

## INFLUÊNCIA DO CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO NA SENSIBILIDADE AO COBRE EM DUAS ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS

Gisele Cortez Custódio VILARINHO<sup>1</sup>; Lorenzo Soriano Antonaccio BARROCO<sup>1</sup>; Rafael Mendonça DUARTE<sup>4</sup>; Adalberto Luis VAL<sup>3</sup>; Fabíola Xochilt Valdez DOMINGOS<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora LEEM/CPEC/INPA; <sup>3</sup>Co-orientador LEEM/CPEC/INPA

<sup>4</sup>Colaborador LEEM/CPEC INPA .

### 1. Introdução

O desenvolvimento urbano aliado ao crescimento da atividade industrial tem causado diversas modificações ambientais, principalmente pela liberação de lixo tóxico no ambiente, o que ocasiona a contaminação dos sistemas aquáticos com metais (Fonseca, 2004). O cobre é um elemento-traço que atua em diversos processos fisiológicos como fotossíntese, cadeia respiratória e fixação de nitrogênio (Esteves, 1998). Apesar de ser necessário à homeostase dos organismos, esse composto em níveis elevados torna-se prejudicial, sendo reconhecido como um dos metais mais tóxicos aos organismos aquáticos incluindo peixes (Duarte *et al.*, 2009) e invertebrados (Arauco *et al.*, 2005). Portanto, quando presente no ambiente em concentrações elevadas pode causar efeitos tóxicos e acumular-se em diversos órgãos, podendo levar à morte desses organismos (Laurén e McDonald, 1987, Heath, 1995). Quando em meio aquático, o cobre pode se apresentar sob diferentes formas químicas, entre elas:  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$ ,  $\text{CuOH}^+$  e  $\text{Cu}^{+2}$ , sendo o  $\text{Cu}^{+2}$  reconhecido como a espécie mais tóxica. A toxicidade do cobre é altamente influenciada pelas características físico-químicas da água, tais como: dureza, alcalinidade, pH, temperatura, oxigênio e carbono orgânico dissolvidos (Di Toro *et al.*, 2001). Os rios de águas pretas, como o Rio Negro, têm baixa carga de sedimentos, são transparentes, pobres em sais dissolvidos, têm alto nível de acidez, além de apresentarem grande quantidade de ácidos húmicos e fúlvicos na sua composição (Junk, 1983). Estes ácidos são provenientes da decomposição da matéria orgânica, oriunda das florestas inundáveis, que se encontra, principalmente, sobre a forma de carbono orgânico dissolvido (COD). Sua qualidade e quantidade varia em função do regime de chuva ou pulso hidrológico, sendo este responsável pela entrada massiva de COD para os sistemas aquáticos (Suhett *et al.*, 2006), sendo que as maiores concentrações de COD ocorrem à medida que o nível da água se eleva, invadindo a floresta que se encontra ao longo da área de abrangência desses sistemas (Farjalla *et al.*, 2006). O COD desempenha importante papel na regulação da quantidade e qualidade da radiação que atinge a coluna d'água, além de atuar na formação de complexos com metais de transição que, uma vez complexados são arrastados para o sedimento, permitindo a utilização dessas águas para abastecimento (Esteves, 1998). A capacidade de complexação é representada pela quantidade máxima de íons metálicos que pode se associar às substâncias húmicas em soluções aquosas (Rocha e Rosa, 2003). A fim de compreender melhor essa capacidade, foram desenvolvidas técnicas de fracionamento das substâncias húmicas aquáticas, nas quais foram utilizadas amostras de água do Rio Negro e foram identificadas 6 frações com diferentes tamanhos moleculares: F>100; F 100-50; F 50-30; F30-10; F10-5 e F<5 kDa (Rocha e Rosa, 2003). Por meio do fracionamento, torna-se mais fácil verificar a interferência do COD presente na água do Rio Negro na capacidade de complexação com íons metálicos, e com isso sua influência na toxicidade dos metais. Estudos toxicológicos demonstraram que o cobre exerce efeito tóxico sobre rotíferos e cladóceros (Pascoe *et al.*, 2000). Os cladóceros representam um dos grupos de organismos mais utilizados em bioensaios de toxicidade, devido a sua sensibilidade a agentes tóxicos (IBAMA, 1987). Este grupo de microcrustáceos constitui, juntamente com outros organismos do plâncton, a base da cadeia alimentar aquática. A espécie *Moina minuta* tem sua ocorrência registrada em vários estados brasileiros como Amazonas, Acre, Pará, Pernambuco, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Outra espécie, comum do zooplâncton, *Diaphanosoma spinulosum* é encontrada em quase todo o Brasil, principalmente nos estados do norte e nordeste, como Amazonas e Piauí, porém tem também sua presença registrada no estado do Mato Grosso e até mesmo Rio Grande do Sul (Elmor, 1997). Além disso, de uma maneira geral, espécies dos gêneros *Moina* e *Diaphanosoma*

