

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS SUBLETAIS DE AMÔNIA NA TOXICIDADE DE METAIS EM DUAS ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS

FABÍOLA CARREIRA CALEFI

SÃO VICENTE - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS SUBLETAIS DE AMÔNIA NA
TOXICIDADE DE METAIS EM DUAS ESPÉCIES DE
INVERTEBRADOS

FABÍOLA CARREIRA CALEFI

Orientador: RAFAEL MENDONÇA DUARTE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

SÃO VICENTE – SP

2019

C148i

Calefi, Fabíola Carreira

Influência de níveis sub letais de amônia na toxicidade de metais
em duas espécies de invertebrados / Fabíola Carreira Calefi. -- São
Vicente, 2019

36 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Rafael Mendonça Duarte

1. Biodiversidade. 2. Toxicologia. 3. Metais. 4. Invertebrados
marinhos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Resumo

As regiões estuarinas vêm historicamente sofrendo impactos negativos devido ao aumento da carga poluidora, onde níveis aumentados de metais, principalmente por atividades industriais, e de amônia, pelo aporte de esgoto e efluentes domésticos, têm sido reportados tanto em água quanto no sedimento. Embora essas substâncias sejam reconhecidas como relativamente tóxicas a invertebrados estuarinos quando testadas isoladamente; poucos estudos têm avaliado como níveis aumentados de amônia afetam a toxicidade de metais. Assim, o presente estudo avaliou os efeitos tóxicos da exposição a níveis sub letais de amônia na água sobre a toxicidade aguda do cobre e cádmio em duas espécies de invertebrados: *Artemia salina* e *Litopenaeus vannamei*. Primeiramente a toxicidade dos metais e da amônia foram avaliadas por meio da determinação da concentração letal média (CL_{50}) em 24 e 48 h de exposição, para ambas as espécies aclimatadas em salinidade 15 ppm. Além disso, testes de toxicidade para cádmio e cobre foram realizados na presença de níveis sub letais de amônia na água, representando 25% e 50% dos valores da CL_{50} -48 h calculada para cada espécie. Para *A. salina* a substância mais tóxica foi o cobre, seguido pelo cádmio e amônia, enquanto para *L. vannamei*, o cádmio foi a substância mais tóxica, seguido pelo cobre e amônia. Para ambas as espécies, a toxicidade dos xenobióticos testados foi aumentada após 48 h de exposição, em relação as primeiras 24 h, como visto pelos menores valores de CL_{50} -48 h. Para *A. salina*, a toxicidade do cobre e do cádmio diminuiu durante a exposição a níveis sub letais de amônia, particularmente nas primeiras 24 h de exposição, sugerindo um efeito antagonista entre a amônia e os metais para esta espécie. Por outro lado, a exposição a níveis sub letais de amônia não teve influência sobre a toxicidade aguda do cádmio para *L. vannamei*. Já a presença de amônia aumentou significativamente a toxicidade do cobre para *L. vannamei*, como visto pela drástica redução dos valores de CL_{50} em 24 e 48 h (em média 60% e 93% nos testes na presença de 25% e 50% da CL_{50} de amônia, respectivamente), indicando um efeito tóxico sinérgico entre a amônia e o cobre para a espécie. Em conjunto, nossos dados sugerem que o aumento da concentração de amônia na água pode ter efeito diferencial sobre a toxicidade de metais para espécies de invertebrados, podendo levar ao aumento da toxicidade de metais como cobre, particularmente em condições de salinidade reduzida do meio.

Palavras-chave: CL_{50} ; Camarão branco; *Artemia salina*; cobre, cádmio e misturas.

Abstract

Estuarine regions have been historically impacted by the augment of pollutant load, where increased levels of metals, mainly by industrial activities, and ammonia, by both domestic sewage and effluents, are reported in both water and sediment. Although these substances are recognized as relatively toxic to estuarine invertebrates when tested isolated; few studies have evaluated how increased levels of ammonia affect the toxicity of metals. Thus, this study evaluated the influence of exposure to sub-lethal levels of ammonia in water on acute toxicity of copper and cadmium to two invertebrate species: *Artemia salina* and *Litopenaeus vannamei*. Firstly, the toxicity of metals and ammonia were evaluated by determining the mean lethal concentration (LC₅₀) at 24 and 48 h of exposure for both species acclimated at 15 ppm of salinity. In addition, toxicity tests for cadmium and copper were performed in the presence of sub-lethal levels of ammonia in water, that represents 25% and 50% of the calculated LC₅₀-48 h values for each species. For *A. salina* the most toxic substance was copper, followed by cadmium and ammonia, while for *L. vannamei*, cadmium was the most toxic substance, followed by copper and ammonia. For both species, the toxicity of the xenobiotic was increased after 48 h of exposure, in comparison to 24 h, as seen by the lower values of LC₅₀-48 h. For *A. salina*, the toxicity of copper and cadmium decreased during exposure to sub-lethal levels of ammonia, particularly during the first 24 h of exposure, suggesting an antagonistic effect between ammonia and both metals for this species. On the other hand, exposure to sub-lethal levels of ammonia had no influence on the acute toxicity of cadmium to *L. vannamei*. The presence of ammonia significantly increased copper toxicity for *L. vannamei*, as seen as by the marked reduction of LC₅₀ values in both 24 and 48 h of exposure (on average 60% and 93% in tests with 25% and 50% LC₅₀ of ammonia, respectively), indicating a synergistic toxic effect between ammonia and copper for the species. Overall, our data suggest that increased ammonia concentration in water might have a differential effect on metal toxicity to invertebrate species, and might result in increased toxicity of such metals as copper, particularly in environments under reduced salinity conditions

Keywords: LC₅₀; White shrimp; *Artemia salina*; copper, cadmium and mixtures.

1. Introdução

Um Sistema Estuarino é considerado um ecossistema que inclui áreas marinhas costeiras e estuarinas, reconhecidas como áreas de berçário, reprodução, crescimento e alimentação de muitas espécies aquáticas, e destinadas a usos múltiplos como abastecimento público e industrial, portuário, recreação, navegação, geração de energia e pesca de subsistência, mas que também recebe o lançamento de efluentes industriais e domésticos (Miranda *et. al.*, 2002; Campos, 2016; Lamparelli *et. al.*, 2001 e Perina, 2006). No Sistema Estuarino de Santos-São Vicente está localizado o maior porto da América Latina (Santos-SP), e o maior pólo industrial do país (Cubatão-SP), que vem sofrendo intensa degradação ambiental causada principalmente pela poluição hídrica e atmosférica das indústrias, devido ao grande volume e diversidade de poluentes lançados, presença de portos, dragagem do sedimento e grandes centros urbanos (Campos, 2016; Lamparelli *et. al.*, 2001 e Perina, 2006).

Sistemas estuarinos estão expostos à descarga de rios, deposição atmosférica, efluentes, escoamento de água superficial, aos processos regionais (climáticos, sedimentação e hidrodinâmicas), apresentando variabilidade longitudinal e temporal (maré, sazonal, anual e de longo período), sendo suas características fortemente influenciadas por diferentes processos, tais como descarga fluvial, vento e circulação da região costeira adjacente (Parreira, 2012; CETESB, 2005; Hortellani, 2008 e Miranda *et. al.*, 2002). A interação entre os diferentes processos que atuam nas regiões estuarinas controla diretamente as características físicas e químicas do ambiente aquático, particularmente na salinidade e temperatura, que são características de cada estuário (Parreira, 2012; CETESB, 2005; Hortellani, 2008 e Miranda *et. al.*, 2002).

Em estudo de monitoramento ambiental conduzido na região do Estuário de Santos-São Vicente, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) identificou as principais fontes de poluição por espécies metálicas na região, a saber: uma indústria siderúrgica com potencial de emissão dos elementos metálicos como cobre (Cu), manganês (Mn), níquel (Ni), e zinco (Zn); duas refinarias de petróleo com potenciais de emissão de Cu, cromo (Cr), Ni, mercúrio (Hg) e Zn; onze indústrias químicas e petroquímicas com potenciais de emissão de cádmio (Cd), Cu, Cr, Mn, Ni, chumbo (Pb), Zn e Hg; e sete indústrias de fertilizantes com potenciais de emissão de Pb, Ni e Zn (CETESB, 2005).

Do ponto de vista ambiental, e de acordo com Relatórios da CETESB (2017), a partir da análise dos compartimentos água e sedimento, em pontos de monitoramento e frequência pré-estabelecidos e em concordância com as atividades econômicas da região, detectou-se em 2017 na água do Canal de Santos, Canal de São Vicente e Rio Piaçaguera 0,009 mg/L de cobre dissolvido e de cádmio total, limite acima do estabelecido pelo CONAMA (357) de 0,005 mg/L para ambos metais. Para cádmio e cobre a porcentagem de resultados não conformes de 2012 a 2016 em diferentes pontos amostrais foram 7 e 5 (71%), tanto para o Rio Moji quanto para o Rio Piaçaguera. Já o nitrogênio amoniacal, em 2017 e média histórica de 2012 a 2016, ficou em 3,1 e 3,2 mg/L no Rio Piaçaguera, 7,5 e 7,1 mg/L no Rio Saboó, 8,6 e 9,3 mg/L no Rio Moji e 1,0 e 1,0 mg/L no Rio Cubatão, todos importantes rios da região do Litoral Paulista. De acordo com o índice de qualidade das águas costeiras (IQAC) da CETESB (2017) o limite de Nitrogênio amoniacal deve ser de 0,4 mg/L.

Para sedimentos no Canal de Santos, a CETESB detectou mínimo de 11,8 e máximo de 22,30 mg/kg de cobre total e mín/máx de 0,5 mg/kg de cádmio total, e no Canal de São Vicente mínimo 5,0 e máximo 21,8 mg/kg de cobre total e min/máx de 0,5 mg/L de cádmio total. Os valores máximos de cobre e cádmio encontrados nos sedimentos estão acima do ISQG (Interim Sediment Quality Guidelines) que é de 18,7 mg/kg para cobre total e 0,7 mg/kg para cádmio total, e PEL (Probable effect level) de 108 mg/kg de cobre total e 4,2 mg/kg de cobre total (Padrão CCME, 2002 – Legislação Canadense) demonstrando aumentada carga poluidora na região.

Os efeitos toxicológicos dos metais sobre os organismos aquáticos estão diretamente relacionados à sua acumulação em tecidos-alvo que, em geral, precedem efeitos fisiológicos e histopatológicos nos animais (Niyogi & Wood, 2004). O acúmulo de metais pelos organismos aquáticos é fortemente associado à quantidade de metal biodisponível, sendo esta biodisponibilidade marcadamente dependente de parâmetros físicos e químicos da água tais como o pH, dureza, alcalinidade, salinidade, presença de quelantes orgânicos e inorgânicos, concentrações de partículas e coloides e a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), que controlam a concentração da forma química tóxica dos metais em solução (Niyogi & Wood, 2004).

