



Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Biologia de  
Ambientes Aquáticos Continentais



**Bioacumulação de metais no copépode  
estuarino *Nitokra sp.* (Harpacticoida) e relação com a  
concentração de cálcio sob  
diferentes condições de pH**

**Bolton Armando Nhamússua**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila de Martinez Gaspar Martins  
Coorientadora: Fernanda Chaves Lopes

Rio Grande  
2025



Universidade Federal do Rio Grande  
Instituto de Ciências Biológicas  
Pós-graduação em Biologia de Ambientes  
Aquáticos Continentais



**Bioacumulação de metais no copépode  
estuarino *Nitokra sp.* (Harpacticoida) e relação com a concentração de  
cálcio sob diferentes condições de pH**

**Mestrando:** Bolton Armando Nhamússua

**Orientadora:** Profa. Dr<sup>a</sup> Camila de Martinez Gaspar Martins

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Fernanda Chaves Lopes

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Biologia de  
Ambientes Aquáticos Continentais como  
requisito parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Biologia de Ambientes  
Aquáticos Continentais.

Rio Grande  
2025

### Ficha Catalográfica

N576b Nhamússua, Bolton Armando.

Bioacumulação de metais no copépode estuarino *Nitokra* sp. (Harpacticoida) e relação com a concentração de cálcio sob diferentes condições de pH / Bolton Armando Nhamússua. – 2025.  
71 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2025.

Orientadora: Dra. Camila de Martinez Gaspar Martins.

Coorientadora: Dra. Fernanda Chaves Lopes.

1. Bioacumulação. 2. CO<sub>2</sub>. 3. Acidificação. 4. Metais. 5. Microcrustáceo. 6. Toxicidade. I. Martins, Camila de Martinez Gaspar. II. Lopes, Fernanda Chaves. III. Título.

CDU 595.34

Catálogo na Fonte: Bibliotecária Sabrina Vaz da Silva CRB 10/2243



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO  
GRANDE (FURG)  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES  
AQUÁTICOS CONTINENTAIS



## ATA DE DEFESA DE DISSAETRAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICO CONTINENTAIS - Nº 005/2025

Às 14:00 hs (quatorze horas) do dia 13 (treze) do mês de maio de 2025 (dois mil e vinte e cinco), via Webconferência, no link: <https://conferenciaweb.rnp.br/sala/glauco-cesar-dias-delevedove>, reuniram-se remotamente docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado do acadêmico Bolton Armando Nhamussua. A Dissertação intitulada **“Bioacumulação de metais no copépode estuarino *Nitokra sp.* (Harpacticoida) e relação com a concentração de cálcio sob diferentes condições de pH”** foi avaliada pela Banca Examinadora composta pela Prof<sup>a</sup> Dra. Camila de Martinez Gaspar Martins (Orientadora e Presidente da banca); Dra. Fernanda Chaves Lopes (Co-orientadora); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Marques de Souza (FURG) e Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri (UNIFESP). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou o acadêmico **APROVADO**. Desta forma, o acadêmico concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 16h34h (dezesesseis horas e trinta e quatro minutos) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pelo Acadêmico e pela Coordenadora do Curso.

Documento assinado digitalmente



CAMILA DE MARTINEZ GASPAR MARTINS

Data: 13/05/2025 18:01:46-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof<sup>a</sup> Dra. Camila de Martinez Gaspar Martins  
Orientadora e Coordenadora do Curso

Documento assinado digitalmente



FERNANDA CHAVES LOPES

Data: 13/05/2025 18:26:38-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Fernanda Chaves Lopes

Documento assinado digitalmente



MARTA MARQUES DE SOUZA

Data: 14/05/2025 11:09:07-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Marques de Souza

Documento assinado digitalmente



RODRIGO BRASIL CHOUERI

Data: 14/05/2025 11:34:11-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Brasil Choueri

Documento assinado digitalmente



BOLTON ARMANDO NHAMUSSUA

Data: 14/05/2025 16:08:42-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bolton Armando Nhamussua

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e familiares pelo apoio e compreensão de *modus vivendi* que ultimamente adotei. Sinto saudades vossas e daquelas refeições de família acompanhadas de muita conversa e sabedoria.

No entanto, o atual paradigma do mundo, baseado na extração do lucro, me advertiu da visão mecanizadora dita por um dos maiores intelectuais que este mundo já teve, Benjamin Franklin, ao dizer:

**“If you do tomorrow what you did today, you will get tomorrow what you got today”.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelo poder da escolha que nos concede, pois graças a isso, homens de grande valor e convicção lutam por uma sociedade justa, educada, próspera e um futuro melhor das bonitas flores colhidas no jardim do Éden. E porque a vida é caracterizada por ser uma viagem em que não conhecemos o seu destino. Agradeço a Deus toda proteção e companhia, pois cheguei a mais uma etapa em que partilho os resultados de um grupo que trabalhou bastante para entender o real paradigma entre metais e acidificação da água.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande (FURG) por cruzar uma parte da minha vida com diversas mentes que dia após dia, se dedicam a gerar conhecimento baseado em provas científicas. Essa interação me proporcionou um processo contínuo de ensino e aprendizado nas diversas áreas científicas dentro da FURG e a sua importância no contexto global. Graças a essa abertura internacional, é também nesta universidade onde aprendi muito sobre outros países com os respectivos compatriotas.

Agradeço a Capes e ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pelo apoio institucional ao longo desta jornada. Esta oportunidade me tornou um profissional com base suficiente para estudar e avaliar a qualidade de água, assim como de aspectos e problemas ligados à poluição dos ecossistemas aquáticos. Todo conteúdo lecionado durante o programa foi bastante importante na minha pesquisa.

À minha orientadora, Professora Dra. Camila Martins, agradeço a orientação dedicada, paciência, incentivo constante e pelas valiosas contribuições científicas e acadêmicas ao longo deste trabalho. Esta jornada não foi apenas uma mentoria científica, foi também um grande ensinamento em matérias de liderança e gestão do tempo, face ao estilo de vida atual, caracterizado por muito trabalho e pouca disponibilidade de tempo para dar atenção a nossos entes queridos. Pois, apesar de existirem muitos livros que ensinam sobre isso, poucos são os que conseguem colocar em prática. Agradeço toda a confiança depositada em mim, pois ela foi o motor importante na execução desse grande delineamento experimental. Sei que não foi fácil para ti lidar com alguém que muito percebe de aquacultura, mais virada a ciências agrárias, no entanto, me ensinou que, independentemente da abordagem, o efeito ecotoxicológico é o mesmo.

A minha coorientadora, Dra. Fernanda Lopes, agradeço o todo carinho, atenção, paciência e ensinamento depositados ao longo deste trabalho. Sem a sua ajuda, teria repetido várias vezes o

delineamento experimental. Palavras me faltam para adjetivar a sua importância neste trabalho. Pois o tiveste como seu trabalho também. Não me esqueço do tempo que sempre me corrigia e me incentivava sempre que algo dava errado.

Ao Professor Rogério Vianna, pelo total apoio e atenção desde a minha chegada. Foi muito fácil chegar ao Brasil e me ambientar graças à total disponibilidade do senhor, desde a minha recepção na rodoviária, hospedagem no hotel de trânsito e na escolha de orientador.

Aos membros do grupo de pesquisa EcoBioTox, especialmente ao Muryllo, a Josiane e Jenifer, pela ajuda com as minhas demandas dos experimentos, agradeço a colaboração, troca de ideias e ambiente de trabalho acolhedor.

À minha família, especialmente ao meu pai e amigo Armando Manuel Nhamussua, agradeço o amor, apoio incondicional e compreensão em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

A minha namorada Vanadia Renato Massingue, por todo amor, compreensão e paciência que tem por minha pessoa, não foi fácil adotar a agenda de namoro à distância, mas a cada dia evoluímos. A distância é mera variável para o tamanho de afeto que a gente tem pelo outro.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, agradeço a convivência, companheirismo e apoio nas diversas etapas deste percurso.

