

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA (UNISANTA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS (PPG-ECOMAR)

DANIELA OLIVEIRA TEIXEIRA DE SOUSA

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA TOXICIDADE DO COBRE
PARA O CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO (*Litopenaeus*
***vannamei*)**

SANTOS

2023

DANIELA OLIVEIRA TEIXEIRA DE SOUSA

**INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA TOXICIDADE DO COBRE
PARA O CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO (*Litopenaeus
vannamei*)**

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ecologia, sob a orientação da Profa. Dra. Helen Sadauskas Henrique.

SANTOS

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus professores do mestrado

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa concedida durante o projeto, auxílio CAPES-Código de Financiamento 001.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Helen Sadauskas Henrique pela orientação e pelas correções e dicas para uma melhor elaboração dos meus trabalhos acadêmicos.

Agradeço ao prof. Dr. Rodrigo Schweitzer (UNIFESP Baixada Santista) pelo auxílio logístico (por meio do projeto “Uso de substratos artificiais na redução do estresse em camarões cultivados intensivamente” financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e orientações para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço ao mestre Fabrini C.T. Menezes, doutorando da UNIFESP Baixada Santista, pelo auxílio nos experimentos e nas análises físicas e químicas da água.

Agradeço às Biólogas Marinhas Lanai Morita Akemi e Isabella Freitas Perez pela realização dos experimentos e análises fisiológicas.

Agradeço à Dra. Luciana Rodrigues de Souza-Bastos (Institutos LACTEC, Curitiba-PR) pela análise do cobre na água dos experimentos.

Agradeço ao Dr. Rafael Garrett Dolatto (UFPR, Curitiba-PR) pelas análises do cobre nas brânquias dos camarões.

Agradeço à todos os professores do mestrado em sustentabilidade em ecossistemas marinhos e costeiros.

Agradeço à coordenadora do curso, Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza, pela atenção e por sempre sanar as minhas dúvidas.

Agradeço às funcionárias da secretaria, Imaculada e Sandra, pelo auxílio com as minhas dúvidas e questionamentos.

Agradeço a Unisanta pelo oferecimento do mestrado em Ecologia.

EPÍGRAFE

*“Seja tudo aquilo que você
sonha e que pode ser.”
Futura, 2009*

RESUMO

A espécie *Litopenaeus vannamei* é cultivada em regime intensivo na carcinicultura e, apesar desse sistema exigir poucas trocas de água, o que reduz a geração de efluentes, existem preocupações crescentes em relação ao acúmulo à toxicidade de metais presentes na ração, como o cobre. O cobre é essencial para o metabolismo, porém em grandes quantidades se torna tóxico. Uma vez que *L. vannamei* pode ser cultivado em diferentes salinidades, o presente estudo buscou avaliar como diferentes salinidades podem influenciar nos efeitos tóxicos do cobre sobre o equilíbrio osmótico e iônico de pós-larvas (PLs) de *L. vannamei*. As PLs foram aclimatadas em 3 diferentes salinidades (5, 15 e 30 ppt) por 24h. Para tanto, as PLs foram distribuídas aleatoriamente em câmaras experimentais (N=10), nos controles (um controle por salinidade) e nos tratamentos (concentração de cobre em 100% do valor da CL₅₀-24h calculado para cada salinidade). Após o período de 24h, as brânquias foram separadas para análise da bioconcentração do cobre (brânquias) e da concentração diferencial dos íons corpóreos (corpo e carapaça). Para a avaliação da taxa líquida de excreção de amônia (J_{net}^{amm}) e teor hídrico, as PLs foram expostas individualmente (n=36) aos mesmos tratamentos anteriores. Amostras de água foram retiradas a cada 3h para o cálculo do J_{net}^{amm} e, ao final de 24h, os camarões foram utilizados para medida do teor hídrico. A toxicidade do cobre para as PLs foi fortemente influenciada pela salinidade, sendo observado aumento nos valores da CL₅₀-24h em menores salinidades. Nos animais aclimatados em 30 ppt, a CL₅₀-24 h foi de 106,82 mg/l (limite inferior de 84,87 e superior de 134,45 mg/l). Já nos animais aclimatados em 15 e 5 ppt, a CL₅₀-24h foi de 49,21 mg/l (limite inferior de 35,53 e superior de 68,17 mg/l) e 0,30 mg/l (limite inferior de 0,23 e superior de 0,40 mg/l), respectivamente. Esses valores representam uma redução de cerca de 22 e 100% dos valores de CL₅₀-24h dos animais em 15 e 5 ppt, em comparação aos animais em 30 ppt. Embora não tenham sido evidenciados efeitos do cobre no teor hídrico dos animais, foram observadas alterações nos íons Na⁺ e K⁺ nas brânquias e no corpo, assim como um aumento significativo da excreção de amônia nos camarões expostos ao cobre nas salinidades de 5 e 30 ppt, sugerindo um mecanismo para contrabalancear perdas difusivas dos íons causadas pela presença do cobre. A bioacumulação do cobre foi maior nos camarões expostos ao na salinidade de 30 ppt, provavelmente devido à

maior permeabilidade das brânquias dos organismos marinhos. O cobre foi tóxico para as PLs de *L. vannamei* aclimatadas e expostas em salinidade reduzida, particularmente em 5 ppt. Assim, a toxicidade do cobre via ração em sistemas de cultivo com baixa ou nenhuma renovação de água, em salinidades reduzidas, pode resultar em aumento da mortalidade de *L. Vannamei*. No entanto, essa mortalidade não está diretamente relacionada com a bioacumulação do cobre nas brânquias.

Palavras-Chave: CL_{50%} – 24h; osmoregulação; ionoregulação; especiação do cobre.

