxicas (Cu^{2+} , $CuOH^+$ e $CuCO_3$) continuaram sendo as mais representativas.

Tem sido demonstrado que a concentração de MOD é a principal determinante do grau de acumulação de cobre nas brânquias de peixes de água doce (Hollis *et al.*, 1997; Lores & Pennock, 1998) e crustáceos estuarinos e marinhos (Harrys & Santos, 2000; Tao *et al.*, 2001), órgão este considerado o alvo da toxicidade aguda do cobre (Grosell *et al.*, 2002). Os resultados dos testes de acumulação lamelar de cobre no presente estudo corroboram esta idéia. Eles mostram claramente que a presença de MOD, independente da concentração testada (1, 2,5 e 5 mg C/L), reduziu significativamente a concentração de cobre acumulado. No que se refere à toxicidade, diversos estudos mostram que a complexação da MOD com o íon cúprico livre (Cu^{2+}) reduz a quantidade deste íon no meio, diminuindo conseqüentemente a toxicidade do metal. Geralmente, os

ácidos húmico e fúlvico, que constituem grande parte da MOD, são considerados grupos fortes para ligação com o cobre. Além disso, outros trabalhos relatam a importância da MOD como agente protetor contra os efeitos tóxicos do cobre em peixes e crustáceos dulciaquícolas (Kim et al, 1999; Di Toro *et al.* 2000; De Schampelaere *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002).

Com base nos resultados do presente estudo, bem como de outros descritos na literatura (Bianchini & Wood, 2003; Rodrigues 2007; Jorge, 2009), denota-se que os parâmetros que conferem maior proteção contra os efeitos do cobre em águas salobras e marinhas parece estar relacionado com as concentrações dos íons presentes no meio (salinidade). A presença de matéria orgânica dissolvida na água, não altera a especiação do cobre, mas pode ser considerada um importante agente protetor, visto que promove uma diminuição na acumulação lamelar de cobre. Em resumo, as concentrações elevadas de cátions capazes de competir com o cobre pelos sítios de ligação no ligante biológico ou dos ânions de se complexar com este metal nos ambientes estuarinos e marinhos conferem uma proteção contra a acumulação e toxicidade do cobre para os organismos que vivem nestes ambientes, como é o caso do isópodo *E. armata*. Além disso, a matéria orgânica dissolvida presente no ambiente, forma complexos com o cobre, tornando este metal menos disponível à biota, ou alterando sua ligação com o(s) órgão(s) alvo(s). Cabe lembrar ainda que, em ambientes estuarinos e marinhos, a presença de outros ligantes inorgânicos, tais como, sulfatos e sulfetos, também formam complexos, reduzindo assim a toxicidade de metais nestes ambientes (Bianchini & Bowles, 2002).

5.2- Acumulação do cobre

Do ponto de vista biológico, estudos de toxicidade e bioacumulação de contaminantes nos organismos aquáticos, em condições controladas de laboratório é o primeiro passo para avaliar o significado de substâncias químicas com potencial tóxico em todo o sistema aquático (organismos, sedimento, coluna d'água) (Verslycke et al., 2003; Ugolini et al., 2004; Wu & Chen, 2004). Neste contexto, crustáceos têm sido amplamente utilizados para investigar aspectos ecotoxicológicos da contaminação por metais, dentre eles o cobre.

O cobre é um elemento essencial a vida, sendo requerido pelos organismos para uma série de funções fisiológicas. Todos os invertebrados aquáticos podem acumular cobre em seus tecidos. Entretanto, diferentes espécies podem acumular diferentes concentrações de cobre em seus tecidos e órgãos. A bioacumulação celular deste metal envolve um composto ou "ligante" intracelular, precipitação intracelular, metilação, além de outros mecanismos (Kaduková & Vircíkava, 2005). O destino deste metal depende da fisiologia do organismo, do compartimento onde o cobre vai ser utilizado, e de onde este vai se ligar causando toxicidade (Rainbow, 2002). Portanto, a acumulação depende de processos que envolvem a fisiologia do organismo e também de fatores ambientais, tais como salinidade, matéria orgânica dissolvida e temperatura (Giarratano *et al.*, 2007), além da importância da disponibilidade de alimento e da própria qualidade do ambiente (Kraemer *et al.*, 2005).

No presente estudo foi analisada a acumulação de cobre nas lamelas do isópodo *E. armata* em função de diversos parâmetros ambientais, (salinidade, temperatura e MOD). Em todas as salinidades testadas, houve acumulação significativa de cobre quando os isópodos foram expostos à CL₅₀-48 h de cada salinidade a 20°C (Fig. 10). Nos testes realizados a 10°C também foi observada um aumento significativo na acumulação lamelar de cobre na faixa de salinidade testada (Fig. 11). Neste contexto, cabe ressaltar que o cobre presente no ambiente aquático é um competidor com outros cátions, tais como o Na⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺, pelos mecanismos de captação destes no órgão de regulação iônica/osmótica (brânquias/lamelas) (Grosell *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002).

Através dessa competição é que o cobre pode ser captado através das brânquias (lamelas) e causar toxicidade. Outra via de captação de cobre é através da ingestão de alimentos previamente contaminados pelo metal. Grosell *et al.* (2004) relataram que em peixes marinhos, as brânquias e o intestino são os principais epitélios responsáveis por exibir efeitos diretos da acumulação do cobre. Uma vez que no presente estudo os isópodos não se alimentaram durante a exposição ao cobre, a acumulação observada nas lamelas destes animais deve ter sido resultado dos processos de competição do metal pelos mecanismos lamelares de captação de cátions.

No que se refere aos efeitos da temperatura, na acumulação lamelar de cobre em diferentes salinidades, verificamos que houve um aumento na acumulação lamelar de cobre nas duas temperaturas testadas (10 e 20°C) (Fig.

12). Entretanto, observa-se que, de forma geral, a acumulação foi maior na temperatura de 20°C. De acordo com Wang *et al.* (2006), a temperatura é considerada um dos mais importantes fatores físicos que influenciam nos processos fisiológicos. Diversos estudos têm mostrado que em baixas temperaturas há uma redução na captação ativa de íons através das brânquias (Yamane, 1995; Wang *et al.*, 2006). Portanto, a maior acumulação a 20°C pode ser explicada pela fisiologia dos organismos, visto que a química da água e a especiação do cobre foi semelhante para as duas temperaturas testadas.