## RESUMO

A bioacumulação de metais nos organismos desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis de metais traços essenciais para processos fisiológicos-chave. No entanto, nem todos os metais presentes no ambiente são essenciais, e até mesmo os metais essenciais podem se tornar tóxicos quando presentes em altas concentrações na água. Alterações nos parâmetros físico-químicos da água podem afetar a especiação, a biodisponibilidade e a toxicidade dos metais. Nesse sentido, o pH é um fator chave, e sob condições ácidas, a biodisponibilidade dos metais tende a aumentar devido à maior proporção de íons metálicos livres, já que os íons  $H^+$  e cátions metálicos competem pelos locais de complexação, como a matéria orgânica e ânions inorgânicos. Esse aumento na biodisponibilidade também pode interferir na absorção de macronutrientes essenciais, como Cálcio (Ca) e Sódio (Na), por meio da competição nos sítios ativos biológicos. Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade ( $LC_{50}$ ), a toxicocinética (bioacumulação sob exposição a  $LC_{10}$  e subsequente depuração) dos metais Cd, Cu e Zn, bem como as concentrações de Ca e Na no copépode estuarino *Nitokra* sp., sob duas condições de pH: 8,1 (natural) e 7,6 (acidificado, conforme projetado pelo IPCC, 2023). Todos os metais seguiram uma curva típica de toxicidade, com o Cu sendo o mais acumulado pelos os copépodes, seguido pelo Cd e Zn, sem diferença significativa entre os pH 8,1 e 7,6. Os fatores de bioconcentração (BCFs) foram mais elevados no pH 8,1 do que no 7,6, contrariando a hipótese inicial de que a bioacumulação de metais seria maior sob condições de pH baixo devido ao aumento da biodisponibilidade dos metais. Durante a exposição aos metais, não foram observados efeitos significativos nas concentrações de Ca e Na. No entanto, tendências, como a redução na concentração de Ca com Cd e Zn e o aumento com Cu, sugerem possíveis sinais precoces de distúrbios fisiológicos. Na fase de eliminação, as concentrações de Ca nos copépodes previamente expostos ao Cu foram mais altas em comparação com os expostos ao Cd e Zn, embora não significativamente diferentes do controle. O efeito pronunciado do Cd indica uma forte competição com o Ca pelos sítios de incorporação nos copépodes. O cenário de pH projetado pelo IPCC (2023) não afetou significativamente a toxicidade, bioacumulação ou concentração de Na em *Nitokra* sp. durante a exposição ao Cd, Cu e Zn, e nem durante a fase da depuração.

**Palavras-chave:** CO<sub>2</sub>, acidificação, metais, bioacumulação, microcrustáceo, toxicidade.

## ABSTRACT

Metal bioaccumulation in organisms plays a critical role in maintaining essential trace metal levels required for key physiological processes. However, not all of them are essential, and even essential metals can become toxic when present at high concentrations in the water. Changes in the physicochemical parameters of water can affect metal speciation, bioavailability, and toxicity. In this sense, pH is a key factor, and under acidic conditions, metal bioavailability increases due to a higher proportion of free metal ions, as  $H^+$  and metal cations compete for complexation sites like organic matter and inorganic ions. This increased availability can also interfere with the uptake of essential macronutrients such as calcium (Ca) and Sodium (Na) through competition at biotic binding sites. Thus, the main objective of this study was to evaluate the toxicity ( $LC_{50}$ ), toxicokinetics (bioaccumulation under  $LC_{10}$  exposure and subsequent depuration), and the effects on Ca and Na concentrations of Cd, Cu, and Zn in the estuarine copepod *Nitokra* sp., under two pH conditions: 8.1 (natural) and 7.6 (acidified, as projected by the IPCC, 2023). All metals followed a typical toxicity curve, with Cu being the most toxic to copepods, followed by Cd and Zn, with no significant difference between pH 8.1 and 7.6. The bioconcentration factors (BCFs) were higher at pH 8.1 than at 7.6, contradicting the initial hypothesis that metal bioaccumulation would be greater under low pH conditions due to increased metal bioavailability. During metal exposure, no significant effects on Ca and Na concentrations were observed. However, subtle trends, such as a reduction in Ca concentration with Cd and Zn and an increase with Cu, suggest potential early signs of physiological disruption. In the elimination phase, Ca concentrations in copepods previously exposed to Cu were higher compared to those exposed to Cd, though not significantly different from the control. The pronounced effect of Cd indicates strong competition with Ca within the copepods. The acidified pH scenario projected by the IPCC (2023) did not significantly affect the toxicity, bioaccumulation or Na concentration in *Nitokra* sp. during exposure and depuration to Cd, Cu and Zn.

**Keywords:** CO<sub>2</sub>, acidification, metals, bioaccumulation, microcrustacean, toxicity.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação cumpre com as normas recomendadas pelo programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC). A sua estrutura contém uma Introdução Geral que aborda todo o contexto que envolve o problema e justificativa do trabalho, hipóteses e objetivos. Após esta seção segue as referências da Introdução Geral de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT). Em seguida é apresentado o Capítulo único da dissertação, intitulado “How pH Shapes Metal Toxicokinetics: Interplay Between Cd, Cu, Zn, and Ion Regulation in the Estuarine Copepod *Nitokra sp.*” seguindo as normas de formatação da revista anfitriã, (A2). Por fim, estão as considerações finais, onde destacam-se as respostas aos objetivos traçados e perspectivas.