ABSTRACT

The species *Litopenaeus vannamei* is intensively cultivated in shrimp farming and, although this cultivation system requires reduced water changes, which reduces the generation of effluents, there are growing concerns about the accumulation and toxicity of metals present in the feed, such as copper. Copper is essential for metabolism, but in large quantities it becomes toxic. *L. vannamei* can be cultivated in different salinities, the present study sought to evaluate how different salinities can influence the toxic effects of copper on the osmotic and ionic balance of *L. vannamei* post-larvae (PL). PLs were acclimated to 3 different salinities (5, 15 and 30 ppt) for 24 hours. To this end, post-larvae were randomly distributed in experimental chambers (N=10) in controls (one for each salinity) and treatments (copper concentration at 50% of the LC_{50%} - 24h value calculated for each salinity). After a period of 24h, the gills were separated for analysis of copper bioconcentration (gills) and differential concentration of body ions (body and carcass). To evaluate the net ammonia excretion rate ($J_{\text{net}}^{\text{amm}}$) and water content, the PLs were individually exposed (n=36) to the same previous treatments. Water samples were collected every 3 hours to calculate $J_{\text{net}}^{\text{amm}}$ and, at the end of 24 hours, the shrimp were used to measure water content. The toxicity of copper to PLs was strongly influenced by salinity, with an increase in LC_{50%} - 24h values being observed at lower salinities. In animals acclimated to 30 ppt, the LC_{50%} - 24h was 106.82 mg/l (lower limit of 84.87 and upper limit of 134.45 mg/l). In animals acclimated to 15 and 5 ppt, the LC_{50%} - 24h was 49.21 mg/l (lower limit of 35.53 and upper limit of 68.17 mg/l) and 0.30 mg/l (lower limit of 0.23 and greater than 0.40 mg/l), respectively. These values represent a reduction of approximately 22 and 100% in the LC_{50%} - 24h values of animals at 15 and 5 ppt, compared to animals at 30 ppt. Although there were no evident effects of copper on the water content of the animals, changes in Na⁺ and K⁺ ions were observed in the gills and body, as well as a significant increase in ammonia excretion in shrimp exposed to copper at salinities of 5 and 30 ppt, suggesting a mechanism to counterbalance the diffusive losses of ions caused by the presence of copper. Copper bioaccumulation was greater in shrimp exposed to copper at salinity of 30 ppt, probably due to the greater permeability of the gills of marine organisms. Copper was toxic to *L. vannamei* PLs acclimated and exposed to reduced salinity, particularly at 5 ppt. Thus, the toxicity of copper via feed in cultivation systems with low or no water renewal, at reduced salinities, may result in increased mortality of *L. vannamei*, however this mortality is not directly related to the bioaccumulation of copper in the gills. .

Keywords: LC_{50%} - 24h; osmoregulation; ionoregulation; copper specification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Concentração de cobre (mg/kg) nas brânquias de pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL₅₀-24h do cobre nas diferentes salinidades, além dos respectivos controles. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (P<0,05) na concentração do cobre entre os animais (controle ou cobre) nas diferentes salinidades. Asterisco (*) representa diferenças estatísticas significativas (P<0,05) entre os animais do controle e do cobre, na mesma salinidade.....22

Figura 2. Taxa de excreção de amônia (μM/g/h) de pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL₅₀-24h do cobre nas salinidades de 5 ppt (A), 15 ppt (B) e 30 ppt (C), além dos respectivos controles. Asterisco (*) representam diferenças estatísticas significativas (P<0,05) nas taxas de excreção de amônia entre os animais expostos ao cobre e o grupo controle, em cada intervalo de exposição.....25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Concentração de Amônia, Nitrito, Fosfato, Sódio, Cloreto, Potássio e Alcalinidade na água do experimento realizado para o cálculo da CL_{50%}-24h.....20
- Tabela 2. Valores nominais do cobre utilizados para calcular a CL_{50%}-24h e seus respectivos valores reais.....21
- Tabela 3. Valores da CL_{50%}-24h, assim como seus limites superior e inferior, do cobre para o *L. vannamei* nas salinidades de 5; 15 e 30 ppt.22
- Tabela 4. Resultados da análise de variância de dois fatores (Two-way ANOVA) para os parâmetros analisados nas pós-larvas de *L. vannamei* expostas ao cobre nas 3 diferentes salinidades.....23
- Tabela 5. Teor hídrico (%) corpóreo das pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL_{50%}-24h do cobre nas salinidades de 5 ppt, 15 ppt e 30 ppt, além dos seus respectivos controles.23
- Tabela 6. Concentração dos íons Na⁺ e K⁺ (mg/g) no corpo, brânquia e carapaça das pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL_{50%}-24h do cobre nas salinidades de 5 ppt, 15 ppt e 30 ppt, além dos seus respectivos controles. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (P<0,05) nas concentrações dos íons para cada um dos compartimentos (corpo, brânquia e carapaça) entre os animais do mesmo grupo (controle ou cobre) nas diferentes salinidades. Asterisco (*) representa diferenças estatísticas entre os grupos (controle e cobre) na mesma salinidade.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mg/g Miligrama/grama

mg/L Miligrama/litro

mg/kg Miligrama/quilograma

mg/ml Miligrama/mililitros

$\mu\text{M/g/h}$ Taxa de excreção

[K⁺] Íons Potássio

[NH₃] Amônia

[Na⁺] – Íons de sódio

Na⁺ e K⁺ Íons de sódio e potássio

[NO²⁻] Nitrito

[PO₄³⁻] Fosfato

[Cl⁻] Ânions de cloro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1	OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO (<i>L. vannamei</i>)	17
3.2	TESTES DE TOXICIDADE E ANÁLISES.....	17
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4	RESULTADOS.....	20
4.1	ANÁLISE DA ÁGUA EXPERIMENTO CL _{50%} -24h.....	20
4.2	ANÁLISE ELEMENTAR DA ÁGUA DO EXPERIMENTO DA CL _{50%} -24h.....	20
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÕES.....	29
7	REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

A espécie *L. vannamei* (Camarão Branco do Pacífico), oriunda do Leste do Pacífico, é encontrada no México, Equador e Panamá, preferencialmente em fundos lamosos de até 72 metros de profundidade (ANGELO et al., 2003; FREITAS, 2003; BARBIERI et al., 2006). Essa espécie exótica foi introduzida para fins de aquicultura, o que pode gerar muitos riscos, uma vez que, podem invadir os ambientes naturais, podendo levar a sérios danos nos ecossistemas. Devido principalmente a esse motivo, o IBAMA em 1997 instituiu uma lei que restringe a comercialização de algumas espécies, entre elas o camarão marinho, podendo ser comercializado apenas para fins de aquarofilia. Dessa forma, desde 1998 não houve mais introdução de novos indivíduos dessa espécie, sendo comercializados apenas os nascidos em cativeiro (FREITAS, 2003).

Devido *L. vannamei* ser uma espécie de alto valor econômico, uma vez que o camarão representa uma importante fonte proteica aos seres humanos, seu cultivo cresceu muito nos últimos tempos (FREITAS, 2003; FAO, 2004). O *L. vannamei* em estágio juvenil tolera melhor a variação de salinidade, de 14,7 a 31,1 ppm, apresentando também três fases de adaptação em seu ciclo de vida em ambiente natural. Em sua fase larval tolera a salinidade oceânica, para a fase juvenil se ajusta à salinidade estuarina, retornando novamente à salinidade oceânica quando adultos. Porém em seu cultivo, devido a sua tolerância a adaptar-se a variações de salinidade, quando pós-larva e juvenil, podem suportar de 0% até 60% de salinidade (LIMA et al., 2011).