A amônia é um dos principais produtos liberados no ambiente aquático por meio de fertilizantes, emissões atmosféricas, degradação microbiana de efluentes domésticos,

metabolismo de nitrogênio em animais e plantas, sendo também produzida como resultado da decomposição de organismos e atividades vulcânicas (Randall & Tsui, 2002; Souza-Bastos *et al.*, 2017 e Bucking, 2016). No ambiente aquático, a amônia está presente na forma gasosa (NH_3) e na forma iônica (NH_4^+), sendo a amônia total (T_{amm}), ou nitrogênio amoniacal, denominações utilizadas para a soma das concentrações de ambas as formas de amônia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$). Uma vez liberada no ambiente, altas concentrações de amônia provocam o aumento do consumo de oxigênio dissolvido a ser oxidado biologicamente, conhecido como DBO de segundo estágio, sendo a concentração de nitrogênio amoniacal um importante parâmetro para a determinação de índices de qualidade das águas (CETESB, 2007). A quantidade relativa de amônia não ionizada aumenta com o pH na maioria dos ambientes aquáticos, e também nos fluidos corpóreos dos organismos, em que, a amônia se encontra preferencialmente na forma iônica (NH_4^+), uma vez que o equilíbrio entre as duas formas, medida através do pK da reação $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$, é de cerca de 9.5. No entanto, a forma gasosa (NH_3) é considerada a mais tóxica para os organismos aquáticos, uma vez que, as membranas biológicas (como as brânquias) são muito permeáveis ao NH_3 , devido a sua natureza lipofílica, e relativamente impermeáveis a forma iônica (NH_4^+) da amônia (Randall & Tsui, 2002).

Durante a exposição à altas concentrações de amônia o gradiente de NH_3 entre o ambiente aquático e os fluidos corpóreos dos animais é reduzido, levando a uma marcada inibição da excreção de amônia ($J_{amm} = \text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) pelos organismos aquáticos, resultando em um fluxo positivo (absorção) de NH_3 em direção ao sangue dos animais e, conseqüentemente, aumento da concentração total interna de amônia (T_{amm}) (Randall & Tsui, 2002 e Bucking, 2016). Nesse contexto, os efeitos tóxicos agudos e crônicos da exposição a níveis sub letais de amônia na água têm sido relacionados a um aumento significativo da concentração total de amônia (T_{amm}) no plasma dos animais. Entre os principais efeitos tóxicos da amônia nos organismos aquáticos destacam-se a redução das taxas de crescimento, alterações no metabolismo energético, hiperventilação, hiperexcitabilidade, além de profundas alterações nas taxas de transporte de sais pelas brânquias dos animais, resultando em severos desequilíbrios iônicos e osmóticos dos animais (Randall & Tsui, 2002 e Bucking, 2016). A amônia tem sido demonstrada por ser relativamente tóxica a invertebrados marinhos e estuarinos, embora os valores de CL_{50} (i.e. a concentração letal de amônia que produz 50% de mortalidade de uma população-teste) sejam bastante variáveis entre as espécies. Por exemplo,

a toxicidade da amônia, determinada por meio da CL_{50} -48 h, em duas espécies de decápodos peneídeos foi de 42,65 mg/L para *Peneaus chinensis* (Chen & Lin, 1992) e 61,09 mg/L para *Peneaus monodon* (Chen & Lei, 1990), enquanto para o decápoda *Chasmagnathus granulata* esse valor foi de 250,07 mg/L em salinidade 20 ppm (Rebello *et. al.*, 1999)

O aumento da liberação e da concentração de amônia nos ambientes aquáticos pode alterar a toxicidade de outros xenobióticos já presentes nesses locais, particularmente em áreas estuarinas devido à grande pressão antrópica nessas regiões (Campos, 2016). Os metais estão presentes naturalmente no ambiente aquático em concentrações que variam de mg/L a $\mu\text{g/L}$, sendo importantes e necessários pois participam do metabolismo dos seres vivos (Campos, 2016). No entanto, o aumento de diferentes metais no ambiente, como: Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Mercúrio (Hg), Níquel (Ni), Alumínio (Al), Ferro (Fe) e Zinco (Zn) pode acarretar em profundos efeitos tóxicos, além de bioacumular nos tecidos, provocando efeitos deletérios sobre os organismos, tais como alterações na atividade enzimática, tumores e danos neurológicos (Fontes *et. al.*, 2008). Em geral, os metais são de baixa solubilidade e, ao alcançarem a coluna d'água, são incorporados ao material particulado rico em matéria orgânica, se acumulando e residindo por muito tempo no sedimento dos ecossistemas aquáticos (Felix & Cardoso, 2004 e Piedras & Oliveira, 2006).

A biodisponibilidade dos metais em solução corresponde à parte móvel (não complexada) e que pode ser incorporada pelos organismos, por meio da alimentação e de processos fisiológicos. Já a concentração total dos metais no sedimento está relacionada ao tamanho do grão e sua capacidade de adsorver os metais (Grosell *et. al.*, 2002). Nos organismos, os metais são absorvidos através da membrana celular, processo que envolve mecanismos de transporte associadas à atividade de proteínas seletivas que, em geral, são responsáveis pela absorção de outros cátions, como Na^+ e Ca^{2+} , sendo reconhecidos como disruptores da homeostase iônica e osmótica dos organismos aquáticos (Grosell *et. al.*, 2002 e Grosell & Wood, 2002).

Nesse contexto, o cobre (Cu) vem sendo considerado um dos principais contaminantes dos ambientes aquáticos costeiros. O padrão de potabilidade adotado pelo Ministério da Saúde para o cobre é de 2 mg/L (CETESB, 2007), e o valor máximo de emissão para o padrão de qualidade da água é 0,005 mg/L (CONAMA, 2005). Os invertebrados marinhos e estuarinos são altamente sensíveis à exposição ao cobre, como visto pelos reduzidos valores de CL_{50}

determinados para diferentes espécies já avaliadas. As espécies de copépodos do gênero *Acartia* apresentaram CL_{50-96h} entre 31 e 52 mg/L, enquanto os valores de toxicidade encontrada para os misidáceos *Mysiodopsis bahia* e *Holmesimysis costata* variaram de 17 a 77 mg/L (Eisler, 1998). Já para as espécies de anfípodas *Gammarus aequicauda* e *Corophium insidiosum* a $CL_{50-96 h}$, em 36 ppm de salinidade, foi de 0,82 mg/L e de 0,47 mg/L, enquanto para os isópodos *Sphaeroma serratum* e *Idotea báltica* esses valores foram de 4,60 mg/L de 1,45 mg/L, respectivamente (Prato, 2006). Além disso, a interação do cobre com a matéria orgânica na coluna d'água influencia diretamente sua biodisponibilidade e solubilidade (Eisler, 1998).

Tal como visto para o cobre, o cádmio é um metal pesado tóxico e não essencial aos organismos vivos e suas concentrações têm sido aumentadas nos ambientes costeiros, o que tem levado a uma maior preocupação sobre os riscos associados à toxicidade aos organismos aquáticos (Koutsaftis & Aoyama, 2007). Em humanos não fumantes, a principal fonte de contaminação por cádmio é pela ingestão por alimentos sendo o cádmio acumulado nos rins, resultando em pronunciados efeitos nefrotóxicos, causando inicialmente danos morfológicos nos túbulos renais (Jarup & Akesson, 2009). Os sistemas de tratamento de efluentes não eliminam o cádmio, mas apenas reduzem a quantidade total presente na água. Das avaliações em água doce, 95% dos efeitos letais relatados para cádmio ocorrem em concentrações maiores que 2 µg/L, enquanto na água do mar a concentração correspondente seria maior que 95 µg/L (Taylor, 1983). Concentrações de cádmio em águas não poluídas, normalmente são inferiores a 1 µg/L (CETESB, 2007).

A exposição crônica do cádmio é mais problemática do que a exposição aguda e há evidências de bioacumulação (Burger, 2008). A toxicidade do cádmio também é altamente variável em função da espécie estudada, sendo observados valores de $CL_{50-24 h}$, em 20 ppm de salinidade, de 15 mg/L para o caranguejo (Decapoda) *Pagurus longicarpus*, 32,0 mg/L para o molusco (Bivalve) *Mya arenaria*, de 71,0 mg/L para a estrela do mar (Echinodermata) *Asterias forbesi*, de 56,0 mg/L para o invertebrado (Polychaeta) *Nereis virens*, de 175,0 mg/L para o caramujo (Gastropoda) *Nassarius obsoletus* e de 220,0 mg/L para o peixe (Cyprinodontiformes) *Fundulus heteroclitus* (Eisler & Hennekey, 1977).

Entre os parâmetros de qualidade da água que alteram diretamente a biodisponibilidade e toxicidade dos metais pesados se destaca a salinidade, sendo que tanto o cádmio quanto cobre

têm sua toxicidade aumentada em salinidades reduzidas (Zhang *et. al.*, 2014, Wu & Chen, 2004 e Wang *et. al.*, 2017). As concentrações totais de metais, assim como sua biodisponibilidade, são reduzidas em ambientes com alta salinidade pela maior presença de ânions complexantes, onde em salinidades mais altas ocorre uma maior competição de íons metálicos com cátions, como Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} , por seus sítios de ligação na superfície das membranas biológicas (Grossel *et. al.*, 2002; Schwartz, 2007), particularmente nas brânquias (Grossel *et. al.*, 2007). Dessa forma, no ambiente natural a mortalidade dos organismos aquáticos em face da exposição aos metais estaria associada à distúrbios na manutenção da homeostase iônica e osmótica dos animais (Grossel *et. al.*, 2002).

Assim, o aumento da toxicidade em baixas salinidades está diretamente relacionado ao aumento da biodisponibilidade do metal, o que pode ser explicado pela menor complexação de cádmio aos íons cloretos, que normalmente forma complexos com cádmio, zinco e em menor grau com o cobre, diminuindo a concentração do metal livre (Barbieri & Paes, 2011). Em salinidade maior, há competição entre o metal e os cátions pelos sítios de ligação nas membranas dos organismos, como ocorre com o cobre que é absorvido através das membranas nos mesmos sítios de ligação que cátions Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} (**Figura 1**), por isso a interferência na homeostase de Na^+ é o um fator importante na toxicidade aguda do cobre (Grossel *et. at.*, 2007, Schwartz, 2007 e Leonard *et. al.*, 2011). As brânquias dos crustáceos marinhos e estuarinos desempenham diversas funções fisiológicas, e alterações morfo-funcionais em função da exposição a xenobióticos nesse órgão podem resultar em profundos distúrbios respiratórios, metabólicos, na excreção de produtos nitrogenados, no equilíbrio iônico e osmótico e na regulação ácido-base dos animais (Henry *et. al.*, 2002).

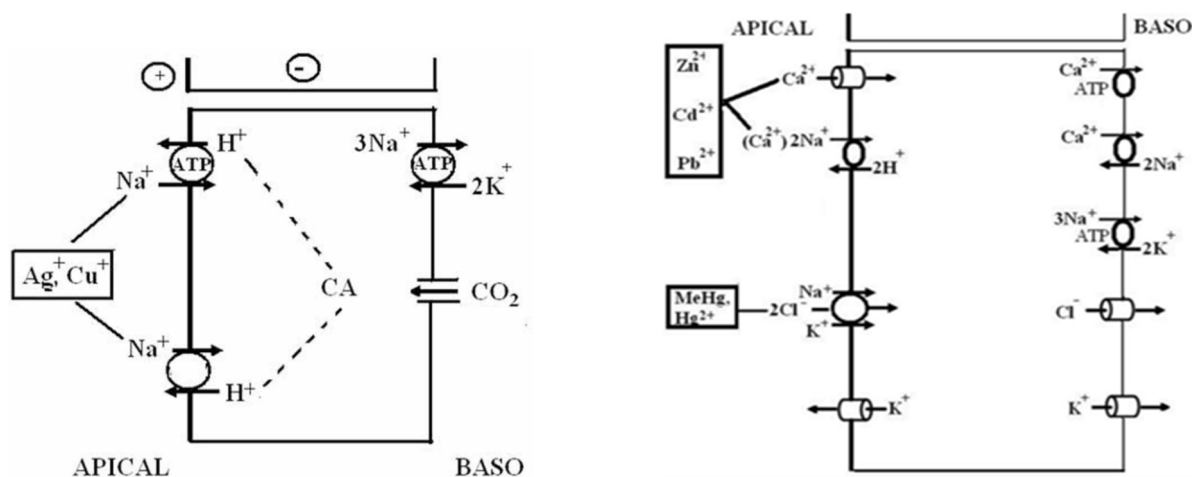


Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de competição entre metais pelos sítios de ligação de cátions (Na^+ e Ca^{2+}) nas brânquias de crustáceos (retirado de Henry *et. al.*, 2002).