## SUMÁRIO

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                | 1  |
| LISTA DE TABELAS .....                                                | 3  |
| 1.1. Mudanças Climáticas: aquecimento e acidificação.....             | 5  |
| 1.2. Contaminação, assimilação e toxicidade de metais .....           | 9  |
| 1.3. Estuários .....                                                  | 14 |
| 1.4. Copépodes (Nitokra sp.) e seu uso em ensaios de toxicidade ..... | 16 |
| 2. HIPÓTESES.....                                                     | 19 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                     | 19 |
| 4. REFERÊNCIAS .....                                                  | 21 |
| 5. CAPÍTULO 1 .....                                                   | 29 |
| 1. INTRODUCTION.....                                                  | 31 |
| 2. MATERIALS AND METHODS .....                                        | 34 |
| 3. RESULTS.....                                                       | 42 |
| 4. DISCUSSION .....                                                   | 52 |
| 5. CONCLUSION .....                                                   | 57 |
| REFERENCES.....                                                       | 58 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....                           | 61 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Variação global de emissão de gases com efeito estufa (IPCC, 2023).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 5  |
| <b>Figura 2.</b> Projeção da emissão e concentrações de CO <sub>2</sub> na atmosfera até 2100 (IPCC, 2023).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 6  |
| <b>Figura 3.</b> Processo de acidificação da água com aumento de CO <sub>2</sub> (ZENG; CHEN; ZHUANG, 2015).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Variação do pH da água doce em função do aumento da pCO <sub>2</sub> superficial (250–2.500 µatm), com base em valores observados em lagos ao redor do mundo (Sobek et al., 2005). As linhas de contorno representam aumentos de pCO <sub>2</sub> (ΔpCO <sub>2</sub> ) de 50 a 550 µatm, compatíveis com projeções do IPCC até 2100. A alcalinidade foi mantida constante (800–2.500 meq m <sup>-3</sup> ), não influenciando significativamente o padrão das curvas (PHILLIPS et al., 2015). | 8  |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama de processos físico-químicos que influenciam na disponibilidade e assimilação de metais por organismos aquáticos (DI TORO et al., 2001).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema representativo do ligante biótico mostrando a complexação orgânica e inorgânica na água e a interação com um metal (exemplo Cu) e cátions com o ligante biótico. (SANTORE et al., 2001).                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 11 |
| <b>Figura 7 -</b> Processo de absorção e bioacumulação de metais na cadeia trófica (JAMIL EMON et al., 2023).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 12 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema representativo de como os estuários respondem à elevados níveis de CO <sub>2</sub> e às mudanças climáticas (LI et al., 2023b)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 16 |
| <b>Figura 9:</b> Náuplios de copépodes (a e b, respectivamente) e estágio de desenvolvimento de copépodes (C1, C2, C3, C4 e C5) com vista lateral (TELESH et al., 2008).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 17 |
| <b>Figura 10.</b> Fêmea ovada da espécie Nitokra sp. (FENILI, 2012).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 18 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1</b> - Experimental design scheme showing acidification via CO <sub>2</sub> injection .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 35 |
| <b>Figure 2</b> - Acute toxicity curves (log-logistic) for Zn, Cu, and Cd at pH 8.1 and pH 7.6 for <i>Nitokra</i> sp. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 44 |
| <b>Figure 3</b> - Profile of accumulation (0–48 h) and depuration (48–96h) of Cd, Cu, and Zn at pH 7.6 (graphs A-C) and pH 8.1 (graphs D-F) by the <i>Nitokra</i> sp. Concentrations of Cd, Cu, and Zn over the exposure period (0 – 48 h) were: 0.03, 0.02, and Zn 0.39 mg/L, respectively. Black dots represent each pool (n=4), yellow curves indicate the predicted median values, and the shaded gray areas represent the 95% uncertainty intervals. Graphs were generated with the <b>rbioacc</b> package. .... | 46 |
| <b>Figure 4</b> - Mean ± standard error concentrations of calcium (A) and sodium (B) in <i>Nitokra</i> sp. pools (n = 4) following 48 h of exposure to equipotent LC <sub>10</sub> concentrations of Cd (0.03 mg/L), Cu (0.02 mg/L), and Zn (0.39 mg/L) at pH 7.6 and 8.1. Concentrations are expressed in µg/mg dry weight. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups (p < 0.05), as determined by two-way ANOVA.....                                                | 48 |
| <b>Figure 5</b> - Mean ± standard error concentrations of calcium (A) and sodium (B) in <i>Nitokra</i> sp. pools (n = 4) at 48 h of depuration from exposure to equipotent LC <sub>10</sub> concentrations of Cd (0.03 mg/L), Cu (0.02 mg/L), and Zn (0.39 mg/L) at pH 7.6 and 8.1. Concentrations are expressed in µg/mg dry weight. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups (p < 0.05), as determined by two-way ANOVA. ....                                      | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1</b> - Values of LC <sub>50</sub> and LC <sub>10</sub> (mg/L), and the lower and upper limit, for Zn, Cd, and Cu for <i>Nitokra</i> sp. at pH 8.1 and 7.6. Toxicity values were estimated using the Trimmed Spearman-Kärber method.....                                                                                                                                                                   | 43 |
| <b>Table 2</b> - Mean concentrations $\pm$ standard error of metals measured in water samples (n=3) from the acute toxicity. The average represents water sampled at the beginning and at the end of the experiment (96 h). Water was sampled from control, low, and high concentration testes for each metal. The “< LOQ” represents values below the Limit of Quantification of the method (see section 2.6)..... | 43 |
| <b>Table 3</b> - Concentration of metals in water from the accumulation-depuration experiment with <i>Nitokra</i> sp. Data are presented as mean $\pm$ standard error. The “< LOQ” represents values below the Limit of Quantification of the method (see section 2.6). ....                                                                                                                                        | 46 |
| <b>Table 4</b> - The steady-state bioconcentration factor (BCF <sub>ss</sub> ) was calculated as the ratio between the mean concentration of metals in pooled copepod samples (C <sub>p</sub> , $\mu$ g/mg) and the mean metal concentration in the water (C <sub>w</sub> , mg/L). ....                                                                                                                             | 47 |
| <b>Table 5</b> - Toxicokinetic parameters and bioconcentration factors (BCF <sub>k</sub> ) estimated for Cd, Cu, and Zn in <i>Nitokra</i> sp., including uptake rate constant (k <sub>u</sub> ), elimination rate constant (k <sub>e</sub> ), and time to 95% depuration (t <sub>95%</sub> ).....                                                                                                                   | 47 |
| <b>Table 6</b> - Physicochemical parameters measured during both toxicity test (Acute test and toxicokinetic assays). Mean values $\pm$ standard error for each parameter were calculated by pooling data from both experiments. The abbreviations correspond to the parameters temperature (T °C), dissolved oxygen (DO), pH, salinity (S‰), and electrical conductivity (EC).....                                 | 50 |
| <b>Table 7</b> - The carbonate speciation system was assessed from acute toxicity and toxicokinetic tests. Mean values for each parameter were calculated by pooling data from both experiments. Abbreviations represent total alkalinity (TA). partial pressure of carbon dioxide (pCO <sub>2</sub> ).                                                                                                             |    |

bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ), and calcite ( $\Omega$  Ca) and aragonite ( $\Omega$  Ar) saturation state. Sampled values are the average of 4 samples per pH. ....51

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Mudanças Climáticas: aquecimento e acidificação

As emissões antropogênicas de gases de efeito estufa têm conduzido a um aumento exacerbado de concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) na camada atmosférica desde a era pré-industrial (1750), impulsionado, em grande parte, pelo crescimento econômico e populacional (IPCC, 2023). O  $\text{CO}_2$  e o metano ( $\text{CH}_4$ ) lançados no ambiente têm provado, inequivocamente o aquecimento global, com um incremento concomitante de  $1,1^\circ\text{C}$  nas últimas duas décadas (2001 - 2020). Como pode ser visto na Figura 1, a curva de emissão de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  acentuou-se a partir de 1900, configurando um aumento expressivo na emissão destes gases para a atmosfera (Figura 1) (IPCC, 2023). As concentrações atuais giram em torno de 410 ppm, 1866 e 332 ppb de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e Óxido nítrico ( $\text{N}_2\text{O}$ ), respectivamente (IPCC, 2023). Em 2019, cerca de 79% das emissões de gases de efeito estufa foram provenientes do setor de energia, indústria, transporte e de construção, e o restante (21%) provenientes da agricultura, silvicultura e outras atividades ligadas ao uso do solo. Ainda, de acordo com o IPCC, estima-se que a emissão de  $\text{CO}_2$  duplicará até 2100 em relação aos níveis de emissões atuais (Figura 2).