Quanto à salinidade, diversos autores já demonstraram que a salinidade atua como um fator de proteção contra a toxicidade do cobre (Grosell *et al.* 2002; Grosell *et al.*, 2007; Giarratano *et al.*, 2007). Esse fato se deve principalmente às altas concentrações de cátions presentes em salinidades elevadas, capazes de competir com o cobre pelos sítios de ligação no ligante biótico dos organismos. Como mencionado anteriormente, o Na⁺, o Ca²⁺ e o Mg²⁺ são os principais íons que competem com o cobre. Além disso, ânions tais com cloretos, sulfatos e bicarbonatos, podem se complexar com o cobre, tornando o metal menos disponível à biota. Dessa forma, a biodisponibilidade do cobre presente em ambientes aquáticos torna-se menor à medida que há um incremento na concentração destes elementos com o aumento da salinidade (DiToro *et al.*, 2000; Paquin *et al.*, 1999; Santore *et al.*, 1999). Este fato é corroborado pelos resultados de acumulação de cobre nas lamelas de *E. armata* expostas a 0,658 mg Cu/L em uma ampla faixa de salinidade (Fig. 13). Neste caso, observa-se que em todas as

salinidades houve acumulação lamelar de cobre. Este resultado também foi observado por diversos autores em brânquias de peixes e crustáceos expostos ao cobre (Kraemer *et al.*, 2005; Grosell *et al.*, 2007). No presente estudo, à medida que a salinidade aumentou a acumulação de cobre nas lamelas diminuiu, uma vez que a concentração dos agentes competidores e complexantes do cobre aumentou no meio. Dessa forma, a maior quantidade de íons presentes na água nessas salinidades reduziu a captação de cobre através das lamelas. De fato, McGeer *et al.* (2000) avaliaram os efeitos do cobre na truta arco-íris e verificaram que a presença deste metal no meio foi responsável pela redução da captação branquial de Na^+ e Ca^{2+} .

A matéria orgânica dissolvida (MOD) inclui vários compostos orgânicos que apresentam moléculas tanto hidrofóbicas, quanto hidrofílicas. Além disso, apresentam também grupos carboxílicos e fenólicos. Esses grupos fenólicos são lipossolúveis e, portanto, podem atravessar com maior facilidade as membranas biológicas (Matsuo *et al.*, 2004). De acordo com VanGenderen *et al.* (2003) estudos relacionados a presença de matéria orgânica nas águas superficiais são de grande importância devido ao fato da sua presença alterar o transporte a distribuição e a toxicidade dos metais.

No presente trabalho, foi avaliada a influência da MOD na acumulação lamelar de cobre, na faixa de salinidade testada. Foi verificado que a presença de MOD independente da sua concentração reduziu significativamente a acumulação de cobre nas lamelas dos isópodos expostos nas salinidades 3, 6, 15 e 30 (Figs. 14-17). De fato, a presença de compostos orgânicos na água reduz a atividade do

íon cúprico (Cu^{2+}), através da complexação, agindo como tamponante do metal em águas naturais (Lorenzo *et al.*, 2008). Diversos estudos já mostraram a capacidade que a matéria orgânica natural possui em complexar o cobre. Esta elevada afinidade é devido ao fato de que a matéria orgânica natural possui sítios específicos de ligação para este metal (Louis *et al.*, 2009). Entretanto, para melhor avaliar a complexação do cobre-MOD deve-se levar em consideração o tipo de matéria orgânica presente no meio e não somente sua concentração. Sabe-se que a matéria orgânica apresenta diferentes frações, sendo os ácidos húmicos e fúlvicos os mais representativos. A abundância relativa destas frações varia consideravelmente entre diferentes tipos de ambientes, resultando em importantes diferenças quanto à complexação do metal (De Schamphelaere *et al.*, 2003).

5.3- Mecanismo de toxicidade do cobre

A habilidade em ocupar certos corpos de água depende da capacidade das espécies em regular suas concentrações iônicas internas dentro de certos limites de tolerância (Brooks & Mills, 2006). De um modo geral, os crustáceos apresentam essa habilidade, ou seja, são capazes de se adaptar a uma ampla faixa de salinidade, assim como a uma série de outros fatores. Através da osmorregulação hemolinfática é que estes organismos são capazes de manter suas funções vitais normais. Dessa forma, a capacidade osmorregulatória vem

sendo utilizada como ferramenta na determinação das condições fisiológicas dos organismos na presença de agentes estressores. Neste contexto, cabe salientar que o cobre é capaz de se ligar às membranas biológicas, promovendo distúrbios iônicos e osmóticos em animais aquáticos (Giarratano *et al.*, 2007).

Sabe-se que a regulação da pressão osmótica em crustáceos é dependente, principalmente, da manutenção da concentração de íons como o Na^+ e o Cl^- , que representam de 80 a 90% da osmolaridade hemolinfática (Pan *et al.*, 2007) A ionorregulação em crustáceos é resultado da atividade de enzimas como a Na^+, K^+ -ATPase, H^+ -ATPase, HCO_3^- -ATPase, anidrase carbônica, além de uma série de outras enzimas e transportadores de íons presentes nas membranas celulares (Skaggs & Henry, 2002; Lucu & Towle, 2003; Kirschner, 2004).

No presente estudo, foi observada uma maior atividade da Na^+, K^+ -ATPase lamelar nos isópodos dos grupos controles nas salinidades mais extremas (3 e 30) (Fig. 18). Brooks & Mills (2006) também observaram uma maior atividade enzimática no anfípodo *Gammarus pulex* na maior diluição do meio que estes organismos puderam tolerar, ou seja, na água doce. Castilho *et al.* (2001) também verificaram uma maior atividade desta enzima em baixas salinidades no caranguejo *Neohelice granulata*. Esta atividade elevada coincide com o aumento do gradiente osmótico, implicando no aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, a qual está envolvida na captação ativa de sódio em ambientes diluídos. Por sua vez, a alta atividade enzimática nos isópodos do grupo controle na salinidade 30 sugere que *E. armata* pode estar hiporregulando a concentração osmótica hemolinfática nesta salinidade. Em resumo as maiores atividades da Na^+, K^+ -

ATPase lamelar em *E. armata* estariam associadas a um padrão de hiperregulação da espécie em função da salinidade. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que *E. armata* mantém uma elevada concentração lamelar de Na^+ , mesmo em salinidades reduzidas (salinidade 3) e que esta concentração não se altera significativamente em salinidades elevadas (30) quando comparada com salinidades intermediárias (6 e 15) (Fig. 20).

No presente estudo foi observada uma inibição significativa da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase lamelar nos isópodos expostos ao cobre nas salinidades 3 e 30 (Fig. 18). Brooks & Mills (2003) também relataram uma inibição da atividade desta enzima após exposição do anfípodo *Gammarus pulex* ao cobre em água doce. Láuren & McDonald (1987) também observaram inibição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase branquial na truta arco-íris *Salmo gairdneri* após exposição ao cobre, seguida de redução da captação branquial de sódio em água doce.