O desenvolvimento dos camarões peneídeos mostra diversos estágios larvais, onde cada estágio larval possui as suas próprias características morfológicas, nutricionais e ambientais bem definidas. No *L. vannamei*, os ovos eclodem logo após 12 horas, logo em seguida, já estão na primeira fase larval denominada de náuplio. Os náuplios são animais muito pequenos, possuindo em torno de 3 a 4 mm e não possuem uma morfologia e diferenciação bem definida (RAMIRO, 2020).

O desenvolvimento dos náuplios são influenciados por fatores abióticos, pois a larva nessa fase depende de fontes de energia internas para sobreviver antes de sofrer a metamorfose para passar a fase seguinte. O estágio de desenvolvimento dos náuplios consistem em 5 a 6 sub-fases (NI, NII, NIII, NIV, NV ou NVI), e cada sub-fase dura cerca de 24 horas (RAMIRO, 2020).

Um dos problemas enfrentados no cultivo de *L. vannamei* é a utilização de dietas ricas em fósforo e nitrogênio, onde um dos metais presentes na ração é o cobre, essencial para o metabolismo dos animais. Quando ocorre o acúmulo de restos de rações nos tanques de cultivo, o cobre tende a acumular junto, podendo assim ser transferido para o animal (LOPES, 2003; MOLON *et al.*, 2013). O cobre é um elemento essencial, é usado como um cofator em várias enzimas, sendo que várias proteínas evoluíram para regular sua distribuição na célula (UAUY *et al.*, 1998; PENA *et al.*, 1999), mas potencialmente tóxico, para todos os organismos (UAUY *et al.*, 1998; HARRIS, 2000), em altas concentrações.

Durante exposição de organismos de água doce ao cobre diluído na água, ocorre rápida absorção pelas brânquias, inibindo a atividade da enzima Na^+/K^+ - ATPase (GROSSEL *et al.*, 2002). Devido as brânquias dos organismos em água doce serem importantes órgãos de absorção de íons, essa inibição causa danos osmoregulatórios, como perdas difusivas de Na^+ e Cl^- para o ambiente externo mais diluído (GROSSEL *et al.*, 2002). Para organismos marinhos, vários autores também propuseram que a toxicidade do cobre ocorre via distúrbios osmoregulatórios (STAGG & SHUTTLEWORTH, 1982; WILSON & TAYLOR, 1993; GROSSEL, MCDONALD, *et al.*, 2004). No entanto, devido as brânquias dos organismos marinhos serem importantes órgãos de excreção do excesso de Na^+ absorvido *via* ingestão de água (para manter equilíbrio osmótico e iônico), um ganho líquido de Na^+ tem sido observado (GROSSEL, MCDONALD, *et al.*, 2004). Em contrapartida, quando o organismo “bebe” água salina para a manutenção dos processos osmoregulatórios, o cobre diluído na água pode se acumular no organismo (GROSSEL, MCDONALD, *et al.*, 2004). Dessa forma, amplas variações na salinidade em ambientes naturais, como nos estuários, pode afetar a toxicidade e acumulação do cobre para os organismos, uma vez que, as brânquias desses organismos sofrem mudanças para manter suas funções de osmoregulação frente alterações na salinidade. Porém, é totalmente desconhecido até que ponto a acumulação de cobre branquial reflete o grau de distúrbios fisiológicos durante a exposição.

Nesse sentido, o presente estudo buscou examinar como a salinidade pode afetar a toxicidade e a bioacumulação do cobre e relacionar com a fisiologia. A espécie escolhida no presente estudo foi o Camarão Branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), uma vez que, essa é uma espécie amplamente utilizada em sistemas de

cultivo, apresentando tolerância a uma ampla faixa de salinidade. Além de ser uma espécie exótica. Dessa forma, entender a tolerância dessa espécie ao cobre em função de diferentes salinidades é de grande importância comercial, econômica e biológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a biotoxicidade do cobre e o equilíbrio osmo-iônico de *Litopenaeus vannamei* diante sua exposição em diferentes salinidades.

2.2 Objetivos específicos

A. Calcular o valor da concentração letal do cobre necessário para causar mortalidade de 50% da população em 24h (CL50% - 24h) do *L. Vannamei* no estágio pós-larva 20 (PL20) nas salinidades de 5, 15 e 30 ppt;

B. Avaliar a concentração do cobre (bioacumulação) nas brânquias do *L. vannamei* no estágio pós-larva 20 (PL20) em função das salinidades 5, 15 e 30 ppt;

C. Avaliar a concentração dos íons (Na^+ , K^+) e o teor hídrico corpóreos nos diferentes órgãos (concentração diferencial) (brânquias, corpo e carapaça) do *L. vannamei* no estágio pós-larva 20 (PL20) em função das salinidades 5, 15 e 30 ppt.

D. Avaliar a taxa líquida de excreção de amônia do *L. vannamei* no estágio pós-larva 20 (PL20) em função das salinidades 5, 15 e 30 ppt.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e aclimação do camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*)

Camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*) foi obtido no estágio de desenvolvimento PL10 (1 milheiro) em piscicultura e transportado para o laboratório do Prof. Rodrigo Schweitzer localizado no Departamento de Ciências do Mar da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), Campus Baixada Santista. Os camarões foram mantidos em caixas d'água de 2000 l com salinidade 30 ppt e aeração constante até alcançarem o estágio de desenvolvimento PL20, estágio no qual os experimentos foram realizados.

Para alcançar os objetivos específicos, as pós-larva foram aclimatadas por 24h em cada salinidade estudada (5; 15 e 30 ppt) antes do início dos experimentos. As 3 diferentes salinidades foram alcançadas através do preparado diário de soluções com água do mar previamente coletada (Aquário do Guarujá, Aqua Mundo), filtrada (filtros de 0,45 µm), e diluída em água destilada. A aclimação se deu de forma gradual no qual um aumento ou diminuição da salinidade em torno de 1% foi utilizado até se alcançar a salinidade desejada. Durante o período de aclimação de 24h em cada uma das 3 salinidades experimentais, os camarões foram mantidos em tanques com aeração constante a 28°C, sendo alimentados 6 vezes ao dia com ração comercial especial para *L. vannamei*.

3.2 Testes de toxicidade e análises

Para alcançar o objetivo específico A, as pós-larva foram distribuídas aleatoriamente em câmaras experimentais de 500 ml (10 larvas), em triplicata, com aeração constante em banho maria (temperatura de 28°C). As soluções-teste de cobre foram preparadas a partir de cloreto de cobre heptahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pureza 99%, Sigma Aldrich), em água do mar (previamente filtrada e diluída, em água destilada, de acordo com a salinidade desejada), com 24 horas de antecedência, mantida sob agitação até o momento do teste, possibilitando a integral complexação do cobre com os elementos do meio. Os camarões foram expostos a 3 diferentes "ranges" de concentrações de cobre (um para cada salinidade, em duplicata). Esses "ranges" foram baseados no trabalho de Frias-Espericueta et al., (2003) com algumas modificações para as salinidades de 15 ppt e de 5 ppt, uma vez que não foram

encontrados artigos na literatura sobre os valores da CL_{50} para *L. vannamei* nas salinidades de 15 ppt e 5 ppt. As concentrações de cobre utilizadas foram, 0; 2; 6; 12; 24; 36; 48; 60; 72; 84; 96; 120; 144 mg/L para 30 ppt, 0; 3,5; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 56; 63; 70; 100 e 140 mg/L para 15 ppt, e 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 mg/L para 5 ppt. A CL_{50-24h} foi calculada no programa Trimmed Spearman-Kärber.