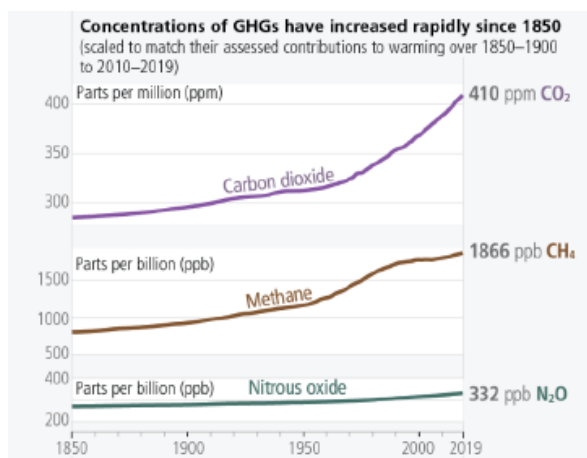


**Figura 1.** Variação global de emissão de gases com efeito estufa (IPCC, 2023).

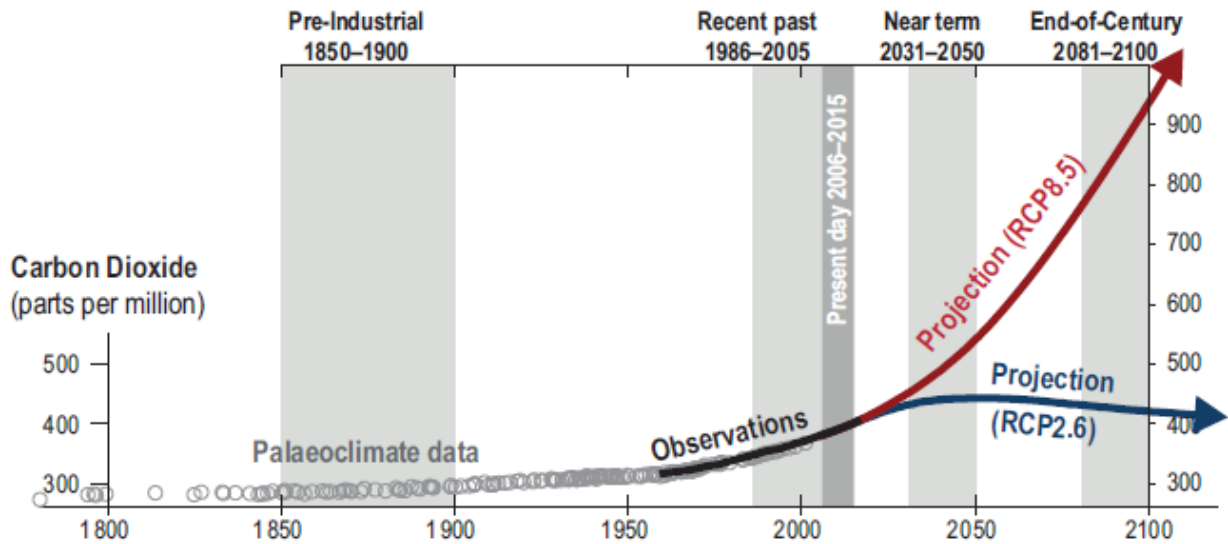


**Figura 2.** Projeção da emissão e concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera até 2100 (IPCC, 2023).

O aumento na emissão de CO<sub>2</sub> para atmosfera aumenta sua pressão parcial ( $p\text{CO}_2$ ) e, consequentemente sua dissolução nos corpos d'água. O CO<sub>2</sub> dissolvido, reage com moléculas de água formando ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) que, por ser instável, se dissocia em íons bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e íons hidrogênio (H<sup>+</sup>). O HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ainda se dissociar em íons carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e íons hidrogênio (H<sup>+</sup>), conforme equação e o esquema a seguir (ZENG; CHEN; ZHUANG, 2015) (Figura 3). Deste modo, o excesso de emissão de CO<sub>2</sub> desloca a reação química, favorecendo a formação de H<sup>+</sup> e resultando na acidificação dos ambientes aquáticos. A acidificação é definida como o aumento da concentração de íons H<sup>+</sup> na água e, portanto, queda do seu pH (DONG et al., 2020).

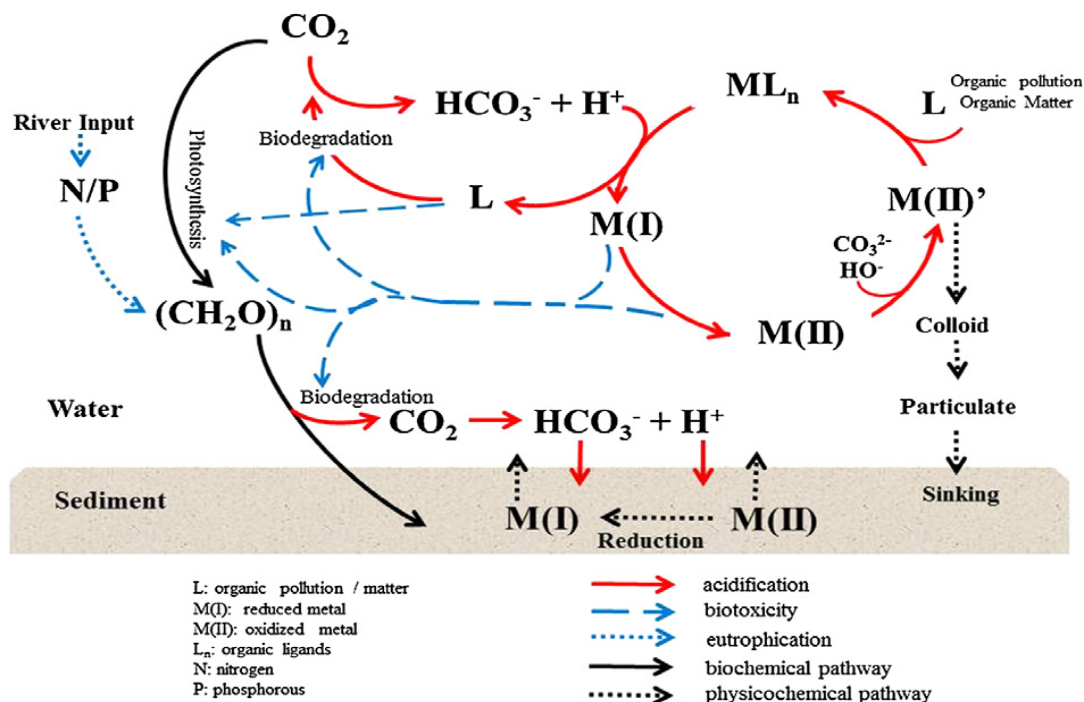


**Figura 3.** Processo de acidificação da água com aumento de CO<sub>2</sub> (ZENG; CHEN; ZHUANG, 2015)

A química deste processo de acidificação e suas consequências têm sido bastante estudadas em ambientes marinhos e pouco se sabe sobre os ambientes aquáticos continentais, como os de água doce ou estuarinos (PHILLIPS et al., 2015). O oceano acaba sendo o principal foco pela sua vasta amplitude e seu papel como sumidouro de CO<sub>2</sub> atmosférico. Estudos estimam uma redução dos níveis de pH entre 0,3 e 0,4 unidades nos oceanos, se mantido o mesmo cenário de consumo de combustíveis fósseis atual (PHILLIPS et al., 2015). Por outro lado, a acidificação dos pequenos lagos causada por aumento na *p*CO<sub>2</sub> constitui um efeito insignificante devido ao efluxo dos lagos que é reduzido com o aumento de *p*CO<sub>2</sub>, por exemplo, concentrações de CO<sub>2</sub> de 1000 e 2500 µatm atualmente demonstram uma redução de valor de pH nos lagos entre 0,19 e 0,09 respectivamente (Figura 4). Porém, para os grandes lagos e estuários eutróficos espera-se um comportamento da acidificação similar ao dos oceanos (Figura 5) que é gerada pela redução do pH graças ao aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico (LI et al., 2023a; PHILLIPS et al., 2015). Por esse motivo que, as taxas futuras e os efeitos da acidificação induzida pelo CO<sub>2</sub> nos grandes lagos são projetados utilizando apenas a química do carbono e os pressupostos de que o *p*CO<sub>2</sub> do lago segue o comportamento do CO<sub>2</sub> atmosférico até 2100. Num monitoramento feito dentro de 6 anos em estuários, rios e lagos,

observou-se uma redução do pH aproximadamente 0.098 unidades por ano (SCANES; SCANES; ROSS, 2020).

As respostas dos organismos aquáticos ao aumento da  $p\text{CO}_2$  são particularmente complexas, e a acidificação deve estressar desproporcionalmente os organismos que são sensíveis ao pH (GLIBERT et al., 2022). Processo como calcificação de organismos é afetado pela química da  $p\text{CO}_2$  na água devido a sua capacidade de reduzir estruturas contendo o cálcio, como carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (THOMSEN et al., 2017). Mas as mudanças na especiação do sistema de carbonatos são chave para acidificação, que também influencia o fracionamento e especiação de metais traços (ZITOUN et al., 2024). Neste contexto, a acidificação pode resultar também em hipercapnia/acidose e consequentemente a realocação dispendiosa de energia entre importantes traços biológicos (crescimento e reprodução) e processos de defesa/reparo (WANG et al., 2018).

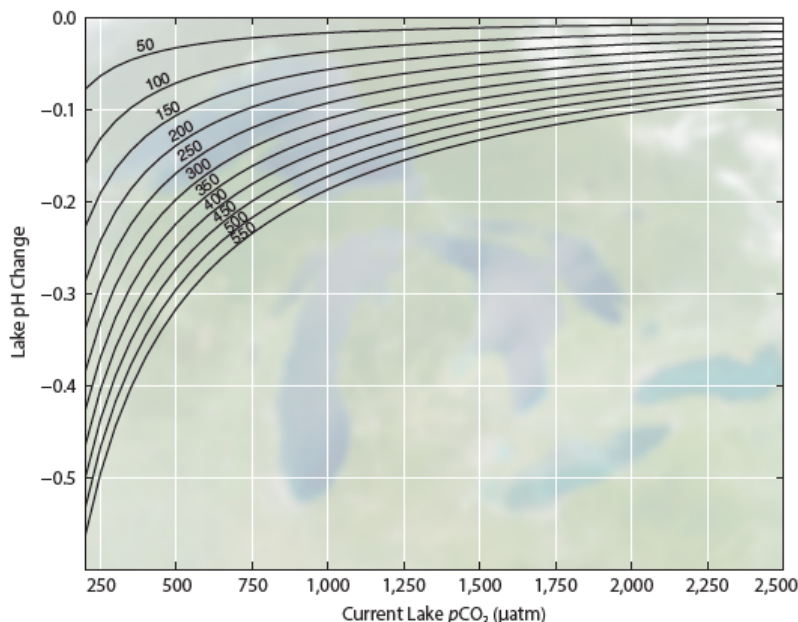


**Figura 4.** Variação do pH da água doce em função do aumento da  $p\text{CO}_2$  superficial (250–2.500  $\mu\text{atm}$ ), com base em valores observados em lagos ao redor do mundo (Sobek et al., 2005). As linhas de contorno representam aumentos de  $p\text{CO}_2$  ( $\Delta p\text{CO}_2$ ) de 50 a 550  $\mu\text{atm}$ , compatíveis com projeções do IPCC até 2100. A alcalinidade foi mantida constante (800–2.500  $\text{meq m}^{-3}$ ), não influenciando significativamente o padrão das curvas (PHILLIPS et al., 2015).