De acordo com Gilles & Péqueux (1983), os mecanismos de transporte iônico através das brânquias de crustáceos são afetados quando estes são expostos ao cobre, resultando em sérias alterações do controle osmótico das células e dos fluídos corpóreos. Além disso, os metais são conhecidos por terem alta afinidade com grupamentos sulfidrilas, os quais estão presentes em proteínas e, sobretudo, em enzimas. Dependendo do local de interação com o metal, a atividade da enzima pode ser inibida. Brooks & Mills (2003) relataram que grupos sulfidrilas podem ser oxidados por metais, alterando assim a estrutura tridimensional das proteínas e, portanto, das enzimas.

Conforme descrito anteriormente, a Na^+, K^+ -ATPase tem um papel central nos processos de ionorregulação em animais aquáticos, em particular nos crustáceos (Towle *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2007), como o isópodo eurialino *E. armata*. A captação de sódio através das brânquias é essencial para a homeostasia de qualquer organismo aquático (Grosell *et al.*, 2002). Em peixes de água doce, por exemplo, esse mecanismo é utilizado para compensar as perdas difusivas de sódio dos fluidos extracelulares (de 100 a 200 mM) para o ambiente (1 mM). O mecanismo de entrada de sódio via membrana apical das brânquias se dá principalmente através da troca por próton (H^+). Esse próton é produto da hidratação do CO_2 realizada pela anidrase carbônica (Henry, 1996), que faz a conversão do CO_2 e H_2O em HCO_3^- e H^+ . Além disso, a Na^+, K^+ -ATPase tem papel fundamental neste processo. Esta enzima é responsável pela geração do potencial eletroquímico da célula, favorecendo o influxo de sódio, via membrana apical (Towle, 2001; Grossel *et al.*, 2002).

De acordo com Lawson *et al.* (1995), a integridade estrutural da membrana é essencial para o funcionamento correto das trocas iônicas e a osmorregulação, e conseqüentemente para a saúde de animais de respiração branquial. O desarranjo das membranas apical e basolateral deste órgão reduz a área de interface livre para trocas e pode reduzir as capacidades iônicas e osmoregulatórias dos organismos.

Bambang *et al.* (1995) verificaram que alterações nas concentrações iônicas hemolinfáticas, resultando na perda total ou parcial da capacidade hiperregulatória, são originárias da inibição direta da atividade da Na^+, K^+ -ATPase

branquial. Trabalhos realizados por Láuren & MacDonald (1985) e Sola *et al.* (1995) mostraram que peixes expostos ao cobre tiveram suas concentrações plasmáticas de sódio reduzidas devido a diminuição da captação deste íon através das brânquias. Estas disfunções ionorregulatórias estão associadas a danos no epitélio branquial, tanto em crustáceos (Nonnote *et al.*, 1993), quanto em peixes (Sola *et al.*, 1995). Portanto, a exposição aguda a altas concentrações de cobre, é capaz de inibir a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em peixes e crustáceos de água doce. Esta inibição está diretamente relacionada com a redução da concentração hemolinfática de sódio e também as baixas taxas de captação deste íon em água doce (Hansen *et al.*, 1992). Em peixes, Grosell & Wood (2002) relataram que apenas 2 h de exposição a baixas concentrações de cobre já é capaz de induzir uma redução significativa do transporte branquial de sódio, indicando uma competição entre o cobre e o sódio pelo mesmo sistema de transporte em nível branquial.

No presente estudo, a inibição da Na^+, K^+ -ATPase lamelar dos isópodos pelo cobre na salinidade 3 foi seguida de uma tendência de redução na concentração de sódio neste tecido (Fig. 20). Esta tendência de redução na concentração lamelar de sódio é compatível com a significativa redução da concentração corporal de sódio associada à uma inibição significativa da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em *E. armata* exposto (48h) à CL_{10} -48h na salinidade 1,5 (Barcarolli, 2004). Estes resultados indicam claramente que o mecanismo de toxicidade do cobre no isópodo eurialino *E. armata* na salinidade 3 é semelhante àquele observado em peixes e crustáceos de água doce, a saber, um distúrbio

iônico/osmótico devido a redução na captação de sódio em nível lamelar em função da inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase lamelar induzida pela exposição ao cobre.

Com relação à salinidade 6, não foi observado efeito significativo do cobre na atividade da Na^+, K^+ -ATPase, ao contrário do que foi relatado por Books & Mills (2006), no anfípodo *D. villosus* nesta mesma salinidade. A ausência de inibição enzimática foi acompanhada de uma ausência de redução significativa na concentração lamelar de sódio após exposição ao cobre na salinidade 6 (Fig. 20). Blanchard & Grossel (2006), também não observaram alterações nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos do peixe *Fundulus heteroclitus* exposto ao cobre em salinidades intermediárias. Estes resultados podem ser explicados considerando o reduzido gradiente de sódio entre a hemolinfa e o meio. Neste contexto, fica evidente que a toxicidade do cobre na salinidade 6 não está associada a distúrbios iônicos/osmóticos em *E. armata*. Portanto, outro mecanismo de toxicidade deve ser considerado. Este ponto será abordado mais adiante de forma integrada com os resultados obtidos nas salinidades 15 e 30.

Com relação à salinidade 15, não houve inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase lamelar. Entretanto, foi verificada uma redução na concentração lamelar de sódio pela exposição ao cobre nesta salinidade (Fig. 20). Cabe ressaltar que uma redução significativa da concentração corporal de sódio associada a uma inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi observada após exposição de *E. armata* ao cobre na salinidade 15 (Barcarolli, 2004). Bambang *et al.* (1995) também verificaram uma redução na concentração branquial de sódio (80% após

4 dias e 90% após 6 dias de exposição) no siri *C. maenas* exposto ao cobre na salinidade 15. Este resultado sugere que outras proteínas transportadoras sensíveis ao cobre estejam envolvidas na regulação da concentração lamelar de sódio. Esta hipótese está baseada no fato de que a regulação de sódio branquial (lamelar) pode envolver também os canais de Na^+ , o trocador Na^+/H^+ e o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, presentes na membrana apical das células.