Ao final dos experimentos, foram coletadas amostras de água para análise das concentrações de cobre; Na^+ ; K^+ ; Cl^- ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; nitrito; nitrato; sulfato e fosfato.

As concentrações elementares na água foram medidas através de técnica de fluorescência de raio-X por reflexão total (TXRF). O Cl^- foi medido através de método colorimétrico proposto por Zall et al. (1956). A determinação de fosfato dissolvido na água foi realizada pelo método azul de molibdênio, com leitura em espectrofotômetro e a concentração de nitratos e nitritos na água foram determinados pelo método do N-(1-naftil)-etilenodiamina (NTD).

A partir dos dados obtidos da $CL_{50\%-24h}$ no **objetivo específico A**, foram realizados testes para se avaliar a bioconcentração do cobre nas brânquias e da concentração diferencial dos íons Na^+ e K^+ corpóreos (**objetivo específico C**) em função das diferentes salinidades. Para tanto, as pós-larva foram distribuídas aleatoriamente em câmaras experimentais de 500 ml (10 larvas), em triplicata, com aeração constante em banho maria à 28°C. O experimento consistiu em camarões em condições controles (um controle por salinidade) e em tratamentos (concentração de cobre em 50% do valor da $CL_{50\%-24h}$ previamente determinada (**objetivo específico A**) nas salinidades de 5 ppt (0,30 mgCu/l); 15 ppt (49,21 mgCu/l) e 30 ppt (106,82 mg/l). Após o período de 24 h, os animais foram anestesiados em gelo, lavados em solução de EDTA 10%, secados em papel absorvente e pesados. Após isso, com o auxílio de uma lupa, foram separados os órgãos (brânquias, corpo e carapaça) para análise da bioconcentração do cobre (somente brânquias) e da concentração diferencial dos íons corpóreos (brânquias, corpo e carapaça). Amostras de água dos aquários foram retiradas e congeladas para análises posteriores das concentrações de cobre; Na^+ ; K^+ ; Cl^- ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; nitrito; nitrato e fosfato. As pós-larvas não foram alimentadas durante o experimento.

A partir dos dados obtidos da $CL_{50\%-24h}$ no **objetivo específico A**, foram realizados testes para se avaliar o fluxo diferencial de amônia e o teor hídrico (**objetivo específico D**) em função das diferentes salinidades. Pós-larvas (PL20) de *L. vannamei* (N=60) foram individualmente expostas (câmaras de 50 ml) por 24h ao

cobre em concentrações referentes a 50% da CL_{50%}-24h previamente determinada nas salinidades de 5 ppt (0,30 mgCu/l); 15 ppt (49,21 mgCu/l) e 30 ppt (106,82 mg/l), assim como seus respectivos controles (um controle por salinidade). Os experimentos ocorreram em sistema fechado (sem renovação de água), com controle do pH (~ 7,0) e de temperatura (~27°C), com aeração constante. As pós-larvas não foram alimentadas durante o experimento. Durante o período de exposição, amostras de água foram coletadas no início do experimento (T₀) e após 9 e 12h de exposição para a determinação da taxa de excreção de amônia. A taxa de excreção de amônia foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Taxa de excreção de amônia} = (X_1 - X_2) * V (T * W)^{-1}$$

onde: X₁ e X₂ são, respectivamente, a concentração final e inicial de amônia (μMol/g/h) na água durante o período de fluxo, V é o volume da câmara (L), T o tempo de duração do período de fluxo (h) e W o peso (g).

Ao final do experimento os animais foram anestesiados em gelo e pesados em balança de precisão. Para a determinação do teor hídrico, os camarões foram colocados em estufa a 60°C por 24 h e pesados novamente, sendo que a diferença entre o peso fresco e o peso seco foi utilizado para a determinação do teor hídrico dos animais. Após isso, os camarões desidratados foram digeridos com ácido nítrico (10%), sendo o material digerido filtrado em malha 0,45μm (Millipore®) e diluído em água Milli Q (1:200) para a leitura dos íons Na⁺ e K⁺, por meio de fotometria de chama (Quimis Q498M) e de cobre utilizado um espectrômetro de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES, Thermo Scientific, modelo iCAP 6500 com vista axial), utilizando uma curva analítica construída a partir de solução padrão multielementar de 1000 mg/L (Merck®) contendo cobre (10 a 2000 μg/L em meio aquoso de HNO₃ 1% (v/v)). A leitura de amônia na água foi realizada segundo método colorimétrico proposto por Verdouw et al. (1978).

2.3 Análise estatística

A CL_{50%}-24h foi calculada pelo Programa Trimmed Spearman-karber com limites do intervalo de confiança em 95% e TRIM de 0 a 10%. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (média ± SEM). Para comparação entre os tratamentos para o teor hídrico, Na⁺ e K⁺ corpóreos, cobre nas brânquias e

fluxo líquido de amônia, foi aplicada a análise de variância de dois fatores (Two-Way ANOVA, fatores: concentração de cobre e salinidade), com indicação de significância de 95% ($p < 0,05$). Os programas utilizados foram o SigmaStat 3.5 para as análises estatísticas e o SigmaPlot 11.0 para a confecção dos gráficos.

4. RESULTADOS

3.1 Análise da água experimento CL_{50%}-24h

A concentração de amônia na água dos experimentos variou de 0,05 a 0,10 [NH₃] mg/L, assim como nitrito, de 0,02 a 0,08 [NO₂⁻] mg/L e potássio, com 0,04 a 0,07 [PO₄³⁻] mg/L. Já a concentração de sódio, cloreto e potássio, variou entre 250,92 a 12135,39 [Na⁺] mg/L, 137,56 a 935,86 [Cl⁻] mg/L e 66,41 a 302,68 [K⁺] mg/l, respectivamente (Tabela I).

Tabela 1. Concentração de Amônia(NH₃), Nitrito (NO₂⁻), Fosfato (PO₄³⁻), Sódio (Na⁺), Cloreto (Cl⁻), Potássio (K⁺) e Alcalinidade na água do experimento realizado para o cálculo da CL_{50%}-24 h.