De forma, geral as mudanças climáticas, representadas principalmente, pelo aquecimento global e acidificação, têm causado danos substanciais e perdas cada vez mais irreversíveis aos ecossistemas. Sabe-se que estes processos podem aumentar a suscetibilidade das espécies a doenças e presença de contaminantes no ambiente, assim como, favorecer invasões de espécies

exóticas. Em resposta às mudanças climáticas, espécies de água doce e marinhas têm mudado seus habitats, suas atividades sazonais, seus padrões de migração, bem como sua abundância e interações entre espécies, além dos processos metabólicos e fisiológicos (IPCC, 2014). Por exemplo, foi observada menor diversidade no plâncton eucariótico em condições de alta  $p\text{CO}_2$  ( $1910 \pm 73 \mu\text{atm}$ ) (RAHLFF et al., 2020). Cabe lembrar que alterações nos parâmetros físico-químicos da água, como temperatura e pH, não só influenciam sobre os processos fisiológicos dos indivíduos, como também a biodisponibilidade e toxicidade de contaminantes.

## **1.2. Contaminação, assimilação e toxicidade de metais**

Os metais são liberados continuamente na biosfera de forma natural por atividades vulcânicas e intemperismo das rochas. Porém, a maior parte do enriquecimento ambiental por metais tem origem antropogênicas, destacando atividades ligadas à mineração, queima de combustíveis fósseis, despejo de dejetos e dragagem (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009; HATJE; ANDRADE, 2009; KADIENE et al., 2019). Os metais são um dos poluentes mais comuns e tóxicos presentes nos ambientes aquáticos. Elevados níveis de metais na água podem gerar efeitos adversos em organismos bentônicos ou pelágicos, sendo que estes efeitos podem ser variáveis entre espécies e níveis (DONG et al., 2020; JIN et al., 2021; ROBERTS et al., 2013). Cabe ressaltar que devido a sua afinidade por matéria orgânica (carbono orgânico dissolvido) é comum que sedimentos concentrem mais metais do que a água, a depender do teor de matérias orgânicas na sua composição. Isso acaba aumentando resultando em perigo ecológico mais elevado para organismos bentônicos (LOPES, et al., 2025; TANG et al., 2023)

Assume-se que a toxicidade de metais para organismos aquáticos, ocorre devido à reação de íons metálicos (metais livres) com sítios de ligação fisiologicamente ativos nos organismos, formando assim o complexo metal-ligante biótico, com toxicidade acumulação-dependente (DI TORO et al., 2001). Porém, as concentrações das formas livres (biodisponíveis) de metais são determinadas pelas características físico-químicas da água, como pH, salinidade, moléculas inorgânicas e orgânicas complexas, como  $\text{CO}_3^{2-}$  e carbono orgânico dissolvido (EPA, 2007; PAQUIN et al., 2002). Os metais são cátions, ou seja, possuem cargas positivas, sendo assim, competem com outros elementos de cargas positivas pelos mesmos sítios de ligação (com cargas negativas) nos organismos (DI TORO et al., 2001). Por exemplo, os íons metálicos competem com

cátions como cátion cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e cátion Sódio ( $\text{Na}^+$ ) por sua incorporação pelo ligante biótico, afetando a absorção destes íons com extrema essencialidade. Da mesma forma, cátions como  $\text{H}^+$  podem competir por complexantes de metais, como o carbono orgânico dissolvido (COD ou DOC) ou ânions inorgânicos (carbonatos, cloretos, etc) reduzindo suas formas complexadas e aumentando suas formas livres biodisponíveis (Figura 5). Adicionalmente, a geoquímica desses metais, modificando a sua solubilidade, transporte e migração nos ecossistemas aquáticos (BEZERRA; TAKIYAMA; BEZERRA, 2009). Portanto, a biodisponibilidade dos metais pode aumentar ou diminuir, dependendo das características físico-químicas ambientais.

Na acidificação dos corpos hídricos observa-se que a variação do pH influencia na biodisponibilidade dos metais e consequentemente na sua toxicidade, sendo que em pHs mais baixos observa-se maior toxicidade e pHs mais altos, menor toxicidade. A redução do pH aumenta a quantidade de íons  $\text{H}^+$  que competem com os metais pelos ânions dissolvidos no meio e, consequentemente, aumenta a quantidade de metais livres (biodisponíveis) e sua toxicidade, uma vez que mais metais poderão interagir com os organismos e serão incorporados por eles (PAQUIN et al., 2002) (Figura 6). Além disso, organismos que possuem exoesqueleto calcário tendem a passar por prejuízo adicional, pois suas estruturas contendo  $\text{CaCO}_3$  podem se dissolver porque o  $\text{CO}_3^{2-}$  será usado quimicamente para tamponar a água, evitando queda maior no pH (CHAVES LOPES et al., 2020; MATOZZO et al., 2013).

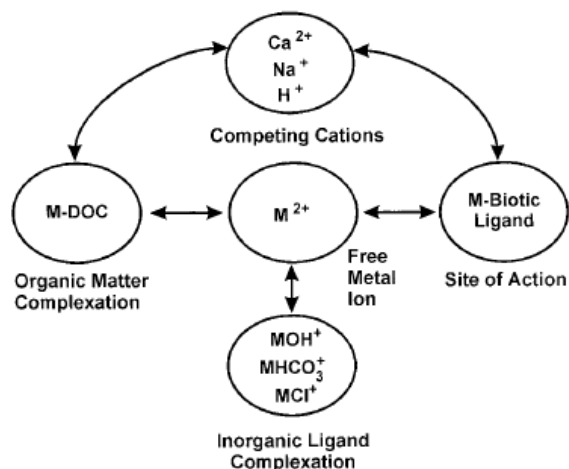


**Figura 5.** Diagrama de processos físico-químicos que influenciam na disponibilidade e assimilação de metais por organismos aquáticos (DI TORO et al., 2001).

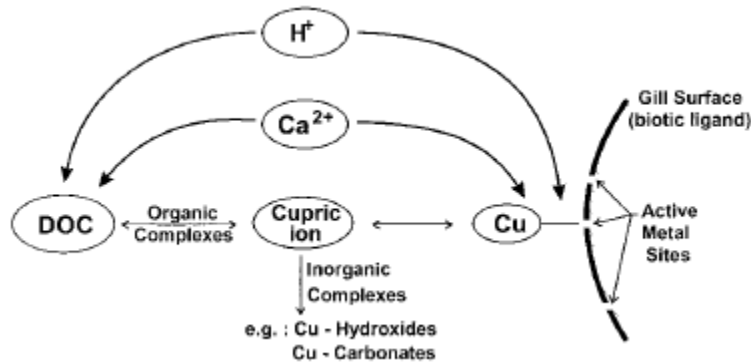


**Figura 6.** Esquema representativo do ligante biótico mostrando a complexação orgânica e inorgânica na água e a interação com um metal (exemplo Cu) e cátions com o ligante biótico. (SANTORE et al., 2001).