Nesse contexto, a utilização de invertebrados aquáticos na avaliação da toxicidade aguda de compostos é extremamente importante, uma vez que estes organismos representam a base da cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos. Por esse aspecto são considerados importantes na avaliação dos efeitos dessas substâncias e para estabelecimento de concentrações aceitáveis nos despejos de efluentes no ecossistema (Bevilacqua *et. al.*, 2008).

O microcrustáceo braquiópoda *Artemia sp.*, conhecida como camarão-de-salmora, é um dos organismos mais utilizados em ensaios de toxicidade aguda de contaminantes, sendo considerado bem adaptado a ambientes com interferência antrópica devido à relativa resistência a fatores de estresse ambiental, como variações abruptas de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido (Bevilacqua *et. al.*, 2008).

Já espécies de crustáceos decápodos do gênero *Litopenaeus*, representado por *Litopenaeus schmitti*, ou camarão-branco, ocorrem no litoral brasileiro; embora nos últimos anos sejam relatadas ocorrências do *L. vannamei*, também conhecido como camarão-cinza e camarão-branco, espécie nativa do Pacífico que foi introduzida no Brasil pela carcinicultura (Neto, 2011). Sua origem e distribuição natural vão desde as águas do Oceano Pacífico na Província de Sonora, México, até o Sul de Tumbes no Peru (Santos, 2007).

As duas espécies de invertebrados selecionadas têm sido descritas como relativamente sensíveis a exposição aguda a metais. A espécie *L. vannamei* demonstra menor sensibilidade para o cobre com $\text{CL}_{50-48 \text{ h}}$ de 56,8 mg/L em salinidade 34 ppm (Frías-Espéricueta *et al.* 2003) em comparação a *A. salina* que apresenta $\text{CL}_{50-48 \text{ h}}$ de 2,34 em 30 ppm (Resgalla & Laitano 2002). Já para o cádmio *L. vannamei* mostrou ser mais sensível com $\text{CL}_{50-24 \text{ h}}$ de 2,58 em 26 ppm (Wu & Chen, 2004) em comparação com *A. salina* com $\text{CL}_{50-24 \text{ h}}$ de 151,1 em 33 ppm (Sarabia, 2002).

Os testes de toxicidade vêm sendo utilizados no Brasil desde a década de 70 em análises da qualidade ambiental e, a partir dos anos 90, para estudos metodológicos, de impacto e monitoramento ambiental. Esses testes são aplicados para avaliar a sensibilidade relativa de uma população de organismos expostos a diversas concentrações de uma substância padrão, sendo que a sensibilidade da população é avaliada através da comparação com dados pré-existentes do laboratório (Resgalla & Laitano, 2002 e Abessa, 2003). A padronização dos experimentos laboratoriais, tanto para cultura dos organismos e as

condições do meio de forma constante são importantes a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados. Os parâmetros para determinação e controle da qualidade da água baseiam-se em dados obtidos a partir de testes de toxicidade com substâncias isoladas. No entanto, do ponto de vista ambiental, essa abordagem pode ser inadequada pois não considera a ação conjunta de diferentes substâncias que podem ser encontradas em níveis elevados no ambiente aquático.

Recentemente, estudos têm demonstrado efeitos acentuados nos testes realizados com misturas de substâncias, onde os xenobióticos em conjunto podem apresentar ação aditiva ou sinérgica (Koutsaftis & Aoyama, 2007 e Wang *et. al.*, 2017). Esses efeitos observados indicam que os parâmetros de qualidade da água podem subestimar os efeitos combinados das diferentes substâncias lançadas no ambiente aquático, e suas possíveis interações junto aos sítios de ação tóxica dos contaminantes nos organismos aquáticos (Verslycke *et. al.*, 2003 e Frías-Espéricueta *et. al.*, 2008). No entanto, estes testes são geralmente realizados em condições controladas, onde as concentrações de amônia são mantidas em níveis reduzidos. Assim, o efeito da presença de níveis aumentados de amônia devido a ações antrópicas nos ambientes aquáticos, sobre a toxicidade de xenobióticos permanece pouco estudado.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a influência de níveis sub letais de amônia na água sobre a toxicidade dos metais cobre e cádmio para duas espécies de crustáceos, *Artemia salina* e *Litopenaeus vannamei*, aclimatados em salinidade reduzida, contribuindo para o melhor entendimento da interação entre contaminantes no ambiente natural.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Determinar a concentração letal média (CL₅₀) da amônia, do cobre e do cádmio em 24 e 48 h para as espécies de crustáceos *Artemia salina* e *Litopenaeus vannamei*;
- II. Determinar a concentração letal média (CL₅₀) do cobre e do cádmio em 24 e 48 h para o invertebrado *Litopenaeus vannamei* na presença de níveis sub letais de amônia (25% e 50%) na água;

- III. Determinar a concentração letal média (CL₅₀) do cobre e do cádmio em 24 e 48 h para invertebrado *Artemia salina*, na presença de níveis sub letais de amônia (25% e 50%) na água.

3. Material & Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia Aquática (LECTA), do Instituto de Biociências (IB/CLP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), e no laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), campus Baixada Santista. Os ensaios de toxicidade aguda com amônia, cobre e cádmio foram realizados com duas espécies de invertebrados, a saber: *Artemia salina* (microcrustáceo) e *Litopenaeus vannamei* (crustáceo). Para realização dos testes de toxicidade aguda com *A. salina* foi utilizado o protocolo descrito por Veiga & Vital (2002), e para *L. vannamei* utilizado por Wu & Chen (2004).

As pós-larvas de *L. vannamei* foram obtidas do incubatório comercial Aquatec, localizado no Rio Grande do Norte, e mantidas no campus da Unifesp Baixada Santista, em Santos. As pós-larvas foram aclimatadas sob condições laboratoriais por 2 semanas, em água do mar com as seguintes características físico-químicas: temperatura 27 °C, salinidade 20 ppm, pH 7,0 – 7,5, com aeração constante, em tanques de polietileno de 500 L, sendo alimentados a cada 3 h pela equipe do laboratório de aquicultura da Unifesp. Antes dos experimentos as pós-larvas foram aclimatadas à 19 ppm por 2 h, depois 17 ppm por 2 h e 15 ppm por 2 h. Já os exemplares de *A. salina* foram adquiridos na forma de cistos junto a comércio de aquicultura Maramarpet, e eclodidas diretamente em água do mar diluída à 15 ppm no laboratório, mantidas em aeração constante e em temperatura entre 26 e 27°C, sendo os testes realizados 48 h após a eclosão (fase larval metanaúplio II).

Para realização dos testes de toxicidade aguda concentrações crescentes das substâncias foram preparadas através da diluição de uma solução-padrão em água mar diluída à 15 ppm, sendo cada teste realizado em triplicata para *A. salina*, devido a facilidade de obter os organismos, e em apenas uma réplica para *L. vannamei*. Ao todo, em cada teste de toxicidade, foram testadas 10 concentrações das substâncias, além do grupo controle sem a adição dos xenobióticos, sendo 10 organismos expostos a cada concentração testada. Os controles foram expostos à água do mar filtrada diluída à 15 ppm (água do mar ajustada com água doce deionizada). A água utilizada nos ensaios foi previamente filtrada, sendo usados

filtros de 30 μm , depois 5 μm e depois 1 μm para os experimentos com *L. vannamei*, e filtros de 0,45 μm para os experimentos com *A. salina*. O sistema foi mantido a temperatura constante de 26-27 °C com iluminação 12:12 luz-escuro. Após 24 e 48 h de exposição aos xenobióticos, foram determinadas a mortalidade em cada concentração testada, e os animais mortos foram retirados dos recipientes experimentais.

Para *A. salina*, as concentrações nominais do cobre neste estudo foram selecionadas a partir do estudo realizado por Gajbhiye & Hirota (1990), onde a CL_{50-24} e 48vh foi de 9,5 e 4,0 mg/L, nas concentrações testadas de 0,5; 5; 10; 15 e 20 mg/L em 33 de salinidade. Assim como para o cádmio onde a CL_{50-24} e 48vh foi de 1,7 e 1,5 mg/L nas concentrações testadas de 0,5; 1; 2,5; 3 e 4 mg/L em 33 ppm (Gajbhiye & Hirota 1990). Para a amônia foi utilizado como base o estudo de Chen e colaboradores (1989), onde a CL_{50-24} e 48vh foi de 839,50 e 334,70 mg/L nas concentrações testadas de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L em 30 de salinidade. Assim, as concentrações nominais testadas de amônia nos testes para *A. salina* foram: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/L, para o cobre foram: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0 e 2,0 mg/L e para o cádmio foram: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 180, 240 e 300 mg/L.

Para *L. vannamei*, as concentrações nominais do cobre neste estudo foram selecionadas a partir do estudo realizado por Frías-Espéricueta (2003), onde a CL_{50-48} h foi de 56,80 mg/L nas concentrações testadas de 12, 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112 e 128 mg/L em 34 de salinidade. Já para o cádmio foi utilizado como base o estudo de Wu & Chen (2004), onde a CL_{50-24} e 48 h foi de 2,58 e 1,30 mg/L nas concentrações testadas de 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 8 mg/L em 15 ppm, enquanto para a amônia a CL_{50-24} e 48 h foi de 59,72 e 40,58 mg/L, nas concentrações testadas de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 125 mg/L em 15 de salinidade (Lin & Chen, 2001). Para *L. vannamei*, as concentrações de amônia testada foram: 6,0; 12,0; 18,0; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0; 150,0; 180,0 e 210,0 de mg/L; já para o cádmio foram: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3,0 mg/L; enquanto as concentrações de cobre foram: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10; 20; 40 e 80 mg/L.

Após os primeiros testes para a determinação da toxicidade da amônia para os animais, foram selecionadas duas concentrações sub letais de amônia, referentes a 25% e 50% do valor da CL_{50-48} h para *A. salina* e *L. vannamei* e a realização de novos ensaios para a determinação da toxicidade do cobre e do cádmio. Em cada ensaio de toxicidade foram

avaliados, ao longo do período de teste, parâmetros físicos e químicos da água, tais como: temperatura, pH, salinidade e níveis de amônia na água. Amostras de água de cada recipiente experimental foram retiradas para posterior determinação da concentração real de cobre e cádmio nos experimentos. Já a concentração total de amônia na água em cada um dos recipientes experimentais, em cada um dos testes realizados, foi determinada por meio de ensaio colorimétrico baseado na formação de indofenol, pela reação de grupos fenólicos com hipoclorito, e lidos em espectrofotômetro (Versamax, Molecular Devices) a 650 nm (Verdouw *et. al.*, 1978). Após a determinação da concentração de amônia total, a concentração de amônia não ionizada, ou amônia tóxica, foi calculada em função da temperatura e pH, medidos durante o teste, baseado no cálculo proposto por Emerson e colaboradores (1975).