são encontradas com frequência nas regiões tropicais, no entanto apesar da ampla distribuição dessas espécies, são poucos os estudos com espécies destes gêneros à sensibilidade a metais. O projeto "Copper in the Amazon – Biological Sensitivity" tem como um de seus principais objetivos avaliar o papel do carbono orgânico dissolvido na toxicidade do cobre em várias espécies de peixes amazônicos e microinvertebrados. O presente trabalho constituiu parte das atividades desse projeto e visou estudar a toxicidade do cobre em associação ao carbono orgânico dissolvido (COD) e suas frações obtidos a partir da água do Rio Negro nos invertebrados aquáticos *Moina minuta* e *Diaphanosoma spinulosum*.

## 2. Material e métodos

A coleta dos exemplares utilizados para os experimentos foi realizada de duas formas, uma parte dos exemplares de *Moina minuta* foi coletada na estação de piscicultura familiar, Vivenda Sampaio localizada aproximadamente no Km 20 da estrada do Puraquequara. Foram realizadas também coletas nos tanques de piscicultura do CPAQ (INPA-V8) onde foram obtidos espécimes de *Diaphanosoma spinulosum* e de *Moina minuta*. As coletas foram realizadas com o auxílio de rede de plâncton, os organismos foram armazenados em recipientes plásticos e transportados até o laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular – LEEM/INPA, onde os organismos de cada espécie foram imediatamente separados, isolados dos demais e, mantidos da seguinte forma: os espécimes de *Moina minuta* coletados no Puraquequara foram mantidos em água de diluição para cultivo, seguindo o protocolo da EPA (2002a) e alimentados diariamente com 1 mL de algas *Strychnus capricornutum* e 2 mL de YCT – "yeast, cerophyll e trout chow". Os exemplares coletados no INPA-V8, foram aclimatados em água coletada nos tanques de piscicultura e a alimentação foi mantida com as algas presentes na própria água do ambiente de coleta e adição de 2 mL de YCT diariamente. A partir dos cultivos mantidos no laboratório foram realizados experimentos com neonatos de até 24 horas da espécie *Moina minuta*. Os demais experimentos foram realizados com animais adultos coletados em campo, sendo que os experimentos iniciavam após um tempo mínimo de 24 de aclimação nas condições de laboratório. Para determinar a influência do COD na sensibilidade ao cobre foram realizados experimentos de CL<sub>50</sub>-48 horas, que representa a concentração de uma substância tóxica que promove a parada total da locomoção e ausência de respostas a estímulos em 50% dos animais expostos durante ensaios de 48 horas (Sprague, 1990). Os neonatos de *Moina minuta* foram submetidos a três condições experimentais diferentes. Um grupo de animais foi exposto ao cobre em água do Rio Negro, outros dois grupos de organismos foram expostos ao cobre na presença de frações de substâncias húmicas as quais foram diluídas em água do poço. Sendo realizado um experimento para avaliar a fração F<sub>1</sub>>100 e outro para avaliar a fração F<sub>2</sub> 50-100 kDa. Experimentos adicionais em água do Rio Negro foram realizados com as espécies *Diaphanosoma spinulosum* e *Moina minuta*. O experimento de CL<sub>50</sub> consistiu na exposição de 10 animais a 10 concentrações de cobre, em triplicata, em copos de Becker (50 ml) contendo 30 ml de água do Rio Negro, ou água do poço mais adição das frações. A adição de cobre em cada câmara experimental foi realizada 24 horas antes do início dos experimentos para estabilizar as interações químicas entre o cobre e o carbono orgânico dissolvido. A troca de água e contagem de animais imóveis foi realizada em intervalos de 24 horas, assim como a coleta de amostras de água dos experimentos para a determinação da concentração real de cobre e monitoramento do pH, dureza, alcalinidade e sais dissolvidos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>) em cada câmara experimental. Os valores de CL<sub>50</sub> para cada tempo de exposição foram calculados utilizando-se o programa computacional "LC<sub>50</sub> Programs JS Pear Test" baseado no método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton, 1977) por meio da relação imobilidade/mortalidade e concentração real de cobre dissolvido na água. Além disso, amostras de água dos experimentos foram coletadas e encaminhadas para a quantificação de carbono orgânico dissolvido (DOC) no Laboratório de Química Ambiental - INPA. Ao final dos experimentos, a água contaminada foi transferida para tanques com adição de hidróxido de cálcio para precipitação e decantação do cobre, para possibilitar o descarte do sobrenadante. O material precipitado foi armazenado para posterior eliminação em depósito para resíduos de sólidos tóxicos.