Elementos metálicos podem ser bioacumulados por organismos aquáticos através de transferência trófica, onde moluscos, crustáceos e peixes ingerem o plâncton contaminado ou por incorporação direta da água. Os metais Cobre (Cu), Cádmio (Cd), Níquel (Ni), Chumbo (Pb) e o Zinco (Zn) são os mais abundantes na natureza (crosta terrestre e água) (JIANG et al., 2007). O Cd é considerado um metal não-essencial para os animais, e uma exposição em concentrações ambientalmente relevantes, que são bastante reduzidas, pode resultar em efeitos adversos no comportamento, sistema imune e endócrino, no desenvolvimento, crescimento ou reprodução dos (KADIENE et al., 2017). O Zn e o Cu, por sua vez, são metais essenciais para processos bioquímicos. No entanto, em concentrações elevadas, podem se tornar tóxicos (ROBERTS et al., 2013). Os metais Cd, Zn e Cu são incorporados pelos animais aquáticos através dos epitélios de absorção, como as brânquias. Metais essenciais têm locais de incorporação específicos nas brânquias, mas sabe-se que o Cd, Zn e Cu podem competir com elementos como sódio (Na) e Cálcio (Ca), os quais os animais necessitam em grandes quantidades. Assim, na presença de Cd, Zn e Cu, podem ocorrer distúrbios na ionorregulação de Ca e Na, comprometendo significativamente as funções fisiológicas que dependem desses íons. Uma vez incorporados, os metais Cd, Cu e Zn podem causar toxicidade de diversos modos, a presença deles pode resultar numa alta produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) criando um desequilíbrio que conduz ao estresse oxidativo (CAO et al., 2018). Eles também podem reagir com biomoléculas alterando sua morfologia e função, causar desequilíbrio iônico e osmorregulatório, dentre outros efeitos. Por isso que o Cu e os demais metais são considerados tóxicos ionorregulatórios (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009).

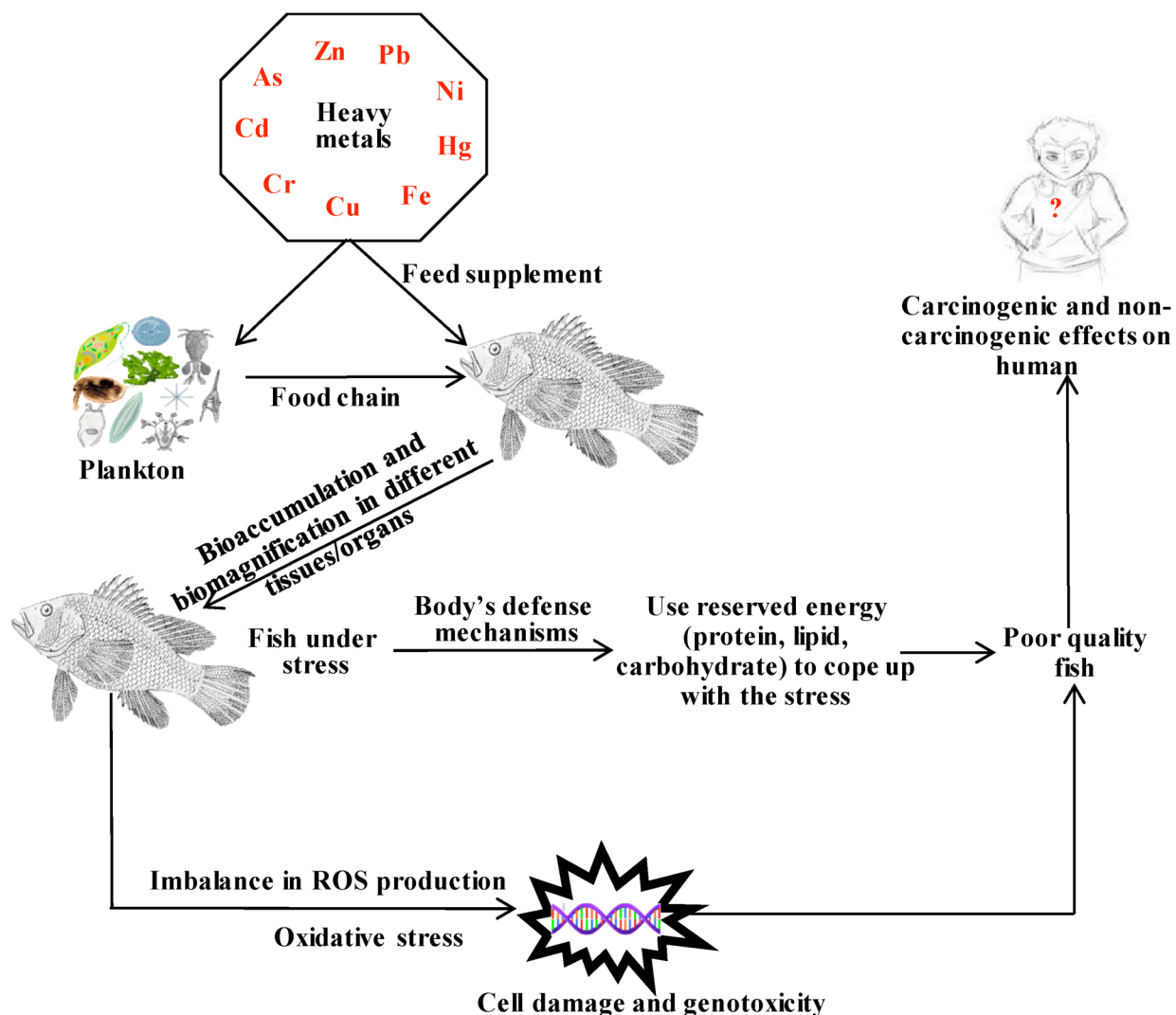


**Figura 7** - Processo de absorção e bioacumulação de metais na cadeia trófica (JAMIL EMON et al., 2023)

O Cu é competidor do magnésio e, como poluente, reduz a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, gerando um desequilíbrio no processo osmorregulatório (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009). A toxicidade do Cu para organismos de água doce tem demonstrado ser dependente de certos parâmetros químicos da água que alteram a sua forma livre e, portanto, biodisponível do metal (SANTORE et al., 2001). Por exemplo, o Cu pode ser influenciado por concentrações de  $\text{H}^+$ . Em ambientes aquáticos com pH em torno de 7,6, cerca de 24% do Cu total encontra-se na forma iônica. Além disso, a presença de compostos carbonatos também pode afetar sua especiação,

devido ao balanço de complexos formados entre os cátions ( $\text{Cu}^+$  ou  $\text{H}^+$ ) com os íons carbonato (ânions) (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009).

O Zn participa no controle da respiração celular, além de atuar no crescimento, desenvolvimento e regeneração dos tecidos (LUKKARI et al., 2005). A toxicidade do Zn para os organismos aquáticos ocorre principalmente porque concentrações subletais desse metal causam hipocalcemia. Isso acontece devido à interferência do  $\text{Zn}^{2+}$  da absorção  $\text{Ca}^{2+}$  pelo canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presente na membrana apical, já que o  $\text{Zn}^{2+}$  possui alta afinidade por esse canal, sendo essa afinidade ainda maior do que a do próprio  $\text{Ca}^{2+}$  (BIANCHINI; MARTINS; JORGE, 2009).

Grande parte dos estudos do ramo da ecotoxicologia e poluição ambiental consideram o Cd e Cu como uns dos principais contaminantes dos rios e oceanos. A toxicidade de Cd na ecologia de copépodes está relacionada com a distorção da proporção sexual, baixa produção de ovos, redução da eclosão de ovos e redução na sobrevivência que afeta o potencial reprodutivo dos copépodes, resultando no decréscimo da população de copépodes (KADIENE et al., 2017). Portanto, o declínio dos copépodes pode resultar em grandes perturbações na estrutura e funcionamento do ecossistema.