As CL_{50} em 24 e 48 h de exposição à cada um dos xenobióticos avaliados, na presença e ausência de níveis sub letais de amônia na água, foram determinadas a partir da mortalidade observada e da concentração das substâncias na água, por meio do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et. al.*, 1977). Diferenças significativas entre os parâmetros físicos e químicos dos testes foram avaliados por meio de uma análise de variância de um fator (ANOVA one-way), onde foram analisados os dados de temperatura e pH em função do tempo de exposição (24 e 48 h), sendo mantido nível de significância de 95%.

4. Resultados

As concentrações letais médias de amônia, cobre e cádmio após 24 e 48 h de exposição para a espécie *Artemia salina* estão representadas na **Figura 2**. Não foi observada mortalidade dos animais nas condições controle (i.e sem contaminante) ao longo das 48 h de teste para os três contaminantes testados isoladamente, em cada uma das três réplicas. O cobre foi o elemento mais tóxico para *A. salina*, seguido do cádmio e amônia. As CL_{50} do cobre em 24 e 48 h de exposição foram de 0,37 (limite superior 0,43 – limite inferior 0,24 mg/L) e 0,24 (0,28 – 0,21 mg/L), representando um aumento de 35% na toxicidade do metal entre os dois períodos analisados. Já as CL_{50} para o cádmio foram de 50,21 (61,89 – 40,73) e 24,93 (91,58 – 6,5 mg/L) após 24 e 48 h de exposição, respectivamente. Isso representa uma redução de cerca de 50% nos valores de CL_{50} entre os dois períodos. A amônia apresentou valores de CL_{50} -24 h de 837,78 (900,47 – 779,46 mg/L) e CL_{50} -48 h de 327,61 (385,90 – 278,12 mg/L), indicando um aumento na toxicidade de cerca de 61% entre os períodos analisados. Em

relação à concentração de amônia não-ionizada (NH_3), esses valores de CL_{50} em 24 e 48 h representam 109,66 mg/L e 104,94 mg/L de amônia não ionizada, respectivamente. Os dados de temperatura e pH nos ensaios com cobre, cádmio e amônia para *A. salina* estão representados na **Tabela 1**. A temperatura média dos testes foi 26,06 °C durante as 48 h, enquanto a média de pH do experimento foi de 7,58.

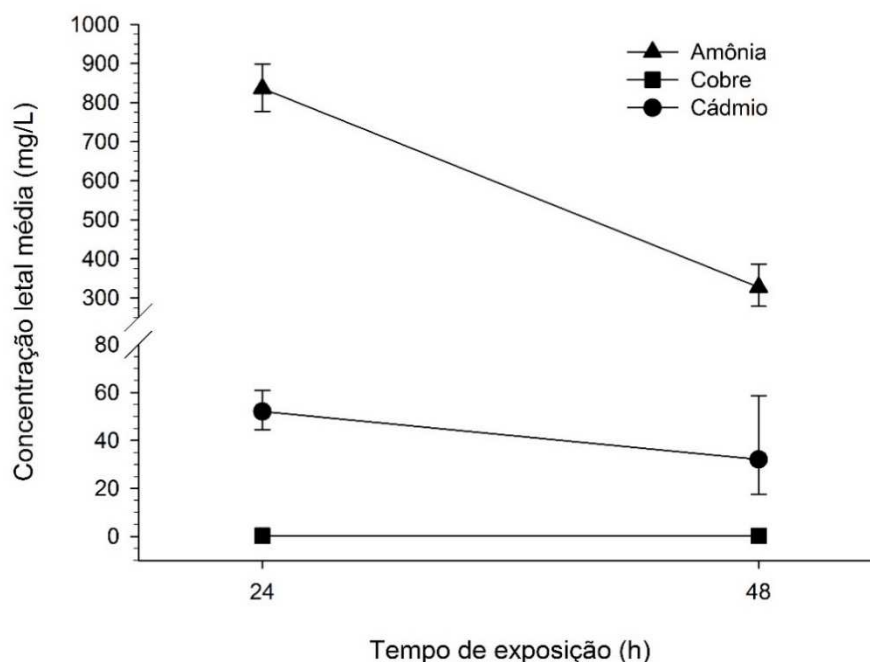


Figura 2. Valores da concentração letal média (CL_{50}), e limites inferiores e superiores, após 24 e 48 horas de exposição ao cobre, cádmio e amônia (mg/L) para a espécie *Artemia salina* mantida a 15 ppm. Valores de CL_{50} foram calculados pelo método trimmed Spearman-Kärber.

Tabela 1. Valores de temperatura, pH e da concentração letal média (CL_{50}) após 24 e 48 horas de exposição aos xenobióticos nos ensaios com *Artemia salina*.

Teste de toxicidade	Tempo de exposição (h)	Temperatura (°C)	pH	CL_{50} (mg/L)
Cobre	24	26,00 ± 0,00	7,73 ± 0,00	0,37 (0,24-0,43)
	48	26,00 ± 0,00	7,58 ± 0,02	0,24 (0,21-0,28)
Cádmio	24	26,96 ± 0,08	7,55 ± 0,00	50,21 (61,89-40,73)
	48	26,48 ± 0,08	7,57 ± 0,01	24,93 (6,5-91,58)
Amônia	24	25,45 ± 0,02	7,55 ± 0,00	837,78 (779,16-900,47)

48	25,49 ± 0,01	7,54 ± 0,01	327,61 (1,44-15,80)
----	--------------	-------------	------------------------

Após a determinação da CL₅₀-48 h de amônia, novos testes de toxicidade para o cádmio e cobre, foram realizados utilizando níveis sub letais de amônia, representando 25% (82 mg/L) e 50% (164 mg/L) dos valores da CL₅₀-48 h calculada para a espécie. A CL₅₀-24 h do cobre para *A. salina* na presença de 25% da CL₅₀-48 h de amônia (i.e. 82 mg/L) foi de mais de 2,00 mg/L, indicando diminuição de 400% na toxicidade do cobre (0,37 mg/L) no mesmo período na ausência de amônia na água. Já a CL₅₀-48 h foi de 0,64 (0,53-0,78 mg/L) representando diminuição de 166% na toxicidade do metal (0,24 mg/L) no mesmo período de exposição sem a presença de amônia. No teste na presença de 50% da CL₅₀-48 h de amônia (i.e. 164 mg/L), a CL₅₀-24 h do cobre foi de 1,81 mg/L (1,44 – 15,80 mg/L) e a CL₅₀-48 h foi de 0,35 (0,18 – 0,68 mg/L), indicando redução de 79% e 31% na toxicidade do cobre após 24 e 48 h, respectivamente, em relação ao teste na ausência de amônia na água (**Figura 3**). A temperatura média dos testes de toxicidade com cobre na presença de níveis sub letais de amônia foi 25,97°C durante as 48 h, enquanto a média de pH do experimento foi de 7,61 (**Tabela 2**).

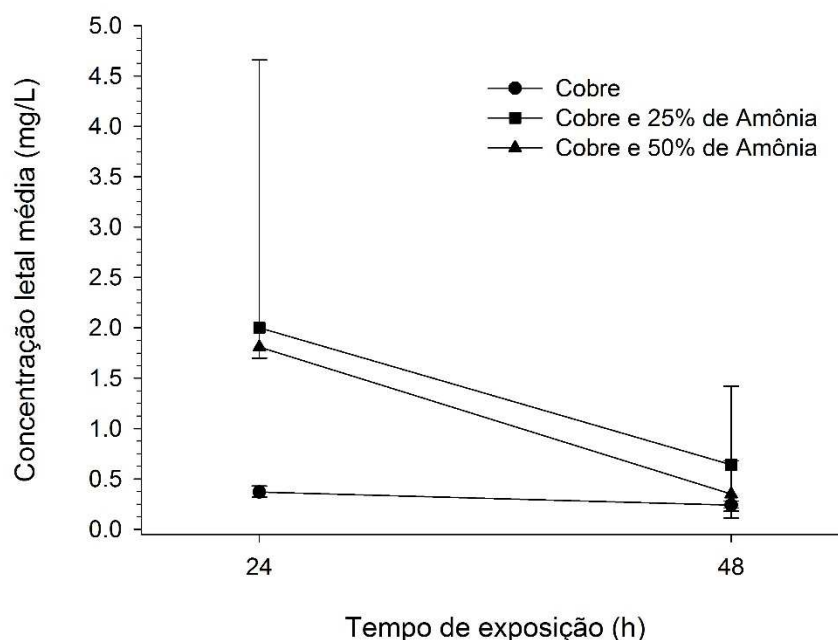


Figura 3. Valores da concentração letal média (CL₅₀), e limites inferiores e superiores, após 24 e 48 horas de exposição ao cobre isoladamente, e na presença de níveis sub letais de

amônia na água (mg/L), para a espécie *A. salina* mantida a 15 ppm. Valores de CL_{50} foram calculados pelo método trimmed Spearman-Kärber.

Nos testes com cádmio foi observado uma leve redução da toxicidade do metal nas primeiras 24 h de exposição na presença dos níveis sub letais de amônia na água, enquanto após 48 h os valores de CL_{50} de cádmio determinados na presença e ausência de amônia foram bastante similares (**Figura 4**). A toxicidade do cádmio na presença de 25% da CL_{50} -48 h de amônia, determinada como CL_{50} -24 h, foi de 73,40 mg/L (65,64-82,07 mg/L), sendo 31% maior que nos testes iniciais sem amônia (50,21 mg/L), enquanto a CL_{50} -48 h foi de 27,51 (19,21-39,40 mg/L) sendo 9% maior que nos testes iniciais sem amônia (24,93 mg/L). No teste com 50% da CL_{50} -48 h de amônia, as CL_{50} s após 24 e 48 h de exposição ao cádmio foram de 70,80 (63,56-78,86 mg/L) e 34,55 (19,62-60,83 mg/L), indicando um aumento de 29% e 28% na toxicidade do metal em relação aos testes iniciais sem amônia na água (50,21 e 24,93 mg/L, respectivamente, **Figura 4**). A temperatura média dos testes toxicidade com cádmio na presença de níveis sub letais de amônia foi 25,13 °C durante as 48 h, enquanto a média de pH do experimento foi de 7,56 (**Tabela 2**).