## 3. Resultados e discussão

Os experimentos demonstraram que a sensibilidade de *Moina minuta* e *Diaphanosoma spinulosum* ao cobre aumenta ao longo do tempo (Tabela 1). O decréscimo na CL<sub>50</sub> ao longo do tempo é característico em experimentos de sensibilidade e tem sido observado tanto em invertebrados quanto em peixes (Villegas-Navarro *et al.* 1997, Duarte *et al.*, 2009, Zou e Bu, 1994).

Os resultados obtidos nos experimentos com as frações de carbono orgânico dissolvido demonstram que apesar da concentração de carbono orgânico dissolvido ser semelhante nos dois experimentos, a fração de maior tamanho molecular ( $F > 100$ ) apresenta maior capacidade complexante em relação ao cobre, pois o valor de  $CL_{50}$  obtido para essa condição experimental foi maior em relação ao encontrado na exposição feita com a fração menor ( $F 100-50$ ).

Tabela 1. Valores de  $CL_{50}$  para espécie *Moina minuta* e *Diaphanosoma spinulosum* em água do Rio Negro e em água de poço com diferentes frações de substâncias húmicas.

Espécie	Origem	Tratamento	$CL_{50}$ 24h ( $\mu\text{g Cu/L}$ )	$CL_{50}$ 48h ( $\mu\text{g Cu/L}$ )	COD mg C/L
<i>Moina minuta</i>	Cultivo	Rio Negro	21,21	19,69	6,9
<i>Moina minuta</i>	Cultivo	Fração F >100	174,71	105,68	11,82
<i>Moina minuta</i>	Cultivo	Fração F 50-100	101,26	43,59	10,01
<i>Moina minuta</i>	Piscicultura	Rio Negro	36,68	27,49	7,45
<i>Diaphanosoma spinulosum</i>	Piscicultura	Rio Negro	21,61	18,04	9,25

Em relação aos experimentos realizados em água do Rio Negro foram encontradas diferenças entre os valores de  $CL_{50}$  entre os exemplares de *Moina minuta* cultivados em laboratório em relação aos coletados e utilizados diretamente nos experimentos. Essa diferença na sensibilidade é decorrente das fases de desenvolvimento dos animais utilizados nos experimentos, uma vez que os animais coletados na natureza eram em sua maioria adultos, enquanto que os experimentos realizados com animais de cultivo foram conduzidos com animais neonatos (idade <24h). Sabe-se que fatores como estado nutricional e qualidade da água influenciam a sensibilidade dos animais expostos a contaminantes (Zou e Bu, 1994; Aragão e Araújo, 2006) e que, de forma geral, animais jovens são mais sensíveis à substâncias tóxicas do que os adultos (EPA, 2002b). Além disso, os resultados obtidos para os exemplares de *Moina minuta* indicam que quanto maior a concentração de matéria orgânica menor a toxicidade do cobre sobre os organismos expostos. Porém, os valores de  $CL_{50}$  obtidos nos experimentos realizados em água do Rio Negro para *M. minuta* e *D. spinulosum*, demonstram que a espécie *D. spinulosum* é mais sensível ao cobre, uma vez que sua  $CL_{50}$  é menor mesmo na presença de uma maior concentração de carbono orgânico dissolvido do que a encontrada nos experimentos com *Moina minuta*.