Na salinidade 30, a exposição ao cobre promoveu inibição significativa da atividade da Na^+,K^+ -ATPase (Fig. 18). Barcarolli (2004) demonstrou que a atividade enzimática em nível corporal também foi inibida pela exposição ao cobre nesta salinidade. Por sua vez, Pan *et al.*, (2007) também observaram uma inibição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase branquial em pós larva do camarão *Litopenaeus vannamei*, exposto ao cobre na salinidade 30. Estes resultados sugerem que o mecanismo de toxicidade do cobre poderia estar associado a distúrbios iônicos e osmóticos, afetando a capacidade hipo-regulatória de *E. armata* em salinidade elevada (30). No entanto, um possível efeito do cobre sobre os mecanismos de hiporegulação deveriam induzir a um aumento da concentração lamelar/corporal de sódio. Porém, no presente estudo foi observada uma redução significativa da concentração lamelar de sódio após exposição ao cobre (Fig. 20). Além disso, Barcarolli (2004) demonstrou que a concentração corporal de sódio em *E. armata* não foi alterada pela exposição ao cobre na salinidade 30. Estes resultados, associados àqueles descritos para a salinidade 15 sugerem que em águas salobras (salinidade 15) e marinhas (salinidade 30) o cobre provoca distúrbios iônico regulatórios (Na^+), como observado em águas diluídas (salinidade 3), porém

estes distúrbios não estariam associados à alteração na atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Este fato, associado à ausência de efeitos do cobre na concentração de sódio e na atividade da Na^+, K^+ -ATPase lamelar de *E. armata* na salinidade 6, sugere que outras moléculas envolvidas no transporte e regulação do Na^+ em nível lamelar poderiam estar sendo afetadas pelo cobre. Como mencionado anteriormente, a captação de Na^+ branquial/lamelar pode envolver além da Na^+, K^+ -ATPase, os canais de Na^+ , o trocador Na^+/H^+ e o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. Neste contexto, é importante lembrar que a captação de Na^+ via trocador Na^+/H^+ é altamente dependente da disponibilidade celular de prótons (H^+), o qual é gerado a partir da hidratação do CO_2 sob ação da anidrase carbônica.

A anidrase carbônica catalisa a hidratação reversível do CO_2 formando H^+ e HCO_3^- como produtos, os quais estão envolvidos nos mecanismos de transporte iônico, tanto de cátions quanto de ânions (Skaggs & Henry, 2002), além de participar do equilíbrio ácido-base, manutenção do pH intracelular (Henry, 1996) e excreção do CO_2 (Genovese *et al.* 2005). Esta enzima está presente em todos os organismos e a isoforma presente no citoplasma celular apresenta importância fundamental nos processos de osmorregulação de invertebrados aquáticos, assegurando aos crustáceos eurialinos a habilidade de sobrevivência em uma ampla faixa de salinidade (Henry & Cameron, 1982; Serrano *et al.*, 2007). Além da sua participação na ionorregulação, esta enzima tem também papel importante na respiração dos crustáceos. A isoforma da enzima responsável por este processo está associada à membrana basal, voltada para a hemolinfa. Ela é responsável

por facilitar a excreção de CO_2 pelas brânquias, através da mobilização do HCO_3^- presente na hemolinfa, mantendo assim, o gradiente adequado de pressão do CO_2 (P_{CO_2}) através das lamelas branquiais (Henry, 1987).

No presente estudo, a metodologia utilizada para determinar a atividade da anidrase carbônica lamelar não possibilita a distinção das atividades das diferentes isoformas (regulatória e respiratória). Os resultados obtidos indicaram uma maior atividade desta enzima nos isópodos dos controles nas salinidades mais elevadas (15 e 30) (Fig. 19). No entanto, observa-se que o consumo de oxigênio foi menor nestas salinidades (Fig. 21), o que poderia sugerir uma maior atividade da isoforma ionorregulatória em salinidades elevadas (15 e 30). Portanto, uma inibição da atividade da anidrase carbônica em isópodos expostos ao cobre em altas salinidades poderia explicar os distúrbios observados na regulação da concentração lamelar de Na^+ induzidos pela exposição ao cobre.

No presente estudo foi verificado o efeito do cobre sobre a atividade da anidrase carbônica em uma ampla faixa de salinidade. Em todas as salinidades houve redução da atividade desta enzima, exceto na salinidade mais baixa (3). Uma inibição enzimática induzida pelo cobre sugere uma menor capacidade de geração de prótons (H^+), o que poderia afetar a captação do Na^+ a partir do meio, explicando assim a redução significativa da concentração lamelar de sódio após exposição ao cobre observada nas salinidades mais elevadas (Fig. 20). Esta hipótese está baseada no fato de que as maiores atividades da anidrase carbônica estiveram associadas aos menores valores de consumo corporal de oxigênio, ou

seja, nas salinidades 15 e 30, sugerindo um maior envolvimento da enzima nos processos ionorregulatórios nestas salinidades

A inibição da anidrase carbônica se dá principalmente pelo fato do cobre se ligar às pontes de hidrogênio, uma porção da estrutura da enzima, e não no sítio específico onde ocorre a hidratação do CO₂ (Skaggs & Henry, 2002). O mecanismo exato de como o metal afeta as pontes de hidrogênio ainda é desconhecido (Skaggs & Henry, 2002).. No que se refere ao consumo corporal de oxigênio, este tem sido usado como um indicador das condições metabólicas dos organismos (Giarratano *et al.*, 2007). Como descrito no presente estudo para *E. armata* (Fig. 21), Dalla Vía (1986) e Lemos *et al.* (1997) também observaram um incremento no consumo de oxigênio quando os organismos foram expostos à baixas salinidades. Esta resposta pode estar associada à uma maior necessidade de energia para manutenção dos processos osmorregulatórios, visando compensar as perdas difusivas em ambientes diluídos (Péqueux, 1995; Garnacho *et al.*, 2001; Pistole *et al.*, 2008)

Além da influência da salinidade no consumo corporal de oxigênio, os resultados do presente estudo mostraram uma redução do consumo de oxigênio pela exposição ao cobre nas salinidades 3, 6 e 15, em relação aos seus respectivos controles. Diversos autores sugerem que esta redução no consumo de oxigênio induzido pela exposição aguda ao cobre pode estar relacionada a mudanças estruturais na superfície branquial (lamelar), além da inibição de enzimas envolvidas na cadeia respiratória (Krishnakumar *et al.*, 1987; Anandraj *et al.*, 2002). Outros autores, também sugerem que danos celulares poderiam estar

relacionados a esta diminuição no consumo corporal de oxigênio, pelo fato das brânquias (lamelas) serem o alvo principal dos metais presentes na água (Socgianto *et al.*, 1999; Wu & Chen, 2004).

Com base no exposto acima, fica evidente que os efeitos tóxicos induzidos pelo cobre no isópodo *E. armata* pode ser resultado de uma combinação de efeitos diretos do metal sobre as moléculas envolvidas nos processos ionorregulatórios. Além desse fato, o cobre promove efeitos indiretos associados à redução de disponibilidade de energia, evidenciado no presente estudo pela redução no consumo corporal de oxigênio, para a adequada manutenção destes processo ionorregulatórios.

6- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que:

- As variações nas propriedades químicas da água não são capazes, por si só, de explicar os diferentes níveis de acumulação lamelar de cobre, e de sensibilidade do isópodo *E.armata* ao cobre em uma ampla faixa de salinidade (3 a 30)

- As principais espécies de cobre estimadas nas diferentes salinidades experimentais foram o Cu^{2+} e o CuCO_3 , sendo que a concentração destas espécies não foram alteradas de forma significativa tpela variação de temperatura,ou pela presença de matéria orgânica dissolvida no meio;

- O isópodo *E. armata* acumula cobre a partir da fase dissolvida, sendo que nem todo cobre presente no meio está biodisponível aos isópodos;

- A salinidade atua como agente protetor contra a acumulação lamelar de cobre, pois o seu aumento leva a uma redução na concentração de cobre acumulado nas lamelas dos isópodos;

- A presença de matéria orgânica dissolvida no meio também altera a acumulação lamelar de cobre, sendo que a acumulação não é dependente da concentração de matéria orgânica dissolvida, na faixa de testada;

- A acumulação lamelar de cobre é dependente da temperatura, sendo maior em temperatura mais elevada (20°C) do que em baixa temperatura (10°C);

- Em baixa salinidade (3), o mecanismo de toxicidade aguda do cobre em *E. armata* está associado a uma inibição da atividade da Na⁺,K⁺ ATPase lamelar;

- Em salinidades intermediárias (6) e elevadas (15 e 30), o mecanismo de toxicidade aguda do cobre está associado à inibição da anidrase carbônica, com evidências de distúrbios ionorregulatórios nas salinidades mais elevadas (15 e 30);

- Os efeitos tóxicos do cobre no isópodo *E. armata* estão associados tanto a efeitos diretos do metal nas moléculas envolvidas na ionorregulação quanto indiretos na disponibilidade de energia para manutenção destes processo.

7- PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, fica claro que o cobre promove distúrbios iônico e osmorregulatórios no isópodo *Excirolana armata*. Moléculas envolvidas nestes processos como a Na^+ , K^+ -ATPase e a anidrase carbônica, foram afetadas por este metal. Além disso, o cobre também afetou o metabolismo energético, visto que houve redução no consumo corporal de oxigênio. Desta forma, para dar continuidade ao trabalho, seria importante analisar outras moléculas envolvidas nestes processos, a fim de que se possam verificar outros mecanismos onde o cobre pode ser capaz de promover um possível distúrbio.

Para tanto, seria importante avaliar a atividade de outras enzimas envolvidas nos processos de ionorregulação, tais como;

- bomba protônica (H^+ -ATPase);
- atividade das duas isoformas da anidrase carbônica (regulatória e respiratória) separadamente;
- avaliar também processos envolvidos na respiração celular, como por exemplo, os complexos mitocondriais;

Por último, verificar através de análises moleculares o efeito do cobre na expressão destas moléculas que estão diretamente ou indiretamente envolvidas nos processos de iônico e osmorregulação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDRAJ, A, D.J. MARSHALL, M.A. GREGORY , T.P. McCLURG. 2002. Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 132, 355–363.

APHA. 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, ASTM. 1193p.

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.

BAMBANG, Y, P THUET, M CHARMANTIER-DAURES, JP TRILLES, G CHARMANTIER. 1995. Effect of copper on survival and osmo-regulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Toxicol.* 33, 125-139.

BARCAROLLI, IF. 2004. Mecanismos e limiares de toxicidade aguda do cobre no isópodo eurialino *Excirrolana armata* Dana, 1852 (Isopoda- Cirolanidae):

Implicações para o Modelo do Ligante Biológico. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 71p.

BAUMGARTEN, MGZ, JMB ROCHA & LF NIENCHESKI. 1996. Manual de Análises em Oceanografia Química. Rio Grande, Editora da FURG. 132p.

BAUMGARTEN, MGZ & LF NIENCHESKI. 1998. Avaliação da Qualidade Hidroquímica da Área Portuária da Cidade de Rio Grande - RS. Documentos Técnicos. Rio Grande, Editora da FURG.

BELTRAME, MO, SG DE MARCO, JE MARCOVECCHIO. 2009. Dissolved and particulate heavy metals distribution in coastal lagoons. A case study from Mar Chiquita Lagoon, Argentina. *Estuarine Coastal and Shelf Science*.

BIANCHINI, A., KC. BOWLES. 2002. Metal sulfides in oxygenated aquatic systems: implications for the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol Part C*. 133: 51-64.

BIANCHINI, A.; CM WOOD. 2003. Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna*. *Environ. Toxic. Chem. Pensacola - FL - EUA*, v. 22, 6, 1361-1367.

BLANCHARD, J, M GROSELL. 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: Is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities?. *Aquat Toxicol.* 80, 131-139.

BROOKS, SJ & CL MILLS. 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol.* 135: 527-537.

BROOKS, SJ & CL MILLS. 2006. Gill Na^+, K^+ -ATPase in a series of hiper-regulating gammarid amphipods. Enzyme characterization and the effects of salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.*

BROWN, AC & A MCLACHLAN. 1990. Ecology of Sandy Shores. Amsterdam, Elsevier.

CAMPBELL, PGC. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: TESSIER, A, DR TURNER (Eds), Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. IUPAC Series on *Analytical and Physiological Chemistry of Environmental Systems*, v. 3. John Wiley 7 Sons, NY, USA, 45-102.

CARBONEL, CAAH. 2008. Poluição térmica. In: Poluição Marinha. Rio de Janeiro, Interciência. P. 287-306.

CASTILHO, PC, IA MARTINS & A BIANCHINI. 2001. Gill Na^+, K^+ -ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (DECAPODA, GRAPSIDAE). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256: 215-227.

CASTRO, AL, INS BRUM. 1969. Sobre as espécies de *Excirolana* Richardson do litoral Atlântico das Américas (Isopoda, Cirolanidae). *Bolm. Mus. Nac.* RJ. 261, 21.

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

CORNELIUS, F. 1991. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted (Na-K)-ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 19 – 66.

CROSS, FA, G SUNDA. 1982. The relationship between chemical speciation and bioavailability of trace metals to marine organisms – A review. In proceedings of the International Symposium on Utilization of Coastal Ecosystems: planning, pollution and productivity, Rio Grande, RS-Brasil. V1.

CUSIMANO, RF, DF BRAKKE & GA CHAPMAN. 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1497-1503.

DALLA VIA, GJ. 1986. Salinity responses of the juvenile shrimp *Paeneus japonicus*: I. Oxygen consumption and estimations of productivity. *Aquaculture*. 55, 297-306.

DE SCHAMPHELAERE, KAC, DG HEIJERICK & CR JANSSEN. 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133: 243-258.

DE SCHAMPHELAERE, KAC, FM VASCONCELOS, FMG TACK, HL ALLEN, CR JANSSEN. 2003. Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1248-1255.