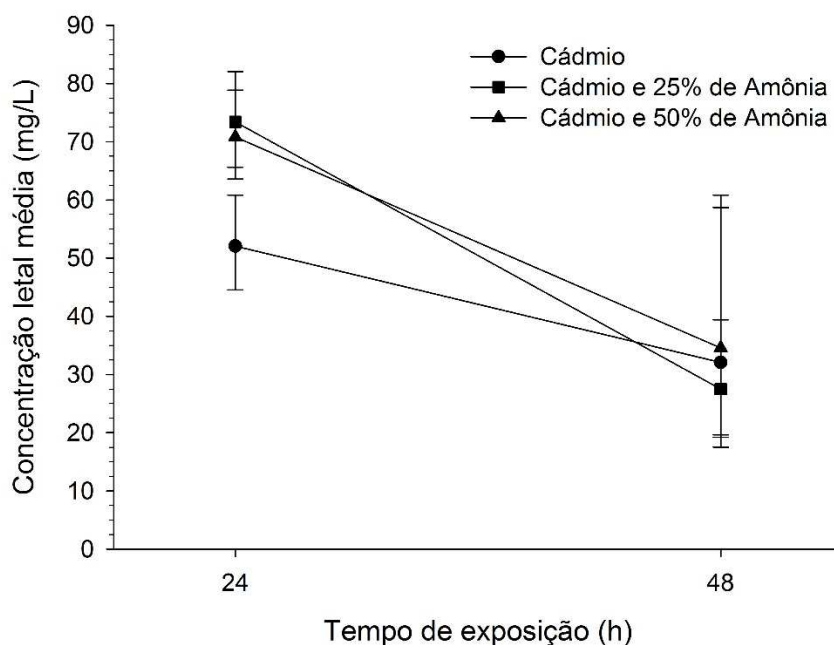


Figura 4. Valores da concentração letal média (CL_{50}), e limites inferiores e superiores, após 24 e 48 horas de exposição ao cádmio isoladamente, e na presença de níveis subletais de

amônia na água (mg/L), para a espécie *Artemia salina* mantida a 15 ppm. Valores de CL₅₀ foram calculados pelo método trimmed Spearman-Kärber.

Tabela 2. Valores de temperatura, pH e concentração letal média (CL₅₀) após 24 e 48 horas de exposição nos testes de toxicidade com cobre e cádmio na presença de dois níveis sub letais de amônia na água com *Artemia salina*.

Teste de toxicidade	Tempo de exposição (h)	Temperatura (°C)	pH	CL ₅₀ (mg/L)
Cobre + 25% Amônia	24	26,64 ± 0,04	7,55 ± 0,00	2,00 (-)
	48	25,51 ± 0,02	7,68 ± 0,01	0,64 (0,53- 0,78)
Cobre + 50% Amônia	24	26,30 ± 0,04	7,55 ± 0,00	1,81 (1,44-15,80)
	48	25,43 ± 0,08	7,67 ± 0,01	0,35 (0,18-0,68)
Cádmio + 25% Amônia	24	25,68 ± 0,12	7,53 ± 0,00	73,40 (65,64-82,07)
	48	25,01 ± 0,08	7,61 ± 0,01	27,51 (19,21-39,40)
Cádmio + 50% Amônia	24	25,01 ± 0,04	7,53 ± 0,00	70,80 (63,56-78,86)
	48	24,84 ± 0,03	7,59 ± 0,02	34,55 (19,62-60,83)

As concentrações letais médias de cobre, cádmio e amônia em 24 e 48 h para a espécie *Litopenaeus vannamei* estão representadas na **Figura 5**. Os controles não apresentaram mortalidade ao longo do período de exposição. Para a espécie o cádmio foi o elemento mais tóxico, seguido do cobre e da amônia. As CL₅₀ do cobre em 24 e 48 h de exposição foram de 51,31 (limite superior 73,30 – limite inferior 35,90 mg/L) e 11,61 (20,72 - 6,50 mg/L), representando um aumento de 77% na toxicidade do metal entre os dois períodos analisados. Já para o cádmio os valores de CL₅₀ foram de 1,29 (1,64 - 1,01) e 0,64 (0,80 - 0,51 mg/L) após 24 e 48 h de exposição, respectivamente. Isso representa uma redução de cerca de 50% nos valores de CL₅₀ entre os dois períodos. A amônia apresentou valores de CL₅₀-24 h de 100,87 (123,34 – 82,49 mg/L) e CL₅₀-48 h de 81,30 (96,30 – 68,64 mg/L), que indicam um aumento na toxicidade de cerca de 19% entre os períodos analisados. Em relação à concentração de amônia não-ionizada (NH₃), esses valores de CL₅₀ em 24 e 48 h representam 2,73 mg/L e 2,20 mg/L de amônia não ionizada, respetivamente. Os dados de temperatura e pH nos ensaios com cobre, cádmio e amônia para *L. vannamei* estão representados na **Tabela**

3. A temperatura média durante esses ensaios de toxicidade foi de 26,67°C durante as 48 h, enquanto a média de pH foi de 7,67.

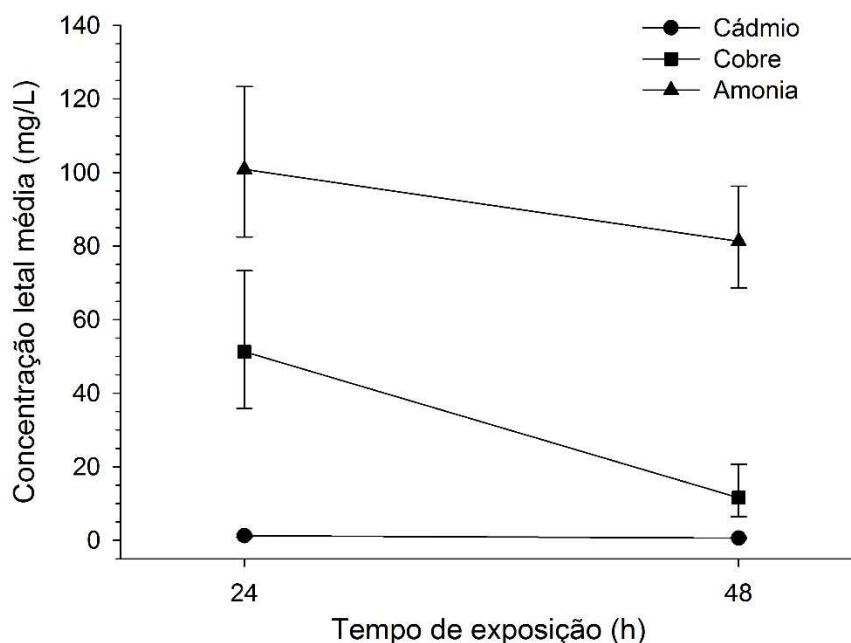


Figura 5. Valores da concentração letal média (CL₅₀), e limites inferiores e superiores, após 24 e 48 horas de exposição ao cobre, cádmio e amônia (mg/L) para a espécie *Litopenaeus vannamei* mantida a 15 ppm. Valores de CL₅₀ foram calculados pelo método trimmed Spearman-Kärber.

Tabela 3. Valores de temperatura, pH e concentração letal média (CL₅₀) após 24 e 48 horas de exposição aos xenobióticos nos ensaios com *Litopenaeus vannamei*.

Teste de toxicidade	Tempo de exposição (h)	Temperatura (°C)	pH	CL ₅₀ (mg/L)
Cobre	24	26,79 ± 0,03	7,64 ± 0,02	51,31 (35,90-73,30)
	48	26,96 ± 0,03	7,67 ± 0,02	11,61 (6,50-20,72)
Cádmio	24	25,05 ± 0,03	7,71 ± 0,01	1,29 (1,01-1,64)
	48	27,13 ± 0,03	7,75 ± 0,01	0,64 (0,51-0,80)
Amônia	24	26,88 ± 0,06	7,66 ± 0,02	100,87 (82,49-123,34)
	48	27,22 ± 0,06	7,64 ± 0,03	81,30 (68,64-96,30)

Após a determinação da CL_{50} -48 h de amônia, novos testes de toxicidade para o cádmio e cobre, foram realizados utilizando níveis sub letais de amônia, representando 25% (20,32 mg/L) e 50% (40,65 mg/L) dos valores da CL_{50} -48 h calculada para a espécie. O valor da CL_{50} -24 h do cobre para *L. vannamei* na presença de 25% da CL_{50} -48 h de amônia (i.e. 20,32 mg/L) foi de 18,65 mg/L (limite inferior 10,36 - limite superior 33,56 mg/L), indicando um aumento de 63% na toxicidade do cobre (51,31 mg/L) no mesmo período de exposição na ausência de amônia na água. Já a CL_{50} -48 h foi de 4,77 (1,44-15,8 mg/L) representando um aumento de 59% na toxicidade do metal (11,61 mg/L). No teste na presença de 50% da CL_{50} -48 h de amônia (i.e. 40,65 mg/L), a CL_{50} -24 h do cobre foi de 4,77 mg/L (1,44 – 15,80 mg/L) e a CL_{50} -48 h foi de 0,58 (0,12 – 2,95 mg/L), indicando um aumento de mais de 90% na toxicidade do cobre nos dois períodos analisados, em relação a toxicidade do metal na ausência de amônia (**Figura 6**).

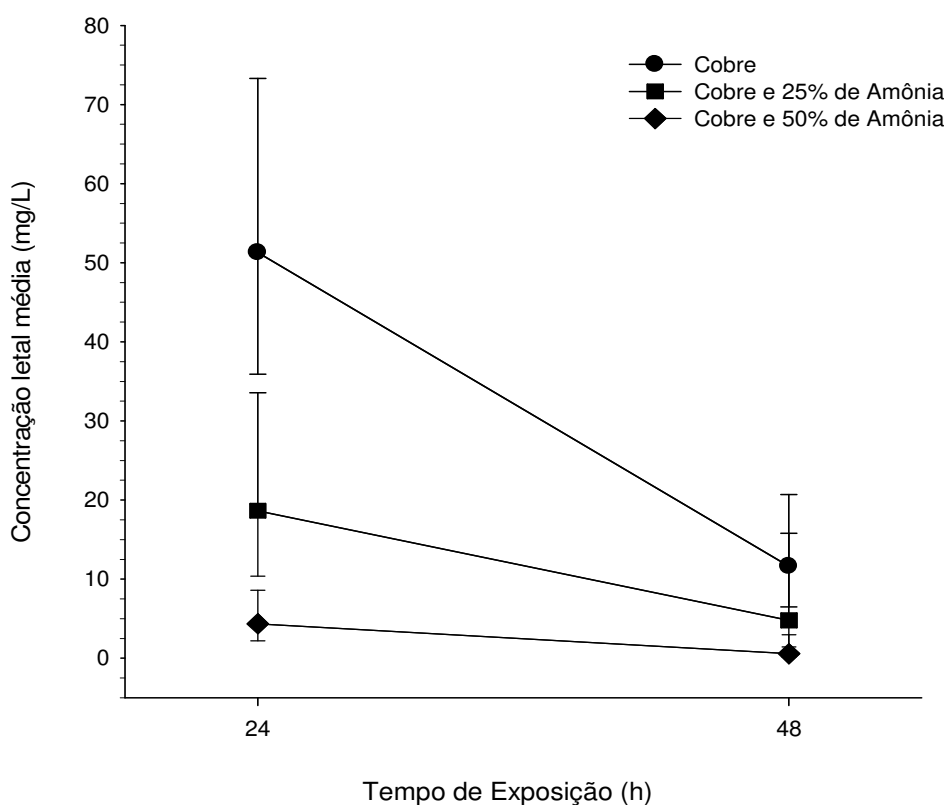


Figura 6. Valores da concentração letal média (CL_{50}), e limites inferiores e superiores, após 24 e 48 horas de exposição ao cobre isoladamente, e na presença de níveis sub letais de amônia na água (mg/L), para a espécie *Litopenaeus vannamei* mantida a 15 ppm. Valores de CL_{50} foram calculados pelo método trimmed Spearman-Kärber.