#### 4. Conclusão

O tamanho molecular das substâncias húmicas exerce influência sobre a disponibilidade do cobre, diminuindo as possibilidades de interação desse metal com os animais expostos, sendo necessário maiores concentrações de cobre para causar imobilidade/mortalidade em 50% dos animais expostos durante 48 horas. A diferença no estágio de desenvolvimento dos organismos é um fator importante a ser considerado para avaliação da sensibilidade ao cobre, uma vez que organismos mais jovens mostraram-se mais sensíveis que os adultos expostos às mesmas condições experimentais. Além disso, a espécie *Diaphanosoma spinulosum* é a espécie mais sensível dentre as espécies investigadas, e pode ser considerada como um excelente organismo bioindicador em testes de toxicidade ao cobre.

**Agradecimentos:** Os organismos utilizados neste estudo foram identificados pelo pesquisador André Guidini, MSc do laboratório de Plâncton o qual é coordenado pelo Dr. Edinaldo Nelson dos Santos-Silva. Este estudo teve o apoio financeiro e suporte das seguintes instituições: ICA, FAPEAM, CNPQ, INPA.

## 5. Referências

- Aragão, M.A., Araújo, R.P. A. In: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia Aquática-princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p. 117-152.
- Arauco, L. R. R., Cruz, C., J. G. M. Neto. 2005. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. *Pesticidas: R. Ecotox. Meio Amb.*, 15: 55-64.
- Di Toro, D.; Allen, H.E.; Bergman, H.L.; Meyer, J.S.; Santore, R.C. 2001. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals: technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 220: 2383-2396.
- Duarte, R. M., Menezes, A.C.L., Rodrigues, L.S., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L. 2009. Copper sensitivity of wild ornamental fish of the Amazon. *Ecotox. Environ. Saf.*, 72: 693-698.
- Elmor, L. M. 1997. *Manual de identificação de Cladóceros Límnicos do Brasil*. Brasília: Editora Universa (UnB), 159 pp.
- EPA – Environmental Protection Agency. 2002a. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth Edition.
- EPA – Environmental Protection Agency. 2002b. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Fourth Edition.
- Esteves, F. A. 1998. Fundamentos de limnologia. 2ed. Interciência, Finep, Rio de Janeiro. 602pp.
- Farjalla, V. F., Azevedo, D. A., Esteves, F.A., Bozelli, R.L., Roland, F., Enrich-Prast, A. 2006. Influence of hydrological pulse on bacterial growth and DOC uptake in a clear-water amazonian lake. *Microbial Ecology*. 52, 334-344.
- Fonseca, E.M. 2004. Estudo da interação entre atividade bacteriana, metais pesados e matéria orgânica nos sedimentos da Bacia de Guanabara – RJ. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense. Niterói. Rio de Janeiro. 115pp.
- Hamilton, M.A.; Russo R.C.; Thurston R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11:714-719.
- Heath, A.G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. 2º ed., Boca Raton, Florida, 259pp.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1987. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, Parte D. 3.
- Junk, W. J. 1983. As águas da região amazônica. In: Salati, E.; Junk, W.J.; Shubart, H.O.R.; Oliveira, A.E. *Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia*. São Paulo. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, p. 327.
- Laurén, D.J.; McDonald, D.G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: physiology. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44, 99-104.
- Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A. E., Jüttner, I., Flidner, A., Blockwell, S. J., Maund, S. J., Taylor, E. J., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R. R., Crossland, N. O., Mitchell, G. C., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J. -P., Peither, A., Neumeier B., Velletti, A.-R. 2000. The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Research*, 34: 2323-2329.
- Rocha, J.C.; Rosa, A. H. 2003 Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas, São Paulo: Editora UNESP.

Sprague, J.B. 1990. Aquatic Toxicology. *In*: Schrech, C.B.; Moyle, P.B. (Eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA. p. 491-528.

Suhett, A.L., Amado, A.M., Bozelli, R.L., Esteves, F.A., Farjalla, V.F. 2006. O papel da fotodegradação do carbono orgânico dissolvido (COD) nos ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, 10: 186-204.

Villegas-Navarro, A., Rodriguez Santiago, M., Ruiz Perez, F., Rodriguez Torres, R., Dieck Abularach, T. and Reyes, J.L. 1997. Determination of LC<sub>50</sub> from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. *Environ. Int.*, 23: 535-540.

Zou, E., Bu, S. 1994. Acute toxicity of copper, cadmium, and zinc to the water flea, *Moina irrasa* (Cladocera). *Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 742-748.