DI TORO, D, HE ALLEN, HL BERGMAN, JS MEYER, RC SANTORE & P PAQUIN. 2000. The Biotic Ligand Model. A Computational Approach for Assessing the Ecological Effects of Metals in Aquatic Systems. New York ICA. 65p.

DOIG, LE, K LIBER. 2005. Influence of dissolved organic matter on nickel bioavailability and toxicity to *Hyalella azteca* in water –only exposure. *Aquat. Toxicol.* 1-13.

ERICKSON, RJ, DA BENOIT, VR MATTSON, HP NELSON JR. & EN LEONARD. 1996. The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 181-193.

GARCIA, VMT, NM GIANUCA. 1998. A praia e a zona de arrebentação. In: SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (eds.). Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande, Ecoscientia. p. 21-25.

GARNACHO, E, LS PECK, PA TYLER. 2001. Effects of copper exposure on the metabolismo of the mysid *Praunus flexuosus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 265. 181-201.

GENOVESE, G, N ORTIZ, MR URCOLA, CM LUQUET. 2005. Possible role of anhydrase carbonic, V-H⁺-ATPase, and Cl⁻/HCO₃ exchanger in electrogenic transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. And Physiol., Part A.* 142, 362-369.

GEORGOPOULOS, PG, A ROY, RE OPIEKUN, PJ LIOY & MJ YONONE-LIOY. 2002. Environmental Dynamics and Human Exposure to Copper. *Environmental Dynamics and Human Exposure Issues*. New York, ICA. Vol. 1: 207.

GERVAIS, MR, BL TUFTS. 1999. Characterization of carbonic anhydrase and anion exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia calva*), a primitive air breathing fish. *Comp. Biochem. Physiol., A.* 123, 343-350.

GIANUCA, NM. 1983. A preliminar Account of the Ecology of Sandy Beaches in Southern Brazil. In: MCLACHLAN, A & ERASMUS T. A. (eds.) *Sandy Beaches as Ecosystems*. The Hague, Junk, p. 413-419.

GIANUCA, NM. 1985. *The Ecology of a Sandy Beach in Southern Brazil*. PhD thesis. University Southampton, Inglaterra.

GIANUCA, NM. 1987. Zonação e produção nas praias arenosas do litoral sul e sudeste do Brasil: síntese do conhecimento. *Publ. Acad. Ciências Est.* 54 (1): 313-332.

GIARRATANO, E, L COMOGLIO, O AMIN. 2007. Heavy metal toxicity in *Exosphaeroma gigas* (Crustácea, Isopoda) from the coastal zone of Beagle Channel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 451-462.

GILLES, R., PEQUÉUX, A. (1983). Interaction of chemical and osmotic regulation with the environment. *The Biology of Crustacea*, Academic Press, Inc. 8.

GROSELL, M, C NIELSEN & A BIANCHINI. 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133: 287-303.

GROSELL, M. & C. M. WOOD 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: Mechanism of apical entry. *J Exp Biol* 205: 1179-1188.

GROSELL, M, MD McDONALD, PJ WALSH, CM WOOD. 2004. Effects of prolonged exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na⁺, K⁺-ATPase activity in osmoregulation tissues. *Aquat. Toxicol.* 19, 263-275.

GROSELL, M, J BLANCHARD, KV BRIX, R GERDES. 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 84, 162-172.

HANSEN, JI, T MUSTAFA, M DEPLEDGE. 1992. Mechanisms of copper toxicity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 114, 253-257.

HALL, SJ. 1991. Patterns of recolonization and the importance of pit-digging by the crab *Cancer pagurus* in a subtidal sand habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72, 93-102.

HALL, SJ. 1994. Physical disturbance and marine benthic communities: Life in unconsolidated sediments. *Ocean. Mar. Biol: An Annual Review.* 32. 179-239.

HARRIS, RR, MFC SANTOS. 2000. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 137, 691-703.

HENRY , PR, JN CAMERON. 1982. Acid-base balance in *Callinectes sapidus* during acclimation from high to low salinity. *J. Exp. Biol.* 101, 255-264.

HENRY, RP. 1987. Membrane-associated carbonic anhydrase in gills of blue crab, *Callinectes sapidus*. *Am. Physiol. Soc.*, 966-971.

HENRY. 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase in vitro: the electrometric delta pH and the pH stat methods. In: DODGSOM, SJ, TASHIANM RE, GROS, G, CARTER ND (eds). *The carbonic Anhydrases*. New York, Plenum, 119-125.

HENRY, RP. 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 523-538.

HOLLIS, L, L MUENCH & RC PLAYLE. 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 50: 703-720.

JARAMILLO, E & A. MCLACHLAN. 1993. Community and population responses to the macroinfauna to physical factors over a range of exposed sandy beaches in south-central Chile. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 615-624.

JORGENSEN, PL.; KO.; HAKANON, SJD KARLISH: 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions, *Annual. Rev. Physiol.* 65:817 -849.

JORGE, MB. 2009. Efeitos da matéria orgânica dissolvida na acumulação e toxicidade aguda do cobre no marisco *Mesodesma mactroides*. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 53p.

KADUKOVÀ, J, E VIRCÍKOVÀ. 2005. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environ. Int.* 31, 227-232.

KARL, J & JR KARNAKY. 1998. Osmotic and Ionic Regulation. In: *The Physiology of Fishes*. New York, CRC Press. 157-177.

KAWAKAMI, K.; S NOGUCHI; M NODA, H TAKAHASHI; T OHTA.; M KAWAMURA,. H NOJIMA; K NAGANO; T HIROSE; S INAYAMA; H HAYASHIDA; T MIYATA; S NUMA.1985: Primary structure of the α -subunit of *Torpedo californica* (Na⁺-K⁺) ATPase deduced from CDNA sequence. *Nature* 316: 733-736.

KIM, SD, H MA, HE ALLEN & DK CHA. 1999. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: effect of complexation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (11): 2433-2437.

KIRSCHNER, LB. 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.* 207, 1439-1452.

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

KRAEMER, LD, PGC CAMPBELL, L HARE. 2005. Dynamics of Cd, Cu and Zn accumulation in organs and sub-cellular fractions in field transplanted juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Environ. Pol.* 138 (2), .324-337.

KRISHNAKUMAR, PK, R DAMODARAN, PNK NAMBISAN. 1987. Carotenóide content of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus) to acute mercury and zinc toxicity. *Indian J. Mar. Sci.* 16, 155-157.

KÜLBRANDT, W.: 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases, *Rev. Nat.* 5: 282 – 294.

LANDNER, L & L LINDESTROM. 1999. Copper in Society and the Environment: An Account of the Facts on Fluxes, Amounts and Effects of Copper in Sweden. Stockholm, Sweden:, Swedish Environmental Research Group (MFG).