Embora o cádmio tenha sido mais tóxico que o cobre para *L. vannamei* nos testes realizados sem a presença de níveis sub letais de amônia, não foi observado forte efeito da amônia na água sobre a toxicidade do metal. Além disso, a exposição a 50% da CL_{50} -48 h de amônia fez com que a toxicidade do cádmio fosse ligeiramente reduzida, em relação ao cobre, após 48 h de exposição. A toxicidade do cádmio na presença de 25% da CL_{50} -48 h de amônia, determinada como CL_{50} -24 h, foi de 1,55 (0,67 – 1,97 mg/L), sendo 11% mais tóxico que nos testes iniciais sem amônia, enquanto a CL_{50} -48 h foi de 0,49 (0,37 – 0,67 mg/L) representando um aumento de 23,5% na toxicidade do cádmio nesse período. No teste com 50% da CL_{50} -48 h de amônia, as CL_{50} após 24 e 48 h de exposição ao cádmio foram de 1,42 (1,02 – 1,99 mg/L) e 0,61 (0,44 – 0,84 mg/L), indicando uma redução de 10% na toxicidade do metal em 24 h, e um aumento de 4,7% após 48 h (**Figura 7**). Os valores médios de temperatura e pH nos testes para determinação da CL_{50} de cobre e cádmio na presença de níveis sub letais de amônia para *L. vannamei* estão demonstrados na **Tabela 4**. A temperatura média durante esses ensaios de toxicidade foi de 27,17°C durante as 48 h, enquanto a média de pH foi de 7,66.

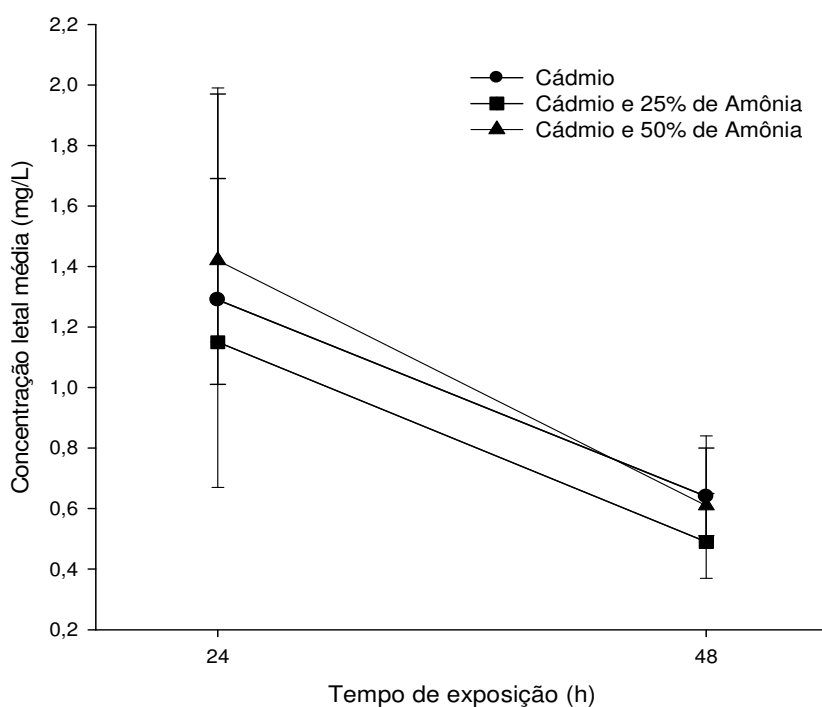


Figura 7. Valores da concentração letal média (CL_{50}), e limites inferiores e superiores, após 24 e 48 horas de exposição ao cádmio isoladamente, e na presença de níveis sub letais de amônia na água (mg/L), para a espécie *Litopenaeus vannamei* mantida a 15 ppm. Valores de CL_{50} foram calculados pelo método trimmed Spearman-Kärber.

Tabela 4. Valores de temperatura, pH e concentração letal média (CL₅₀) após 24 e 48 horas de exposição ao cobre e cádmio na presença de dois níveis sub letais de amônia na água com *Litopenaeus vannamei*.

Teste de toxicidade	Tempo de exposição (h)	Temperatura (°C)	pH	CL ₅₀ (mg/L)
Cobre + 25% Amônia	24	27,42 ± 0,06	7,67 ± 0,01	18,65 (10,36-33,56)
	48	27,25 ± 0,04	7,72 ± 0,01	4,77 (1,44-15,80)
Cobre + 50% Amônia	24	28,09 ± 0,05	7,66 ± 0,01	4,77 (1,44-15,80)
	48	27,99 ± 0,04	7,66 ± 0,02	0,58 (0,12-2,95)
Cádmio + 25% Amônia	24	26,44 ± 0,04	7,65 ± 0,01	1,55 (0,67-1,97)
	48	26,67 ± 0,03	7,68 ± 0,02	0,49 (0,37-0,67)
Cádmio + 50% Amônia	24	26,63 ± 0,04	7,62 ± 0,02	1,42 (1,02-1,99)
	48	26,90 ± 0,04	7,67 ± 0,02	0,61 (0,44-0,84)

5. Discussão

Para ambas as espécies de invertebrados utilizadas no presente estudo, e aclimatadas a 15 ppm, a amônia foi o elemento menos tóxico, seguido do cobre e cádmio para *A. salina*, enquanto para *L. vannamei* o cádmio foi o elemento mais tóxico seguido pelo cobre (**Figuras 2 e 5**). Além disso, os valores de CL₅₀ 24 e 48 h de cádmio e cobre determinados para ambas as espécies de invertebrados em salinidade 15 ppm foram, em geral, fortemente reduzidos em comparação a estudos prévios utilizando as mesmas espécies e xenobióticos em salinidades mais elevadas. Por exemplo, estudos prévios determinaram a CL₅₀-48 h de cobre para *A. salina* em 2,34 mg/L (Resgalla & Laitano, 2002), e em 4,80 mg/L (Gajbhiye & Hirota, 1990), em testes de toxicidade conduzidos em água do mar com salinidade 30 ppm. Em comparação com esses estudos realizados em salinidade entre 30-35 ppm, os valores de CL₅₀ de cobre em 24 e 48 h de exposição para *A. salina* em salinidade 15 ppm são cerca de 13 e 79 vezes menores.

Para *L. vannamei*, Frias-Espericueta *et. al.*, (2003) determinaram a CL₅₀ de cobre após 48 h de exposição, em salinidade 34 ppm, em 56,8 mg/L. Para larvas e pós-larvas da espécie de camarão *Metapenaeus ensis* mantidas em água do mar em salinidade 30-34 ppm, a CL₅₀-48

h do cobre variou entre 0,16 e 4,76 mg/L para os diferentes estágios de vida testados (Wong *et. al.*, 1993), enquanto o camarão-branco legítimo (*Palaemon serratus*) apresentou CL₅₀-48 h de 3,30 mg/L (Mariño-Balsa *et. al.*, 2000). Por outro lado, os exemplares de *L. vannamei* mantidos a 15 ppm neste estudo apresentaram CL₅₀ de 51,31 e 11,61 mg/L após 24 e 48 h de exposição ao cobre. Assim, nossos dados indicam que a espécie *L. vannamei* pode ser considerada menos sensível aos efeitos tóxicos do cobre, em relação a outras espécies de crustáceos decápodes, mesmo quando aclimatados em salinidades reduzidas. Em relação ao cádmio, Chen & Wu (2004) determinaram valores de CL₅₀-24 h para *L. vannamei* de 2,58 mg/L, e CL₅₀-48 h de 1,30 mg/L, em testes com salinidade variando entre 23 e 26 ppm. Em pós larvas de *L. vannamei* mantidos em salinidade 34 ppm a CL₅₀ do cádmio variou entre 11 e 4 mg/L após 24 e 72 h de exposição, sendo determinada posteriormente CL₅₀-96 h de 2,49 mg/L (Frías-Espéricueta *et. al.*, 2001). Neste estudo, com salinidade 15 ppm, obtivemos valores de CL₅₀-24 e 48 h para o cádmio de 1,29 mg/L e 0,64 mg/L, respectivamente. Em conjunto, os valores de CL₅₀ de cobre e cádmio para *A. salina*, e cádmio para *L. vannamei*, em salinidade 15 ppm, em comparação com estudos prévios, corroboram achados que demonstram que a redução da salinidade do meio pode levar ao aumento da toxicidade dos metais para os invertebrados, e que isto estaria relacionado à maior biodisponibilidade dos metais em menores salinidades (Barbieri, 2010).

Similarmente, estudos têm demonstrando que a toxicidade aguda da amônia é aumentada com a redução da salinidade do meio para diferentes espécies de crustáceos decápodes, tais como para o camarão carnudo *Penaeus chinensis* onde foi observada CL₅₀-48 h de amônia em 30 ppm de 53,94 mg/L, enquanto em 20 e 10 ppm os valores foram de 42,65 mg/L e 34,77 mg/L, respectivamente (Chen & Lin, 1992). Embora os valores de CL₅₀ para a amônia total após 24 e 48 h de exposição no presente estudo (i.e 100,87 e 81,30 mg/L) sejam em média 1,85 vezes maiores do que observado por Chen & Lin (2001) para a *L. vannamei* em salinidade 15 ppm, a concentração letal média de amônia não-ionizada estimada em ambos os estudos são bastante similares. Segundo Chen & Lin (2001) a CL₅₀-24 e 48 h de amônia não-ionizada para *L. vannamei* em salinidade 15 ppm foi de 2,95 e 2,00 mg/L, respectivamente, enquanto no presente estudo determinamos valores de 2,73 e 2,20 mg/L nos mesmos períodos de exposição, indicando que concentrações de amônia não-ionizada (NH₃-N) acima de 2,0 mg/L são suficientes para promover efeitos tóxicos para a espécie em salinidade reduzida. Por outro lado, para *A. salina*, os valores de CL₅₀ de amônia total em 24 e

48 h de exposição determinados em salinidade 15 ppm no presente estudo (i.e 836,20 e 327,83 mg/L) foram similares aos observados por Chen e colaboradores (1989) para a mesma espécie em salinidade 30 ppm (839,5 e 334,7 mg/L, respectivamente), sugerindo que a redução da salinidade não interferiu significativamente na toxicidade da amônia para a espécie.

Neste estudo pudemos observar que a presença de níveis sub letais de amônia (25 e 50%) na água alterou diferencialmente a toxicidade dos metais para as espécies testadas. Para *A. salina*, a toxicidade do cobre e cádmio foi fortemente reduzida nos testes na presença de 25% e 50% da CL₅₀-48 h de amônia, particularmente nas primeiras 24 h de exposição. Da mesma forma, após 48 h, a exposição a 25% da CL₅₀-48 h de amônia reduziu a toxicidade do cobre para *A. salina* (i.e. aumento da CL₅₀-48 h de cobre), enquanto não foi observado um efeito da presença de amônia na água na toxicidade do cádmio após 48 h de exposição. Esses resultados sugerem que a presença de níveis sub letais de amônia na água resultaram em efeito antagonista com o cobre e cádmio sobre a mortalidade de *A. salina*, onde o efeito resultando da interação entre os contaminantes foi menor do que o esperado.