Os metais possuem alta persistência nos ambientes aquáticos, o que contribui para a sua contaminação crônica (DELGADO et al., 2023; GERARD, 2014). As concentrações dos metais traço, que são elementos presentes em baixas concentrações no ambiente e nos organismos, não só refletem as entradas por contaminações antropogênicas no ambiente como refletem também a concentração de origem geológica (SANTOS; MOUNIER; MARINS, 2024), neste caso, a concentração de metais varia entre locais (SINGARAM et al., 2023). Por exemplo, no Delta do Rio Parnaíba – Brasil, pesquisadores reportaram concentrações do Zn na média de  $4,1 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$ , e concentrações do Cu na média de  $0,44 \pm 0,13 \mu\text{g/L}$  (SANTOS; MOUNIER; MARINS, 2024). Na Índia já foram reportadas concentrações médias de Zn, Cu e Cd dentro de  $60,91 \pm 34,9 \mu\text{g/L}$ ,  $8,2 \pm 11,5 \mu\text{g/L}$  e  $4,82 \pm 4,3 \mu\text{g/L}$  durante a monção (alternância da direção do vento) e  $48,5 \pm 31,2 \mu\text{g/L}$ ,  $5,08 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$  e  $1,65 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$  durante o período não-monsônico, respectivamente (SAHA et al., 2024). Na Croácia, foram reportadas concentrações dentro de  $0,002 - 0,053 \mu\text{g/L}$  de Cd,  $0,40 - 0,9 \mu\text{g/L}$  de Cu e valores menores que  $7 \mu\text{g/L}$  de Zn (MIJOŠEK et al., 2020). A resolução CONAMA N°357, de 17 de março de 2005 estabelece que a água salobra da classe 1 (que não apresenta efeitos tóxico crônicos a organismos) devem apresentar níveis de  $5 \mu\text{g/L}$ ;  $5 \mu\text{g/L}$  e  $9 \mu\text{g/L}$  de Cd, Cu e Zn respectivamente.

Do ponto de vista de bioacumulação, foram registradas concentrações de Zn, Cu e Cd que variam de 845 – 4942  $\mu\text{g/g}$ , 14,9 – 55,6  $\mu\text{g/g}$  e 2,1 – 12,5  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente em 15 grupos identificados de copépodes (SINGARAM et al., 2023). Como os metais são elementos que não podem ser decompostos em formas mais simples e menos tóxicas (GERARD, 2014), além de persistirem no ambiente, muitas vezes persistem nos organismos de forma a se ver processos de biomagnificação. A biomagnificação é definida como um progressivo processo de bioconcentração de substâncias químicas com o aumento do nível trófico (MATHEWS; FISHER, 2008).

### 1.3. Estuários

Os estuários são comumente conhecidos como ambientes aquáticos continentais que interligam os rios das águas oceânicas. Estão localizados na zona costeira onde ocorre a confluência de águas fluviais e marinhas com capacidade de retenção de nutrientes e intensa atividade biológica tornando-se autênticos viveiros (DUARTE; VIEIRA, 1997). Adicionalmente, os estuários são altamente produtivos, com uma grande quantidade de nutrientes que favorece a produção primária e a diversidade de espécies. Os estuários possuem funções ecológica e econômica simultâneas, pelo fato de providenciarem serviços de valor ecológico e econômico (SCANES; SCANES; ROSS, 2020). No entanto, esses ambientes também estão entre os mais impactados do mundo, devido à forte influência humana sobre sua complexidade (HATJE; ANDRADE, 2009; MIRANDA; CASTRO FILHO; KJERFVE, 2002). Por concentrarem matéria orgânica, os ambientes estuarinos acabam sendo retentores de metais, aos quais os organismos estuarinos são expostos. Estes mesmos organismos também estão sujeitos a enormes tensões osmóticas, que partem das flutuações das marés, enormes entradas de água doce durante inundações e um aumento de salinidade durante a seca. A salinidade não apenas influencia diretamente processos fisiológicos de captação de íons (osmorregulação), mas também há um importante fator influenciador da biodisponibilidade de metais, principalmente pela presença / variação de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) que são complexantes metálicos. Lembramos que este cenário é fortemente afetado por mudanças no pH da água de forma que a sensibilidade dos organismos à acidificação nas zonas estuarinas acaba sendo mais preocupante do que no oceano aberto (HU; CAI, 2013). Foi observado que independentemente da concentração de Cd, a sobrevivência de copépodes tende a ser baixas em alta  $p\text{CO}_2$  (1000  $\mu\text{atm}$ ) em relação a baixa  $p\text{CO}_2$  (400  $\mu\text{atm}$ ) (WEI

et al., 2021). Novos efeitos de acidificação em áreas costeiras podem agravar o potencial de risco de estressores antropogênicos tais como o aumento da concentração de metais-traço (PASCAL et al., 2010). Há também um conhecimento limitado de como a perturbação impacta as emissões de CO<sub>2</sub> e como diferentes tipos geomórficos de estuário modificam qualquer efeito da perturbação (YEO et al., 2024). A alteração de variáveis e qualidade de água, como temperatura, pH e salinidade, podem remodelar criticamente os ecossistemas estuarinos, no entanto como essas variáveis são afetadas pelas mudanças climáticas são mal representados pelos modelos oceânicos regionais (SCANES; SCANES; ROSS, 2020).

Os pequenos estuários com tempos de descarga curtos (dias-semanas) são atualmente fortes fontes de CO<sub>2</sub> para a atmosfera e continuarão a ser assim ou mesmo tornar-se-ão fontes maiores no clima futuro (LI et al., 2023b) (Figura 7). De acordo com os mesmos autores, um exercício futuro útil envolveria a reavaliação dos fluxos estuarinos de CO<sub>2</sub> desses estuários sob níveis mais altos de CO<sub>2</sub> atmosférico e reavaliaria suas contribuições para o orçamento global de carbono no século 21. Por outro lado, prevê-se que grandes estuários eutróficos com longos períodos de descarga (alguns meses) se tornem sumidouros substanciais de CO<sub>2</sub> no clima futuro.

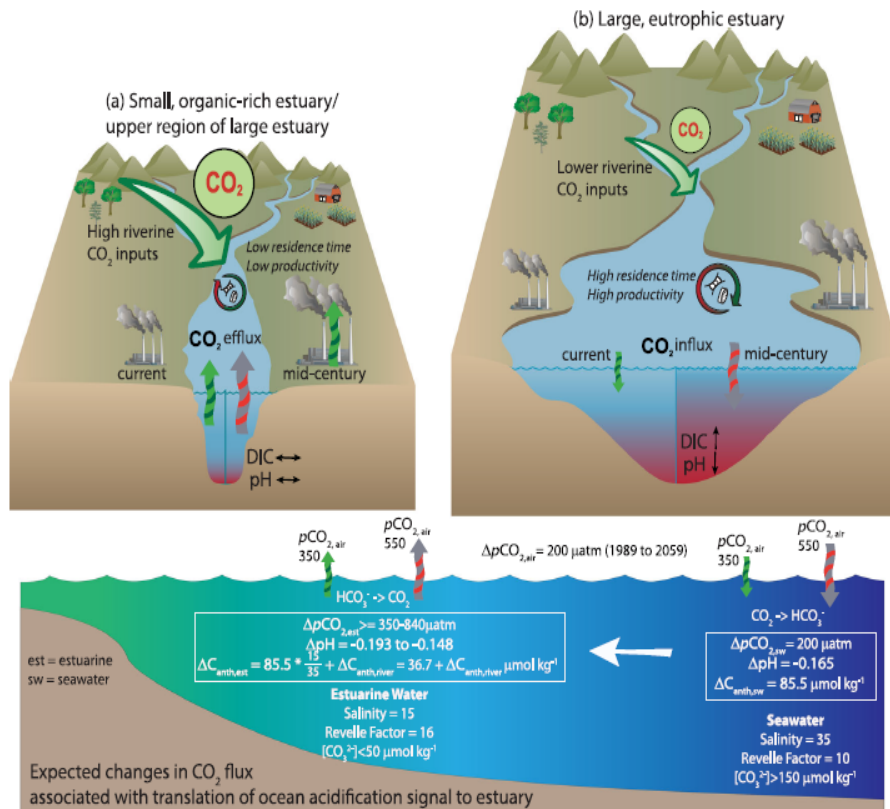


**Figura 8.** Esquema representativo de como os estuários respondem à elevados níveis de CO<sub>2</sub> e às mudanças climáticas (LI et al., 2023b)

#### 1.4. Copépodes (*Nitokra* sp.) e seu uso em ensaios de toxicidade

Invertebrados estuarinos apresentam uma ampla variabilidade no que diz respeito às capacidades osmo e iano-reguladoras (GROSELL et al., 2007). Os copépodes são organismos com ligações tróficas essenciais em teias alimentares marinhas e de água doce. A diferenciação taxonômica dos copépodes baseia-se principalmente na morfologia externa de fêmeas e machos maduros (TELESH et al., 2008). A *Nitokra* sp. foi classificada por REID (1998) como um copépode estuarino pertencente ao Reino Animalia, Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Maxillopoda, Subclasse Copepoda, Ordem Harpacticoida, Família Ameiridae, Gênero *Nitokra* (FENILI, 2012). Harpacticoida é uma das nove ordens da subclasse dos copépodes, com um modo de vida simbiótico em diferentes pontos de sua complexa história evolutiva (HUYS, 2016). Essa ordem envolve pequenos crustáceos com tamanhos que variam de 0,2 a 2,5 mm de comprimento,

sendo a mais importante quantitativamente na ordem dos copépodes dos ecossistemas bentônicos marinhos (SARMENTO; SANTOS, 2012).

