

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a)
autora, o texto completo desta
Dissertação de Mestrado
será disponibilizado somente
a partir de **10/06/2021**.

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).

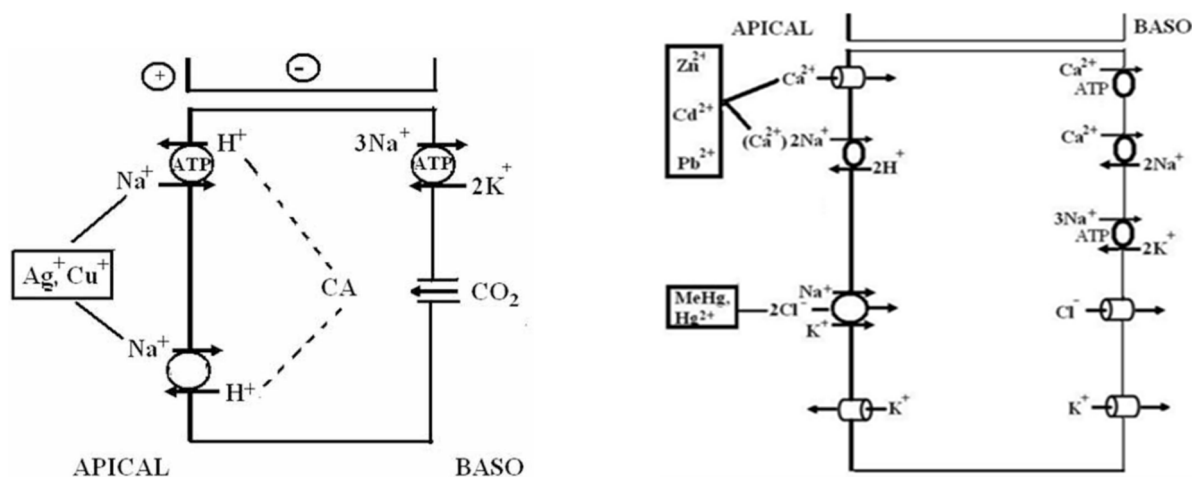


Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de competição entre metais pelos sítios de ligação de cátions (Na^+ e Ca^{2+}) nas brânquias de crustáceos (retirado de Henry *et. al.*, 2002).

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

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
- Koutsafitis, 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.

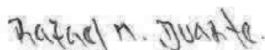
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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