Efeitos antagônicos da exposição à amônia e nitrito foram observados em pós larvas do camarão branco *Penaeus setiferus*, onde a mistura de amônia e nitrito foi menos tóxica (i.e maiores valores de CL₅₀-72 h) do que o nitrito sozinho, especialmente nas maiores concentrações de amônia testadas (Alcaraz *et. al.*, 1999). Similarmente, efeito antagônico da mistura de amônia, nitrito e nitrato foi observado sobre a mortalidade de *L. vannamei* mantidos em baixa salinidade (3 g/L), particularmente entre as primeiras 24 e 72 h de exposição a mistura dos compostos (Valencia-Castañeda *et. al.*, 2019). Uma vez que a toxicidade aguda de metais é fortemente relacionada com a tomada e acúmulo desses xenobióticos nos órgão-alvo dos organismos aquáticos (Niyogi & Wood, 2004), o efeito antagônico entre a amônia e o cobre/cádmio sobre a mortalidade de *A. salina* sugere um menor acúmulo dos metais pelos animais na presença de níveis sub letais de amônia na água, levando a uma redução da toxicidade nessas condições. Por outro lado, foi observado um drástico aumento da toxicidade do cobre para *L. vannamei* na presença de níveis sub letais de amônia em ambos os períodos analisados, sendo esse efeito mais proeminente na maior concentração de amônia testada (i.e 50% da CL₅₀-48 h de amônia). Já nos ensaios com cádmio, não foi observado um efeito aparente da presença de amônia na água sobre a toxicidade do metal para os exemplares de *L. vannamei*.

Em conjunto, esses resultados indicam que a presença de amônia na água pode resultar em efeitos sinérgicos sobre a toxicidade do cobre, mas não do cádmio, para a espécie *L. vannamei*. A presença de altos níveis de amônia na água pode levar ao aparecimento de danos nas brânquias, a principal rota de entrada de contaminantes (como metais) nos organismos aquáticos, levando a distúrbios no funcionamento do órgão, tal como aumento da excreção de amônia e do consumo de oxigênio (Barbieri, 2010). Além dos efeitos respiratórios e osmorregulatórios, a exposição a altos níveis de amônia, particularmente em salinidades reduzidas e pH próximo a 7.0, pode levar a distúrbios no balanço hídrico dos organismos aquáticos, e favorecer a tomada de amônia do meio externo, aumentando a sua retenção nos fluídos corpóreos dos animais (Eddy, 2005). A respiração e a excreção são funções fisiológicas essenciais no metabolismo dos organismos e, por isso, são funções consideradas importantes indicadores para avaliação do efeito que as substâncias podem causar nos organismos. A exposição a metais pesados, como o cobre e cádmio, também tem sido demonstrada por promover danos na estrutura das brânquias de organismos aquáticos, particularmente em condições de baixa salinidade (Asih *et. al.*, 2013). Para a espécie *L. vannamei*, alterações morfo-estruturais nas brânquias, tais como necrose, perda da estrutura regular e infiltração de hemócitos no tecido, foram tempo e dose dependentes da exposição ao cobre, muita embora a espécie tenha sido considerada altamente tolerante (i.e. maiores valores de CL₅₀) em comparação com outras espécies de camarão mantidas em salinidade 25 ppm (Frías-Espéricueta *et. al.*, 2008).

No camarão branco *Exopalaemon carinicauda* a exposição por 24 h a concentrações crescentes de cobre em salinidade 10 ppm promoveu a redução significativa na taxa de consumo de oxigênio e na razão O:N, mas não na taxa de excreção de amônia, indicando um maior recaimento do metabolismo aeróbico sobre a oxidação de proteínas (Zhang *et. al.*, 2014). Interessante notar que esses distúrbios respiratórios e metabólicos observados nos exemplares de *E. carinicauda* foram dose dependentes, e fortemente associados a um aumento significativo no acúmulo de cobre no corpo dos animais (Zhang *et. al.*, 2014). A exposição a diferentes concentrações de cobre resultou na perda da capacidade hipo-osmoregulatória (salinidade 36 ppm) e hiper-osmoregulatória (salinidade 17 ppm) dos animais, resultando em pressão osmótica (osmolaridade) da hemolinfa significativamente menor em relação ao grupo controle, sendo esses efeitos marcadamente dependentes do tempo e dose de exposição (Bambang *et. al.*, 1995).

Henry e colaboradores (2012) demonstraram que a tomada de cobre pelas brânquias dos crustáceos marinhos e estuarinos envolve mecanismos associados à regulação de Na^+ e Cl^- dos animais, e que o acúmulo de cobre nas brânquias resulta em severos distúrbios ionoregulatórios associados a inibição da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase. Além disso, os autores evidenciaram que os mecanismos de excreção de amônia nesses animais é diretamente dependente da absorção de Na^+ , utilizando diferentes tipos de transportadores dependendo da salinidade do meio, tais como a Na^+/K^+ -ATPase, V^+ -ATPase, anidrase carbônica, co-transportador Na^+/H^+ e canais de NH_3 (Rhcg proteins) (Henry *et. al.*, 2012). Assim, o aumento da toxicidade do cobre na presença de níveis sub letais de amônia para a espécie *L. vannamei* estaria relacionado à ação sinérgica dos contaminantes sobre os sítios de transporte de Na^+ , tanto quanto a distúrbios respiratórios e metabólicos promovidos pela exposição aguda a amônia e ao cobre. Estudos futuros avaliando se a exposição concomitante ao cobre e amônia resultam em distúrbios osmo-ionoregulatórios e/ou respiratórios e metabólicos em *L. vannamei* são fundamentais para se elucidar os mecanismos de ação tóxica sinérgica dos xenobióticos para a espécie.

Similarmente, a exposição aguda ao cádmio tem sido demonstrada por promover distúrbios respiratórios e metabólicos, assim como na manutenção do equilíbrio iônico de crustáceos. Zhang e colaboradores (2014) determinaram a CL_{50} -24, 48, 72 e 96 h de cádmio para a espécie *Exopalaemon carinicauda*, em salinidade 10 ppm, em 0,66; 0,38; 0,34 e 0,26 mg/L, sendo observado após 24 h de exposição ao cádmio uma inibição de 21,1% no consumo de oxigênio, e um aumento na excreção de amônia de 47%. Já para exemplares de *L. vannamei* expostos por 24 h a 3 mg/L cádmio em salinidade 15 ppm foi reportada a inibição do consumo de oxigênio em 91,3%, associada a um aumento da excreção de amônia de 153,7% (Chen & Wu, 2004). Barbieri e Paes (2011) demonstraram que a toxicidade do cádmio (determinada como CL_{50}) aumentou significativamente em salinidade 5 ppm para a espécie de camarão *Farfantepenaeus paulensis*, em relação aos ensaios conduzidos em 20 e 36 ppm, e que a exposição a concentrações crescentes de cádmio na água (0,5, 1,0 e 2,0 mg/L) promoveram a inibição do consumo de oxigênio associada a estimulação da excreção de amônia pelos animais.

Segundo Henry e colaboradores (2012) a taxa de absorção de cádmio pelas brânquias dos crustáceos é altamente dependente da concentração livre de Cd^{2+} na solução, e isso ocorre por meio de mecanismos relacionados a homeostase do Ca^{2+} , onde os íons Cd^{2+} competiriam

pelos sítios ativos dos canais de Ca^{2+} nas brânquias dos animais. Assim, a falta de efeito aparente dos níveis sub letais de amônia testados sobre a toxicidade do cádmio para *L. vannamei* pode estar relacionada aos diferentes modos de ação tóxica da amônia e do cádmio nas brânquias dos animais, ou ainda a baixa disponibilidade de Cd^{2+} livre em função da salinidade testada, não resultando em maiores distúrbios respiratórios e metabólicos em função da presença de amônia na água.

Tendo em vista que a presença de amônia na água pode levar ao aumento da toxicidade de metais presentes do meio externo, tal como visto para o cobre em *L. vannamei*, ambientes degradados onde ocorre acúmulo de amônia no sedimento podem apresentar um maior risco aos organismos aquáticos. Isso se dá pelo fato de que atividades antrópicas, como processos de dragagem, podem levar a um aumento transiente na concentração de amônia na água (Simpson & Batley, 2009), junto com a resuspensão de metais adsorvidos ao sedimento, o que pode aumentar a sua toxicidade a fauna de invertebrados aquáticos nessas regiões.

6. Conclusões

Para os exemplares de *A. salina* aclimatados a 15 ppm a substância mais tóxica foi o cobre, seguido pelo cádmio e amônia. Já para *L. vannamei*, o cádmio foi a substância mais tóxica, seguido pelo cobre e amônia. Além disso, a toxicidade do cobre, cádmio e amônia (na ausência de níveis sub letais de amônia) para *A. salina* e *L. vannamei* foi aumentada após 48 h de exposição, em relação as primeiras 24 h, como visto pelos menores valores de CL_{50} -48 h. Os valores de CL_{50} 24 e 48 h de cádmio e cobre determinados para ambas as espécies de invertebrados em salinidade 15 ppm foram, em geral, fortemente reduzidos em comparação a estudos prévios utilizando as mesmas espécies e xenobióticos em salinidades mais elevadas. No entanto, esse efeito da salinidade, em comparação com outros estudos, não foi observado para a amônia para ambas as espécies em estudo.

Os resultados do presente estudo sugerem que a presença de níveis sub letais de amônia (25 e 50% da CL_{50} - 48 h) na água influenciou diferencialmente a toxicidade dos metais para as espécies testadas. Para *A. salina*, a redução na toxicidade aguda do cobre e cádmio na presença de níveis sub letais de amônia na água, particularmente nas primeiras 24 h de exposição, sugere um efeito antagonista entre a amônia e os metais para a espécie. Por outro lado, o forte aumento da toxicidade do cobre para os exemplares de *L. vannamei* na

presença de níveis sub letais de amônia, em ambos os períodos analisados, indicam um efeito tóxico sinérgico entre a amônia e o cobre para a espécie. A falta de efeito aparente da presença de amônia na água sobre a toxicidade do cádmio sugere que a amônia não influencia diretamente na toxicidade aguda do metal para *L. vannamei*.

7. Referências Bibliográficas

- Abessa, D. M. S. & Sousa, E. C. P. M. 2003. Sensitivity of the amphipod *Tiburonella viscana* (Platyischnopidae) to $K_2Cr_2O_7$. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46(1):53-56.
- Abdel-Lateif, H. M.; Donker, M. H. & Straalen, N. M. V. 1998. Interaction between temperature and cadmium toxicity in the isopod *Porcellio scaber*. *Functional Ecology*. 12:521-527.
- Alcaraz, G.; Chiappa-Carrara, X.; Espinoza, V. & Vanegas, C. 1999. Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to White Shrimp *Penaeus setiferus* Postlarvae. *Journal of the world Aquaculture Society*. 30(1):90-97.
- Asih, A. Y. P.; Irawan, B. & Soegianto, A. 2013. Effect of copper on survival, osmoregulation, and gill structures of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) at different development stages. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 46(2):75-88.
- Bambang, Y.; Thuet, P.; Charmantier-Daures, M.; Trilles J.P. & Charmantier, G. 1995. Effect of copper on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Decapoda). *Aquatic Toxicology*. 33(2):125-139.
- Barbieri, E. 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. *Aquaculture*. 306:329-333.
- Barbieri, E. & Paes, E. T. 2011. The use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the toxicity of cadmium on *Farfantepenaeus paulensis* with respect to salinity. *Chemosphere*. 84(1):9-16
- Bevilacqua, A. H. V.; Suffredini, I. B. & Bernardi, M. M. 2008. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), em *Artemia* sp.: comparação da preparação comercial e óleo puro. *Ver. Inst. Ciênc. Saúde*, 26(2):157-60.