LAURÉN, DJ & DG MCDONALD. 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol. B* 155: 635-644.

LAURÉN, DJ & DG MCDONALD. 1987. Acclimation to copper by rainbow-trout *Salmo gairdneri* - physiology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 99-104.

LAWSON, SL, MB JONES & RM MOATE. 1995. Effect of copper on the ultrastructure of the gill epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachiura). *Mar. Pol. Bull.* 31: 63-73.

LEMOS D, A OLIVEIRA, A ALVAREZ, VN PHAN, E BELTRAME. 1997. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante (1967) postlarvae submitted to sudden decreases of salinity: preliminary results. In: Mahiques, M (eds). Resumos Expandidos do VII COLACMAR, v 2 IOUSP, São Paulo, Brazil 70-71.

LORES, EM & JR PENNOCK. 1998. The effect of salinity on binding of Cd, Cr, Cu and Zn to dissolved organic matter. *Chemosphere* 37 (5): 861-874.

LORENZO, JI, O NIETO, R BEIRAS. 2008. Anodic stripping voltametry measures copper bioavailability for sea urchin larvae in the presence of fulvic acids. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 36-44.

LOUIS, Y, C GARNIER, VLENOBLE, D OMANOVIC, S MOUNIER, I PIZETA. 2009. Characterisation and modeling of marine dissolved organic matter interactions with major and trace cations. *Mar. Environ. Res.* 67, 100-107.

LUCU, C, DEVESCOVI, M. 1999. Osmoregulation and branchial Na⁺,K⁺-ATPase in the lobster. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234, 291–304.

LUCU, C, DW TOWLE. 2003. Na⁺,K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacean. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 135, 195–214.

MA, H, HE ALLEN, Y YIN. 2001. Characterization of isolated fractionation of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Res.* 35, 985-996.

McCORMICK, SD. 1993. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na⁺,K⁺-ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 656-658.

MARSDEN, ID, PS RAINBOW. 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology-the amphipod example?. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300, 373-408.

MARTINS, SEG. 2008. Acumulação e toxicidade do cobre em animais de praias arenosas do extremo Sul do Brasil. Tese de Doutorado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 148 p.

MATSUO, AYO, RC PLAYLE, AL VAL, CM WOOD. 2004. Physiological action of dissolved organic matter in rainbow trout in the presence and absence of copper: Sodium uptake kinetics and unidirectional flux rates in hard and softwater. *Aquat. Toxicol.* 70, 63-81.

McGEER, JC, C SZEBEDINSZKY, DG McDONALD, CM WOOD. 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. I: Ionoregulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231-243.

MCLACHLAN, A. 1980. Exposed sandy beaches as semi-close ecosystems. *Mar. Environ. Res.* 4: 59-63.

MCLACHLAN, A. 1983. Sandy beach ecology - a review. In: MCLACHLAN, A & TA ERASMUS (eds.). *Sandy beaches as ecosystems*. The Hague, Junk, pp. 321-380.

MCLACHLAN, A. 1990. Dissipative beaches and macrofauna communities on exposed intertidal sands. *J. Coast Res.* 6: 57-71. review. In: MCLACHLAN, A & TA ERASMUS (eds.). *Sandy beaches as ecosystems*. The Hague, Junk, pp. 321-380.

McLACHLAN, A, A BROWN. 2006. Sandy beaches as ecosystems. *Mar. Environ. Res.* 4, 59-63.

MORAES, R. 2001. Estudos sobre Poluição Marinha: Importância e Perspectivas. In: MORAES, R, M CRAPEZ, W PFEIFFER, M FARINA, A BAINY & V TEIXEIRA. *Efeitos de Poluentes em Organismos Marinho*. São Paulo, Arte e Ciência Villipress, p. 285.

MOREL, FM. 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*. New York, Wiley Interscience.

MOREL, FM, HERING, J. G. 1993. *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*. New York, Wiley Interscience.

MORGAN, T. 2000. The fish gill: Site of action for the toxic effects of waterborne copper. *Fish Physiol.* 751: 1-12.

NIENCHESKI, LF, WINDOM, H. L. 1994. Nutrient flux and budget in Patos Lagoon Estuary. *Sci. Total Environ.* 149 (2): 53-60.

NIENCHESKI, LF & MGZ BAUMGARTEN. 1998. Química Marinha. In: SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (eds.). Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande, Ecoscientia. p. 21-25.

NIENCHESKI, LF & MGZ BAUMGARTEN. 2000. Distribution of particulate trace metal in the southern part of the Patos Lagoon estuary. *Aquat. Ecosys. Health Manag.* 3: 515-520.

NIENCHESKI, LF, MR MILANI & I MILANI. 2008. Metais traço: água. In: Poluição Marinha. Rio de Janeiro, Interciência. P. 179-193.

NIXON, SW. 1982 Nutrient dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. *Oceanologica Acta. Proceedings International Symposium on Coastal Lagoons.* SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, 8–14 September, 1981, 357–371.

PAIS, I & JB JONES JR. 1997. The Handbook of Trace Elements. Florida, St. Lucie Press. 223 p.

NONNOTE, I, K BOITEL & JP TRUCHOT. 1993. Waterborne copper causes gill damage and haemolymph hypoxia in the shore crab *Carcinus maenas*. *Can. J. Zool.* 71: 1564-1578.

PAN, LQ, LJ ZHANG, HY LIU. 2007. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*.273, 711-720.

PAQUIN, PR, DM DI TORO, RC SANTORE, D TRIVEDI, KB WU. 1999. A Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals: III. Application to fish and *Daphnia* exposure to silver. Integrated approach to assessing the bioavailability and toxicity of metals in surface waters and sediments. EPA-822-E-99-001. Washington, DC., U.S. Environmental Protection Agency. 3-102.

PÉQUEUX, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15 (1): 1-60.

PISTOLE, HD, PELES JD, K TAYLOR. 2008. Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 148, 48-52.

RAINBOW, PS. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. *Environ. Poll* 120, 497-507.

RODRIGUES, SC, A BIANCHINI. 2007. Extraction and concentration of freshwater–and seawater-derived dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2. 3, 275-281.

RODRIGUES, SC. 2007. Influência da material orgânica dissolvida na toxicidade aguda e acumulação do cobre no copépode eurialino *Acartia tonsa*: Implicações para o Modelo do Ligante Biótico. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Brasil, 100 p.

ROESIJADI, G, WE ROBINSON. 1994. Metal Regulation in Aquatic Animals: Mechanisms of Uptake, Accumulation, and Release. In: MALINS, DC & GK OSTRANDER (eds.). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. New York, CRC Press. p. 539.

ROY, LA, D ALEN DAVIS, I PATRICK SAOUD, RP HENRY. 2007. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comp. Biochem. and Physiol., Part A*. 147, 404-411.