Salinidade	[NH ₃]	[NO ₂ ⁻]	[PO ₄ ³⁻]	[Na ⁺]	[Cl ⁻]	[K ⁺]	Alcalinidade
mg/L							
5 ppt	0,10	0,02	0,04	250,92	193,58	66,41	21,00
15 ppt	0,05	0,03	0,06	1624,44	137,56	149,91	63,00
30 ppt	0,05	0,08	0,07	12135,39	935,86	302,68	125,00

Fonte: elaborado pela autora

3.2 Análise elementar da água do experimento da CL_{50%}-24h

Os valores reais de cobre na água (mg/ml) foram muito diferentes dos nominais, variando de 0,04 a a 0,30 para 5 ppt; de 0,06 a 1,99 para 15 ppt; e de 0 a 8,02 mg/ml para 30 ppt (Tabela 2).

Tabela 2. Valores nominais do cobre utilizados para calcular a CL₅₀-24 h e seus respectivos valores reais.

Salinidades	Valores nominais CL₅₀-24 h	Cobre
	mg/ml	mg/ml
5 ppt	0	0,04
	0,5	0,10
	1	0,05
	2	0,30
	4	0,12
	6	0,28
	8	0,27
15 ppt	0	0,06
	3,5	0,32
	7	0,14
	14	0,19
	28	0,22
	35	0,33
	70	1,99
	100	0,25
	140	0,85
30 ppt	0	0,00
	2	0,48
	6	0,90
	12	0,71
	36	0,22
	60	0,34
	96	8,02
	120	0,84
	144	0,41

Fonte: elaborado pela autora

Apesar dessas inconsistências entre valores nominais e reais do cobre nas diferentes salinidades, a toxicidade do cobre para as PLs foi fortemente influenciada pela salinidade, sendo observado aumento nos valores da CL₅₀-24h em menores salinidades. Nos animais aclimatados em 30 ppt, a CL₅₀-24h foi de 106,82 mg/l (limite inferior de 84,87 e superior de 134,45 mg/l). Já nos animais aclimatados em 15 e 5 ppt, a CL₅₀-24h foi de 49,21 mg/l (limite inferior de 35,53 e superior de 68,17 mg/l) e 0,30 mg/l (limite inferior de 0,23 e superior de 0,40 mg/l), respectivamente. Esses valores representam uma redução de cerca de 22 e 100% dos valores de CL₅₀-24h dos animais em 15 e 5 ppt, em comparação aos animais em 30 ppt (Tabela 3). Não

houve mortalidade das pós-larvas de *L. vannamei* aclimatadas por 24h em nenhuma das salinidades estudadas (controles).

Tabela 3. Valores da CL₅₀-24h, assim como seus limites superior e inferior, do cobre para o *L. vannamei* nas salinidades de 5; 15 e 30 ppt.

Salinidade	CL ₅₀ -24h	Limite Inferior	Limite Superior
5 ppt	0,30 mg/l	0,23 mg/l	0,40 mg/l
15 ppt	49,21 mg/l	35,53 mg/l	68,17 mg/l
30 ppt	106,82 mg/l	84,87 mg/l	134,45 mg/l

Fonte: elaborado pela autora

A concentração de cobre (mg/kg) nas brânquias das PLs de *L. vannamei* expostas ao cobre foi maior na maior salinidade (30 ppt), onde um efeito da toxicidade do cobre entre as salinidades foi observado (Tabela 4). A concentração de cobre nas brânquias variou de 0,003 a 0,11 mg/g, com aumento significativo nas PLs expostas ao cobre na salinidade de 30 ppt em relação ao controle (Figura 1).

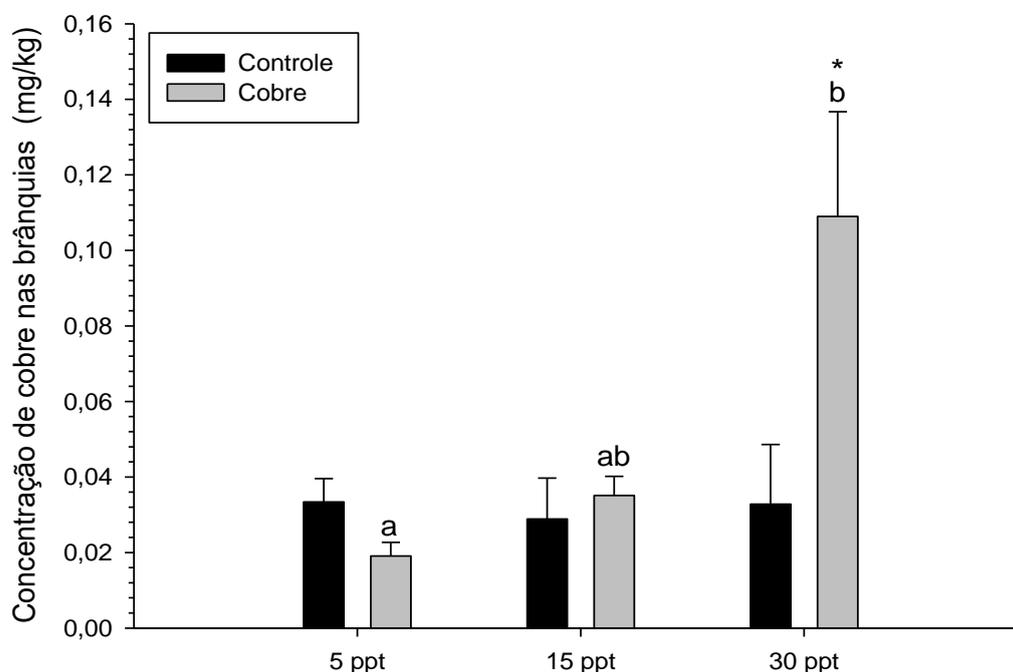


Figura 1. Concentração de cobre (mg/kg) nas brânquias de pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL₅₀-24h do cobre nas diferentes salinidades, além dos respectivos controles. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) na concentração do cobre entre os animais (controle ou cobre) nas diferentes salinidades. Asterisco (*) representa diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre os animais do controle e do cobre, na mesma salinidade.

Fonte: elaborado pela autora

Tabela 4. Resultados da análise de variância de dois fatores (Two-way ANOVA) para os parâmetros analisados nas pós-larvas de *L. vannamei* expostas ao cobre nas 3 diferentes salinidades.