- Bucking, C. 2016. A broader look at ammonia production, excretion and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. *Journal Comparative Physiology B*. 187(1):1-18.
- Burger, J. 2008. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Science total environment*. 389(1):37-45.
- Campos, B. G. 2016. **Avaliação do Risco Ecológico de metais em sedimentos da Baía de Guanabara (RJ), através de um método escalonado baseado em múltiplas linhas de evidências**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Experimental do Litoral Paulista. São Vicente.
- CETESB. Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo – 2005. São Paulo: Relatório Técnico Cetesb.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2007. Águas Interiores – Informações Básicas – Variáveis de Qualidade da água.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2017. Águas Costeiras – Publicações e Relatórios – Relatório de Qualidade das Águas Costeiras do Estado de São Paulo. Apêndice J – Resultado do monitoramento.
- Chen, J.-C.; Chen, K.-J. & Liao, J.-M. 1989. Joint action of ammonia and nitrite on *Artemia* nauplii. *Aquaculture*. 77(4):329-336.
- Chen, J.-C. & Lei, S.-C., 1990. Toxicities of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. *Journal World Aquaculture Society*. 21(4):300-306.
- Chen, H.-C. & Lin, C.-Y. 1992. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 156(1):139-148.
- Chen, J.-C. & Lin, C.-H. 2001. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 192(1):55-65.
- Chen, J.-C.; Ting, Y.-Y.; Lin, J.-N. & Lin, M.-N. 1990. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis*. *Marine Biology*. 107(3):427-431.
- Eddy, F. B. 2005. Ammonia in estuaries and effects on fish. *Journal of fish biology*. 67(6): 1495-1513.
- Eisler, R. & Hennekey, R. J. 1977. Acute Toxicities of Cd^{2+} , Cr^{+6} , Hg^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} to Estuarine Macrofauna. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 6(1):315-323.

- Eisler, R., 1998. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Biological Science Report*. 98p.
- Emerson, K.; Russo, R.C.; Lund, R.E. & Thurston, R.V. 1975. Aqueous Ammonia Equilibrium calculations: Effects of pH and Temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 32:2379-2383.
- Felix, E. P. & Cardoso, A. A. 2004. Amônia (NH₃) Atmosférica: fontes, transformação, sorvedouro e método de análise. *Química Nova*, 27(1): 123-130.
- FONTES, R. F. C.; OLIVEIRA, A. J. F. C. & PINHEIRO, M. A. A. 2008. **Visão Didática sobre o Meio Ambiente na Baixada Santista**. São Vicente: Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental do Litoral Paulista, 1:173.
- Frank, P.M. & Robertson, P.B. 1979. The influence of salinity on toxicity of cadmium and chromium to the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 21(1):74-78.
- Frías-Espericueta, M.G.; Castro-Longoria, R.; Barrón-Gallardo, G.J.; Osuna-López, J.I.; Abad-Rosales, S.M.; Páez-Osuna, F. & Voltolina, D. 2008. Histological changes and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with different copper concentrations. *Aquaculture*. 278:97-100.
- Frías-Espericueta. M. G.; Voltolina, D. & Osuna-Lopez, J. I. 2001. Acute Toxicity of Cadmium, Mercury, and Lead to Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Postlarvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 67(1):580-586.
- Frías-Espericueta, M. G.; Voltolina, D. & Osuna-Lopez, J. I. 2003 Acute Toxicity of Copper, Zinc, Iron, and Manganese and of the Mixtures Copper–Zinc and Iron–Manganese to Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 71(1):68-74.
- Gajbhiye, S.N. & Hirota, R. 1990. Toxicity of heavy metals to brine shrimp *Artemia*. *Journal of the Indian Fisheries Association*. 20910:43-50
- Grosell, M.; Nielsen, C. & Bianchini, A. 2002. Sodium turnover rates determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133(1):287-303.
- Grosell, M. & Wood, C. M. 2002. Copper uptake across rainbow trout gills. *Journal Experimental Biology*. 205:1179-1188.

- Grossel, M.; Blanchard, J.; Brix, K. V. & Gerdes, R. 2007. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicology*. 84(2):162-172.
- Hamilton, M. A.; Russo, R. C. & Thurston, R. V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*. 11(7):714-719.
- Henry, R. P.; Lucu, C.; Onken, H. & Weihrauch, D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*. 3(431):1-33.
- Hortellani, M. A.; Sarkis, J. E. S.; Abessa, D. M. S & Sousa, E. C. P. M. 2008. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos - São Vicente. *Química Nova*. 31(1):10-19.
- Jarup, L. & Akesson, A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 238(3):201-208
- Koutsaftis, A. & Aoyama, I. 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Science of the Total Environment*. 387(1):166-174.
- Lamparelli, M. L.; Costa, M. P.; Prósperi, V. A.; Bevilacqua, J. E.; Araújo, R. P. A.; Eysink, G. G. & Pompéia, S. 2001. Sistema estuarino de Santos e São Vicente. **Relatório Técnico CETESB**. 178 p.
- Leonard, E. M.; Barcarolli, I.; Silva, K. R.; Wasielesky, W.; Wood, C. M. & Bianchini, A. 2011. The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and *Excirolana armata*. 154(4):409-419.
- Manfra, L.; Canepa, S.; Piazza, V. & Faimali, M. 2016. Lethal and sub lethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and an ecotoxicological concern organic compound. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 123:60-64.
- Mariño-Balsa, J. C; Poza, E.; Vazquez, E. & Beiras, R. 2000. Comparative Toxicity of Dissolved Metals to Early Larval Stages of *Palaemon serratus*, *Maja squinado*, and *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 39(3):345–351.
- Miranda, L. B.; Castro, B. M. & Kjerfve, B. 2002. Princípios de Oceanografia Física de Estuários. Editora da Universidade de São Paulo - EDUSP. São Paulo, SP. 414p.

- Neto, J. D. 2011. Proposta de Plano Nacional de Gestão para o uso sustentável de Camarões marinhos do Brasil. Ibama. 2011. 41.
- Niyogi, S.; & Wood C. M. 2004. Biotic Ligand Model, a Flexible Tool for Developing Site-Specific Water Quality Guidelines for Metals. *Environmental Science & Technology*. 38(23):6177-6192.
- O'Hara, J. 1973. The influence of temperature and salinity on the toxicity of cadmium to the fiddler crab *Uca pugilator*. *Fishery Bulletin*. 71:49-153.
- Parreira, C. N. 2012. **Avaliação da hidrodinâmica e da poluição no Canal de Piaçaguera, no Estuário de Santos-São Vicente (SP), a partir de informações ambientais e modelagem numérica.** Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental da Universidade de São Paulo.
- Perina, F. C., 2006. **Comparação entre os efeitos da toxicidade de sedimentos sobre invertebrados bentônicos e vegetação das áreas internas do sistema estuarino de Santos e São Vicente.** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Experimental do Litoral Paulista. São Vicente.
- Perschbacher, P. W. 2005. Temperature effects on acute copper toxicity to juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*. 243(1):225-228.
- Piedras, S. R. N.; Pouey, J. L. O. F.; Moraes, P. R. R. & Cardoso, D. F. 2006. Lethal concentration (CL₅₀) of un-ionized ammonia for pejerrey larvae in acute exposure. *Scientia Agricola*. 63(2):184-186.
- Prato, E.; Boandolino, F. & Scardicchio, C. 2006. Test for Acute Toxicity of Copper, Cadmium, and Mercury in Five Marine Species. *Turk J Zool*. 30:285-290.
- Randall, D. J. & Tsui, T. K. N. 2002. Ammonia Toxicity in Fish. *Marine Pollution Bulletin*. 45:17-23.
- Rebelo, M. F.; Santos, E. A. & Monserrat, J. M. 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapada) Danna, 1851: accumulation in hemolymph and effects on osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 122:429-435.
- Resgalla Jr, C. & Laitano, K. S. 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc Facimar*, 6:153-163.
- Santos, D.B. 2007. **Análise do comportamento e crescimento do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em diferentes substratos inconsolidados.** Departamento de Oceanografia e Limnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal. 118.

- Sarabia, R.; Ramo J, D.; Varo I.; Diaz-Mayan J. & Torreblanca, A. 2002. Comparing the acute response to cadmium toxicity on nauplii from different populations of *Artemia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(2):437-444.
- Schwartz, M. L. & Vigneault, B. 2007. Development and validation of a chronic copper biotic ligand model for *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology*. 84:247-254.
- Simpson, S. L. & Batley, G. E. 2009. Development of guidelines for ammonia in estuarine and marine water systems. *Marine Pollution Bulletin*. 58:1472-1476.
- Souza-Bastos, L. R.; Val, L. A. & Wood, C. M. 2017. Are Amazonian fish more sensitive to ammonia? Toxicity of ammonia to eleven native species. *Hydrobiologia* 1:143-155.
- Taylor, D. 1983. The significance of the accumulation of cadmium by Aquatic organisms. *Ecotoxicology and environment safety*. 7:33-43.
- Valencia-Castaneda G.; Frías-Espéricueta, M.G.; Vanegas-Perez R.C.; Chávez-Sánchez, M. C. & Páez-Osuna, F. 2019. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.05.002>
- Veiga, L. F. & Vital, N. 2002. Testes de Toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp*. In: Nascimento, I. A., Sousa, E. C. P. M. e Nipper, M. (ed.). Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. 262p.
- Verdouw, H.; Van Echteld, C. J. A. & Dekkers, E. M. J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*. 12(6):399-402.
- Verslycke, T.; Vangheluwe, M.; Heijerick, D.; Schamphelaere, K.; Sprang, P. V. & Janssen, C. R. 2003. The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. *Aquatic Toxicology* 64:307-315.
- Wang, Y., Liv, L.; Yu, Y.; Yang, G.; Xu, Z. & Wang, Q. C. 2017. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*). *Chemosphere*. 170:61-67.
- Wong, C. K.; Chu, K. H.; Tang, K. W.; Tam, T. W. & Wong, L. J. 1993. Effects of Chromium, Copper and Nickel on Survival and Feeding Behaviour of *Metapenaeus ensis* Larvae and Postlarvae (Decapoda: Penaeidae). *Marine Environmental Research* 36:63-78.

- Wu, J.-P. & Chen, H.-C. 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*. 57(11):1591–1598.
- Zhang, C.; Li, F.; & Xiang, J. 2014. Acute effects of cadmium and copper on survival, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in juvenile *Exopalaemon carinicauda*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104:209–214.

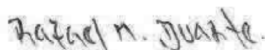
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFLUÊNCIA DE NÍVEIS SUB-LETAIS DE AMÔNIA NA TOXICIDADE DE METAIS EM DUAS ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS

AUTORA: FABIÓLA CARREIRA CALEFI

ORIENTADOR: RAFAEL MENDONÇA DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA
Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Campus Baixada Santista - Santos/SP



Profa. Dra. ADRIANA REGINA CHIPPARI-GOMES
Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas / Universidade Vila Velha

São Vicente, 10 de junho de 2019