SANTORE, RC, DM DI TORO & PR PAQUIN. 1999. A Biotic Ligand Model of the Acute Toxicity of Metals II. Application to Acute Copper Toxicity in Freshwater Fish and Daphnia. Washington, Environmental Protection Agency, Office of Water Regulations and Standards.

SANTORE, RC, DM DI TORO, PR PAQUIN, HE ALLEN & JS MEYER. 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 (10): 2397-2402.

SANTOS, PP. 1990. Ecologia de *Scolelepis gaucha* (Polychaeta, Spionidae) nas Praias do Rio Grande do Sul: uma Abordagem Dinâmica da Interação População-Ambiente. Tese de Mestrado. Rio Grande, FURG.

SANTOS, EA & A BIANCHINI. 1998. Adaptações Fisiológicas de Invertebrados e Peixes. In: SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (eds.). Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande, Editora Ecocientia. p. 326.

SANTOS, MHS, NT CUNHA & A BIANCHINI. 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.

SCHMIDT-NIELSEN, K. 1996. Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente. São Paulo, Santos Editora. 600 p.

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

SERRANO, L, HALANYCH, KM, HENRY, PH. 2007. Salinity-stimulated changes in expression and activity of two carbonic anhydrase isoforms in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.* 210. 2320-2332.

SHORT, AD, LD WRIGHT. 1983. Physical variability of sandy beaches. In: McLACHLAN, A, T ERASMUS (eds). *Sandy beaches as ecosystems*. Dr. W Junk, The Hague, The Netherlands, 133-144.

SHORT, AD. 1996. The role of wave height, period, slope, tide range and embaymentisation in beach classification: a review. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69: 589-604.

SKAGGS, HS & PR. HENRY. 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. and Physiol., Part C.* 133, 605-612.

SKOU, JC.: 1988. The identification of the sodium pump, *Bioscience Reports* 18 n, 14pp.

SMITH, DS, RA BELL & JR KRAMER. 2002. Metal speciation in natural waters with emphasis on reduced sulfur groups as strong metal binding sites. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133: 65-74.

SOCGIANTO, A., M. CHARMANTIER-DAURES. 1999. Impact of copper on the structure of the gills and epipodites of the shrimp *Paenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *J Crust Biol* 19: 209-223.

SOLA, F, J ISAIA & A MASONI. 1995. Effects of copper on gill structure and transport function in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Toxicol.* 15: 391-398.

SPRAGUE, JB. 1985. Factors that Modify Toxicity. In: RAND, GM & SR PETROCELLI (eds.) *Fundamental of Aquatic Toxicology*. Washington, Hemisphere Publishing Co. p. 124-163.

STUMM, W, JJ MORGAN. 1996. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. New York, Wiley Interscience.

SUNDA, WG. 1989. Trace metal interactions with marine phyto-plankton. *Biol. Oceanography* 6, 411-442.

TABATABAI, MA. 1974. A rapid method for determination of sulfate in water samples. *Environ. Letters.* 7 (3): 237-234.

TAO, S, Y WEN, A LONG, R DAWSON, J CAO, F XU. 2001. Simulation of acid-base condition and copper speciation in the fish gill microenvironment. *Comp. Chem.* 25, 215-222.

TAYLOR, LN, DW BAKER, CM WOOD & DG MCDONALD. 2002. An *in vitro* approach for modelling branchial copper binding in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133: 111-124.

TOWLE, DW, RS PAULSEN, D WEIHRAUCH, M KORDYLEWSKI, C SALVADOR, JH LIGNOT, CS PIERROT. 2001. Na⁺,K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of α -subunit mRNA and protein. *J. Exp. Biol.* 204, 4005-4012.

UGOLINI, A, F BORGHINI, P CALOSI, P, BAZZICALUPO, M CHELAZZI, G FOCARDI. 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 526-532.

USEPA. 1999. National Recommended Water Quality Criteria Correction, EPA 822-Z-99-001. Washington, 25 p.

VanGENDEREN, EJ, AC RYAN, JR TOASO, AJ KLAINE. 2003. Influence of dissolved organic matter source on silver toxicity to *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.* vol. 22. 11, 2746-2751.

VERSLYCLE, T. M, VENGHELUWE, D HEIJERICK, K DE SCHAMPHELAERE, P VAN SPRANG, CR JANSSEN. 2003. The toxicity of metal mixture to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea, Mysidacea) under changing salinity. *Aquat. Toxicol.* 64, 307-315.

VIAROLI, P., P LASERRE, P CAMPOSTRINI. 2007. Lagoons and coastal wetlands. *Hidrobiología* 577, 1–3.

VOOREN, C. M. 1998. Aves Marinhas e Costeiras. In: Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. SEELIGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (eds). Rio Grande, Editora Ecocientia. p. 184-186.

WANG W, A WANG, Y LIU, J XIU, Z LIU, R SUN. 2006. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*.

WASSERMAN, JC & MA WASSERMAN. 2008. Comportamento de metais em sedimentos. In: Poluição Marinha. Rio de Janeiro, Interciência. P. 197-236.

WELSH, PG, J LIPTON, GA CHAPMAN & T PODRABSKY. 2000. Relative importance of calcium and magnesium in hardness-based modification of copper toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (6): 1624-1631.

WETZEL, R. 2001. Limnology: Lake and River Ecosystems, 3^a ed. Academic, San Diego, CA, USA, 1006p.

WOOD, CM, WJ ADAMS & GT ANKLEY. 1997. Environmental Toxicology of Metals. In: BERGMAN, HL & EJ DORWARD-KING (Eds.). Reassessment of Metals Criteria for Aquatic Life Protection: Priorities for Research and Implementation. Pensacola, SETAC Press, p. 31-55.

WU, JP, HC CHEN. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere.* 57, 1591-1598.

YAMANE, T. 1995. Effect of accumulates water temperature on *Macrobrachium nipponense* catch Lake Biwa. *Mem. Fac. Agric.* Kinki Univ. Kinkidai No Kiyo. 28, 61-64.

YANNICELLI, B.; R. PALACIOS, L. GIMENEZ. 2001. Activity rhythms of two cirrolanid isopods from an exposed microtidal sandy beach in Uruguay. *Mar. Biol.* Berlin. 138, 18-23.

YANNICELLI, B, R PALACIOS, L GIMÉNEZ. 2002. Swimming ability and burrowing time of two cirolanidae isopods from different levels of exposure sandy beaches. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 273: 73-88

YANNICELLI, B, LR CASTRO, A VALLE-LEVINSON, L ATKINSON, D FIGUEROA. 2006. Vertical distribution of decapod larvae in the entrance of an equatorward facing bay of central Chile: implications for transport. *J. Plankton Res.* 28 (1), 19-37.