	Efeito da salinidade			Efeito da exposição ao cobre			Interação		
	df	F stat	P value	df	F stat	P value	df	F stat	P value
Na ⁺ corpo	2	17,544	<0,001	1	0,37	0,546	2	3,632	0,035
Na ⁺ brânquias	2	4,276	0,021	1	0,476	0,494	2	2,893	0,067
Na ⁺ carapaça	2	1,7	0,193	1	1,078	0,304	2	1,213	0,306
K ⁺ corpo	2	1,841	0,171	1	0,00073	0,979	2	1,709	0,193
K ⁺ brânquias	2	1,438	0,251	1	3,785	0,06	2	3,347	0,047
K ⁺ carapaça	2	1,924	0,157	1	3,637	0,062	2	0,619	0,543
Teor hídrico	2	1,389	0,26	1	3,544	0,067	2	3,012	0,06
Cobre brânquias	2	4,976	0,014	1	10,012	0,004	2	9,255	<0,001
Excreção de amônia	2	3,526	0,04	1	7,538	0,009	2	2,13	0,133

Valores em negrito significam diferença estatística. *df* = graus de liberdade, seguidos pelos resíduos dos graus de liberdade. F stat = estatística F.

Fonte: elaborado pela autora

O teor hídrico corpóreo (%) das pós-larvas de *L. vannamei* variou de $81,4 \pm 0,35$ a $82,9 \pm 0,56$ (Tabela 5), sem alterações significativas para salinidade, cobre e interação entre os dois fatores (Tabela 5).

Tabela 5. Teor hídrico (%) corpóreo das pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL₅₀-24h do cobre nas salinidades de 5 ppt, 15 ppt e 30 ppt, além dos seus respectivos controles.

Salinidades	Tratamentos	Teor hídrico (%)
5 ppt	Controle	$81,9 \pm 0,36$
	Cobre	$81,5 \pm 0,37$
15 ppt	Controle	$81,4 \pm 0,35$
	Cobre	$82,9 \pm 0,56$
30 ppt	Controle	$81,2 \pm 0,85$
	Cobre	$81,9 \pm 0,80$

Fonte: elaborado pela autora

As concentrações dos íons Na⁺ e K⁺ (mg/g) no corpo variaram de $1869,3 \pm 79,74$ e $325,3 \pm 22,0$ mg/g, a $167070,4 \pm 30146,5$ e $115560,2 \pm 31566,6$; respectivamente (Tabela 6). Não foram observadas alterações nas concentrações de K⁺ no corpo e carapaça. Entretanto, o K⁺ nas brânquias diminuiu nas PLs expostas ao cobre nas salinidades de 5 e 30 ppt em relação à 15 ppt, com efeito significativo da interação entre salinidade e cobre (Tabela 4). Alterações das concentrações de Na⁺

foram observadas no corpo e brânquias. Aumento na concentração de Na⁺ nas PLs expostas ao cobre em relação ao controle foi observado no corpo na salinidade de 30 ppt. A concentração de Na⁺ no corpo aumentou nas PLs de *L. vannamei* no controle e expostas ao cobre nas salinidades de 15 e 30 ppt em relação à 5 ppt, com aumento significativo entre controle e cobre somente para as PLs na salinidade de 30 ppt, com efeito significativo somente para salinidade e para interação entre salinidade e cobre (Tabela 4). Já nas brânquias, a concentração de Na⁺ diminuiu nas PLs expostas ao cobre na salinidade 15 ppt enquanto aumentou nas larvas na salinidade de 30 ppt em relação ao controle, com efeito significativo somente para salinidade (Tabela 4). Não houve alterações nas concentrações de Na⁺ na carapaça (Tabela 5).

Tabela 6. Concentração dos íons Na⁺ e K⁺ (mg/g) no corpo, brânquia e carapaça das pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL₅₀-24h do cobre nas salinidades de 5 ppt, 15 ppt e 30 ppt, além dos seus respectivos controles. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (P<0,05) nas concentrações dos íons para cada um dos compartimentos (corpo, brânquia e carapaça) entre os animais do mesmo grupo (controle ou cobre) nas diferentes salinidades. Asterisco (*) representa diferenças estatísticas entre os grupos (controle e cobre) na mesma salinidade.

Salinidades	Tratamentos	Na ⁺ (mg/g)	K ⁺ (mg/g)
Corpo			
5 ppt	Controle	2207,9 ± 257,4 \mathbf{a}	390,0 ± 16,6
	Cobre	1869,3 ± 79,74 \mathbf{a}	381,4 ± 15,5
15 ppt	Controle	3388,4 ± 354,1 \mathbf{b}	325,3 ± 22,0
	Cobre	3183,3 ± 101,4 \mathbf{b}	366,1 ± 20,7
30 ppt	Controle	3039,6 ± 153,7 \mathbf{b}	388,7 ± 22,4
	Cobre	3972,9 ± 320,2 \mathbf{b}^*	355,1 ± 18,6
Brânquia			
5 ppt	Controle	101760,7 ± 20020,3	56545,1 ± 10700,6 \mathbf{a}
	Cobre	68147,4 ± 16749,2 \mathbf{a}	53111,3 ± 10769,2
15 ppt	Controle	116314,7 ± 31460,9	115560,2 ± 31566,6 \mathbf{b}
	Cobre	66579,2 ± 11124,0 \mathbf{b}	44613,5 ± 7981,6*
30 ppt	Controle	103667,2 ± 7882,7	64698,5 ± 5893,9 \mathbf{a}
	Cobre	167070,4 ± 30146,5 \mathbf{b}	62495,2 ± 10195,4
Carapaça			
5 ppt	Controle	5115,2 ± 782,0	6538,5 ± 976,7
	Cobre	4391,9 ± 387,8	4974,7 ± 650,3

15 ppt	Controle	4749,4 ± 700,3	12968,5 ± 6917,7
	Cobre	4451,0 ± 594,2	6199,5 ± 1647,1
30 ppt	Controle	6760,6 ± 642,9	6557,4 ± 1191,4
	Cobre	6531,5 ± 1004,1	3658,7 ± 832,2

Fonte: elaborado pela autora

Não foram observadas diferenças nas taxas de excreção de amônia ($\mu\text{Mol/g/h}$) nas PLs de *L. vannamei* para o controle nas três salinidades testadas (Figura 2). No entanto, foi observada que as taxas de excreção de amônia nos animais aclimatados à salinidade 5ppt e 30 ppt foram significativamente maiores em relação aos animais aclimatados à 15 ppt (Figura 2). Além disso, a taxa de excreção de amônia foi significativamente maior nas PLs expostas ao cobre nas salinidades de 5 e 30 ppt, em relação a seus respectivos controles (Figura 2). Foi observado que a excreção de amônia foi influenciada por ambos, salinidade e cobre, sem interações (Tabela 4).

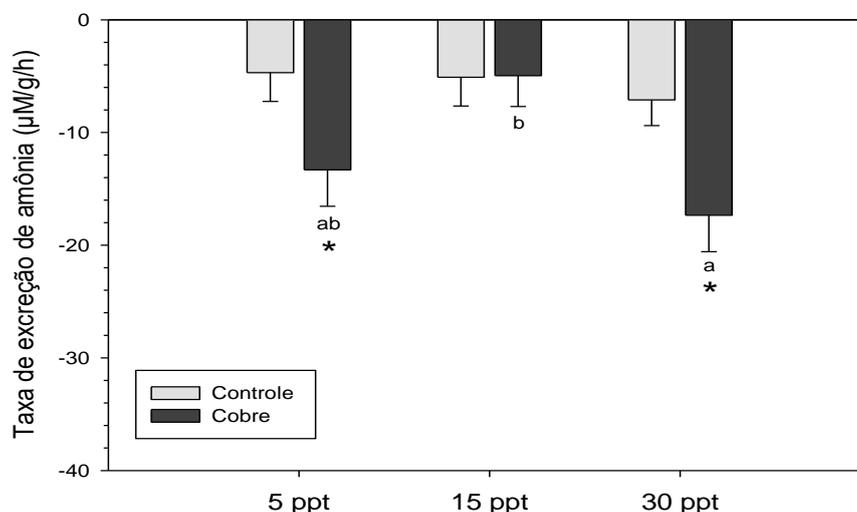


Figura 2. Taxa de excreção de amônia ($\mu\text{M/g/h}$) de pós-larvas do camarão branco do Pacífico expostos a 50% da CL50-24h do cobre nas salinidades de 5 ppt (A), 15 ppt (B) e 30 ppt (C), além dos respectivos controles. Asterisco (*) representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) nas taxas de excreção de amônia entre os animais expostos ao cobre e o grupo controle, em cada intervalo de exposição.

Fonte: elaborado pela autora

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a toxicidade do cobre para as PLs foi fortemente influenciada pela salinidade, sendo observado aumento nos valores da CL₅₀-24h em menores salinidades. Nos animais aclimatados em 30 ppt, a CL₅₀-24h foi de 106,82 mg/l. Já nos animais aclimatados em 15 e 5 ppt, a CL₅₀-24h foi de 49,21 mg/l e 0,30 mg/l, respectivamente. Em estudo anterior, utilizando PLs de *L. vannamei* aclimatadas e expostas em água do mar (34 ppt), foi encontrado valor da CL₅₀-24h de 84 mg/l, sendo a CL₅₀-24h de 37 mg/l de cobre total e 4,2 mg/l de cobre dissolvido (FRIAS-ESPERICUETA et al., 2003). Como demonstrado na Tabela 1, a concentração de Na⁺ nas salinidades de 15 e 30 ppt estavam cerca de 6 e 48 vezes mais elevadas em relação à 5 ppt conforme os objetivos A e B. A concentração de Cl⁻ nas salinidades de 15 e 30 ppt estavam cerca de 4 e 15 vezes mais elevadas em relação à 5 ppt. A concentração de K⁺ nas salinidades de 15 e 30 ppt estavam cerca de 2 e 4 vezes mais elevadas em relação a 5 ppt sendo todos alcançados no objetivo C. Nossos dados sugerem que a maior toxicidade do cobre em salinidade reduzida pode estar relacionada à sua maior disponibilidade em menores salinidades, devido a menor competição do metal com cátions dissolvidos (SANTORE et al., 2001).

Crustáceos da família Penaeidae têm padrões osmorregulatórios do desenvolvimento larval ontogenético do tipo III, ou seja, possuem os todos os estágios do ciclo de vida marinhos. Neste tipo de padrão, a tolerância à salinidade aumenta após a metamorfose entre as fases de desenvolvimento. A capacidade osmoionorregulatória muda nas pós-larvas, sendo que a capacidade máxima de regulação é estabelecida nos estágios de PL5 e PL6 (CHONG-ROBLES et al., 2022). Essa capacidade está diretamente relacionada com o surgimento de células ricas em mitocôndrias (i.e., ionócitos) que auxiliam no processo da regulação iônica nas diferentes salinidades. A exposição ao cobre alterou os processos ionoregulatório das PLs nas salinidades de 5 e 30 ppt. Nenhuma alteração na concentração de Na⁺ nas brânquias foi observada para as PLs dos controles. No entanto, a exposição ao cobre diminuiu as concentrações de Na⁺ nas brânquias das PLs expostas na salinidade de 5 em relação à 30 ppt, e aumentou na salinidade de 30 em relação à 5 e 15 ppt. Essas alterações podem estar relacionadas com a toxicidade e com as estratégias osmoionoregulatórias nas salinidades extremas (5 e 30 ppt). De fato, maior toxicidade do cobre foi observada na salinidade de 5 ppt, (CL₅₀-24h: 0,30 mg/l), o que demonstra

a maior disponibilidade do cobre em menores salinidades alcançadas no objetivo B. A exposição ao cobre é reconhecida por inibir a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase (NKA), presente nos ionócitos. Em águas salobras, essa enzima auxilia na absorção de íons Na^+ e K^+ , uma vez que o animal se encontra hiperconcentrado em relação ao meio, podendo sofrer perdas difusivas desses íons (PEQUEUX, 1995). Dessa forma, a inibição de enzimas como NKA pode alterar os processos de absorção do Na^+ (GROSELL et al., 2002), como observado no presente estudo. Por outro lado, organismos em água salgada, são menos concentrados que o meio externo, sofrendo com a perda de água e influxo contínuo de íons. Dessa forma, a NKA também possui papel crucial na manutenção da osmoionoregulação. No presente estudo, as PLs expostas ao cobre na salinidade de 30 ppt perderam a capacidade de manutenção das concentrações de Na^+ nas brânquias, provavelmente devido à inibição da NKA. Além disso, a concentração de cobre nas brânquias foi maior na salinidade de 30 ppt, o que indica maior absorção desse metal pelas brânquias, uma vez que, organismos marinhos possuem epitélio branquial mais permeável do que organismos de água doce. A excreção de amônia foi influenciada pela salinidade e pela presença do cobre, onde nas salinidades de 5ppt e 30ppt houve um aumento da excreção de amônia na presença do cobre. As brânquias dos crustáceos marinhos e estuarinos desempenham diversas funções fisiológicas, e durante a exposição a xenobióticos podem ocorrer pronunciados distúrbios respiratórios, metabólicos, na excreção de produtos nitrogenados, no equilíbrio iônico e osmótico e na regulação ácido-base dos animais (HENRY et al., 2002). Para peixes, já foi verificado um mecanismo acoplado de excreção de amônia com a absorção de Na^+ quando esses organismos enfrentam situações estressantes, tais como exposição à pHs ácidos (DUARTE et al., 2016, 2018). Em crustáceos os mecanismos associados à excreção de amônia pelas brânquias têm sido demonstrados por ocorrer por três vias diferentes: (i) por meio da dissociação intracelular do NH_4^+ em NH_3 e H^+ , onde o NH_3 (gasoso) se difunde para o meio aquático externo a favor do gradiente de pressão; (ii) os íons amônio (NH_4^+) são transportados por meio de vesículas que se fundem à membrana do epitélio branquial, sendo o NH_4^+ então liberado para o meio externo; e (iii) por meio de mecanismo acoplado a absorção de Na^+ via sistema de contra-transporte (NHE) (revisto por HENRY et al., 2012). Em geral, o aumento da excreção de amônia nos organismos aquáticos está associada ao aumento da concentração de amônia nos fluidos internos dos animais (e.g., plasma e hemolinfa), em virtude de uma maior

oxidação de aminoácidos pelo metabolismo oxidativo (BUCKING, 2016). Assim, o aumento da excreção de amônia nos camarões expostos ao cobre em salinidade 5 e 30 ppt, associado a falta de distúrbios osmo e ionoregulatórios (não alteração do teor hídrico e conteúdo de Na^+ corpóreo), indicaria um maior recaimento sobre os mecanismos que não estariam acoplados ao transporte de Na^+ nos animais alcançados no objetivo D.

5. CONCLUSÕES

O cobre foi tóxico para as PLs de *L. vannamei* aclimatadas e expostas em salinidade reduzida, particularmente em 5 ppt. Apesar da maior toxicidade do cobre na menor salinidade, o cobre bioacumulou nas brânquias das PLs expostas na salinidade de 30 ppt. Embora não tenham sido evidenciados efeitos do cobre no teor hídrico dos animais, foram observadas alterações nos íons Na^+ e K^+ nas brânquias e no corpo, assim como um aumento significativo da excreção de amônia nos camarões expostos ao cobre nas salinidades de 5 e 30 ppt, sugerindo um mecanismo para contrabalancear perdas difusivas dos íons causadas pela presença do cobre. Assim, a toxicidade do cobre *via* ração em sistemas de cultivo com baixa ou nenhuma renovação de água, em salinidades reduzidas, pode resultar em aumento da mortalidade de *L. vannamei*, que não está diretamente relacionado com a bioacumulação do cobre nas brânquias.

6. REFERÊNCIAS

- ANGELO, L.; SILVA, M.D. **Presença do Camarão Branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boene, 1931) em cultivos no Estado do Paraná, Brasil.** Paraná, 2003.
- BARBIERI, E.; MELO, G.A.S. **Biodiversidade: ocorrência da espécie *Litopenaeus vannamei* (Booni, 1931) no Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape – Ilha Comprida.** O mundo da Saúde: São Paulo, out/dez 30 (4), 654-659, 2006.
- BAUMGARTEN, MGZ; ROCHA, JMB & NIENCHESKI, LFH 1996. **Manual de análises de oceanografia química.** Editora da Furg. Rio Grande, 164 p.
- CHONG-ROBLES, J., GIFFARD-MENA, I., PATRÓN-SOBERANO, A., CHARMANTIER, G., BOULO, V., & RODARTE-VENEGAS, D. (2022). Ontogenetical development of branchial chambers of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) and their involvement in osmoregulation: ionocytes and Na⁺/K⁺-ATPase. **Cell and Tissue Research**, 390(3), 385–398. <https://doi.org/10.1007/S00441-022-03675-0/FIGURES/8>
- DI TORO, D.M., ALLEN, H.E., BERGMAN, H.L., MEYER, J.S., PAQUIN, P.R., SANTORE, R.C. **Biotic Ligand Model of the Acute Toxicity of Metals.** *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396, 2001.
- FAO. **Aquaculture Developmet.** FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries, n. 5. Rome: FAO, 2004.
- FREITAS, P.D. **Estudos em diversidade genética em estoques reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados N Brasil.** Tese de Doutorado para obtenção do título de Doutor em Genética e Evolução, São Carlos/SP, 2003.
- FRIAS ESPERICUETA, M. G., VOLTOLINA, D., OSUNA LOPEZ, J. I. Acute Toxicity of Copper, Zinc, Iron, and Manganese and of the Mixtures Copper–Zinc and Iron–Manganese to Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71,68–74, 2003.
- GROSELL, M., MCDONALD, M. D., WALSH, P. J., & WOOD, C. M. (2004). Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II : copper accumulation , drinking rate and Na + / K + -ATPase activity in osmoregulatory tissues. **Aquatic Toxicology**, 68, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.007>
- GROSELL, M., MCDONALD, M. D., WOOD, C. M., & WALSH, P. J. (2004). Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*). I. Hydromineral balance and plasma nitrogenous waste products. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, 68(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.006>

GROSEL, M., NIELSEN, C., & BIANCHINI, A. (2002). Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 287–303.

HARRIS, E.D., 2000. Cellular copper transport and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 291–301.

LOPES, D.V. **Acúmulo de metais traço Cobre (Cu) e Zinco (Zn) em viveiro de cultivos de camarão (*Litopenaeus vannamei*)**. Dissertação de Mestre de Ciências do Mar Tropical, Instituto de Ciências do Mar, Fortaleza/Ceará, 2006.

LIMA, P.P. **Influência da salinidade e temperatura da água nas respostas comportamental e fisiológica de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**. Tese para título de Doutor de pós-graduação em Psicobiologia. Natal, 2011.

MOLON, B.O. BAUER, W. WALLNER-KERSANACH. **Concentração de cobre e zinco no tecido de camarões em uma fazenda de cultivos**. 12^o Mostra de Produção Universitária, Rio Grande/RS, 2013.

PENA, M.M.O.; LEE, J.; THIELE, D.J. **A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution**. *NA. Soc. Nutr. Sci.* 1251-1260, 1999.

Pequeux, A. (1995). **Osmotic regulation in crustaceans**. *Journal of Crustacean Biology*, 15(1), 1–60. <https://doi.org/10.2307/1549010>
Santore, R. C., Di Toro, D. M., Paquin, P. R., Allen, H. E., & Meyer, J. S. (2001). **BIOTIC**

RAMIRO, B.D.O. **Efeito de diferentes dietas no desempenho de pós-larvas *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em sistema de larvicultura com redução de 50% de artêmia**. 2020.

STAGG, R. M., & SHUTTLEWORTH, T. J. (1982). The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. *J. Fish Biol.*, 491–500.

WILSON, R. W., & TAYLOR, E. W. (1993). Differential responses to copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to sea water and brackish water. *J Comp Physiol B*, 239–246.

SANTORE, R.C.; DI TORO, D.M.; PAQUIN, P.R., ALLEN, H.E.; MEYER, J.S. Biotic Ligand Model of the Acute Toxicity of Metals. 2. Application to Acute Copper Toxicity in Freshwater Fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2397–2402, 2001.

UAUY, R., OLIVARES, M., GONZALEZ, M. Essentiality of copper in humans 1 – 3. *Am J Clin Nutr* 3970009, 952–959, 1998.