Os copépodes dessa ordem são organismos com reprodução sexuada, onde o macho deposita o espermatozoide perto da abertura genital da fêmea (TELESH et al., 2008). O acasalamento, a reprodução e a eclosão dos náuplios ocorrem dentro do saco dos ovos (HUYS, 2016). Quando o desenvolvimento embrionário se completa, a fêmea libera o saco de ovos, e a eclosão ocorre simultaneamente. As larvas resultantes passam por seis estágios naupliares e cinco estágios copepoditos antes de atingirem a maturidade, sendo que a duração do desenvolvimento embrionário depende de muitos fatores, dos quais a temperatura é o mais importante (TELESH et al., 2008). (Figura 8).

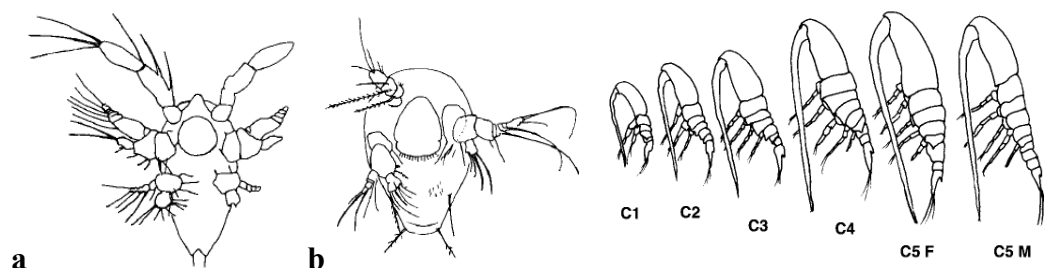


**Figura 9:** Náuplios de copépodes (a e b, respectivamente) e estágio de desenvolvimento de copépodes (C1, C2, C3, C4 e C5) com vista lateral (TELESH et al., 2008).

A *Nitokra* sp. é uma espécie bentônica intersticial, que habita grãos de sedimento, morfologicamente de corpo estreito e vermiforme e com membros na parte do tórax acompanhados por ondulações laterais usados na sua locomoção e seu hábito alimentar é detritívoro (FENILI, 2012). Ela tolera intervalos de salinidade que variam de 5 a 30, e a temperatura ideal de cultivo varia entre 20 e 25 °C.

Os copépodes possuem características que os tornam excelentes modelos biológicos para testes de toxicidade em sedimentos e corpos hídricos (SOUSA, E. C. P. M. et al., 2012). Fatores como tamanho do corpo pequeno, ciclo de vida curto (3 – 4 semanas), grande abundância no ambiente bentônico e facilidade de cultivo em laboratório fazem deles excelentes organismos para estudos ecotoxicológicos sobre aspectos ligados a reprodução e desenvolvimento (LOTUFO; ABESSA, 2002; SOUSA, E. C. P. M. et al., 2012). Neste contexto, LOTUFO e ABESSA (2002)

desenvolveram o protocolo de aplicação intitulado “Teste de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodes bentônicos”, onde o copépode *Nitokra* sp. é indicado como organismo-teste. Desde então, agências e instituições vem usando e indicando este modelo biológico como organismo modelo para testes ecotoxicológico dentro do território brasileiro. Ensaio com espécies locais devem ser reforçados para estabelecer uma base de dados sobre as espécies nativas e são mais representativos do ponto de vista ecológico (TANG et al., 2023). Cabe lembrar que um teste toxicológico consiste em expor organismos em amostras de interesse (líquidas ou sólidas) por um determinado período de tempo e ao final observa-se um efeito negativo a partir do qual a toxicidade é determinada. A expressão dos efeitos tóxicos pode ser variável entre subletal e letal, a depender do ensaio. Especificamente no caso da *Nitokra* sp, fêmeas ovadas (Figura 9) são expostas a amostra (água ou sedimento) e analisa-se a sobrevivência dos adultos e a eclodibilidade dos ovos como parâmetro toxicológico. Os parâmetros do ensaio devem estar dentro de padrões estabelecidos e aceitáveis para espécie (LOTUFO; ABESSA, 2002).



**Figura 10.** Fêmea ovada da espécie *Nitokra* sp. (FENILI, 2012).

Estudos ecológicos consideram estes organismos como indicadores sensíveis de poluição nos ambientes bentônicos (SOUSA, E. C. P. M. et al., 2012), que acumulam metais através de assimilação dos mesmos como alimento ou por via de absorção da água (intestino / estruturas respiratórias) (KADIENE et al., 2019).

Considerando que estuários são ecossistemas vulneráveis à contaminação por metais como Zn, Cu e Cd (CABRAL et al., 2019) e à acidificação provocada pelo aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico, é essencial investigar os efeitos desses estressores em organismos estuarinos, como *Nitokra* sp., Estes ambientes atuam como berçários naturais e zonas de transição influenciadas por diversos

poluentes. Estudos baseados na cinética de bioacumulação, especialmente sob condições ambientais realistas como a acidificação, contribuem para a compreensão dos mecanismos de acúmulo e depuração de metais e de seus impactos sobre processos fisiológicos cruciais, como a regulação de Ca e Na. Tais abordagens fornecem subsídios importantes para prever os efeitos da crescente poluição por CO<sub>2</sub> e estimar a resiliência das comunidades aquáticas frente às mudanças climáticas (ALTAFIM et al., 2023; WANG et al., 2018).

## **2. HIPÓTESES**

Tendo em vista que: (1) os metais variam sua biodisponibilidade em função do pH do meio, sendo que no pH mais baixo estão mais biodisponíveis, (2) os metais competem entre si e com cátions essenciais pelos sítios de incorporação nos organismos; (3) os metais (Cu, Zn e Cd) assimilados pelos organismos podem exercer diferentes efeitos tóxicos, afetando funções biológicas vitais como, por exemplo, a reprodução; (4) os copépodes são organismos sensíveis à presença de contaminantes metálicos, e que (5) a acidificação é prejudicial à formação de estruturas calcárias por reduzir a disponibilidade de carbonatos e dissolver as estruturas para tamponamento do pH, nós formulamos as seguinte hipóteses:

- A maior bioacumulação de metais, ocorrerá em copépodes mantidos em condições de pH reduzido;
- O baixo pH e a presença de metais reduzirão o conteúdo corporal de Ca e Na nos organismos;

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo geral**

- Avaliar a bioacumulação de metais e sua relação com a concentração corporal Ca e Na no copépode estuarino *Nitokra* sp. sob diferentes condições de pH.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar a toxicidade aguda dos metais Cu, Zn e Cd para o copépode *Nitokra* sp. com base na concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) dos animais em exposição em condição de pH da água natural e acidificado predita pelo IPCC (IPCC, 2023);
- Avaliar os efeitos da bioacumulação de Cu, Zn e Cd, em concentrações subletais (CL<sub>10</sub>), em indivíduos adultos de *Nitokra* sp. em diferentes condições naturais e de acidificação da água predita pelo IPCC;
- Comparar a concentração corporal de Ca e Na em *Nitokra* sp. com a presença de metais em condições naturais e de acidificação predita pelo IPCC.

#### 4. REFERÊNCIAS

ALTAFIM, Giam Luca et al. Ocean warming and CO<sub>2</sub>-driven acidification can alter the toxicity of metal-contaminated sediments to the meiofauna community. **Science of the Total Environment**, v. 885, 10 ago. 2023.

BEZERRA, Paulo Sérgio Silva; TAKIYAMA, Luís Roberto; BEZERRA, Cícero Wellington Brito. **Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais**. . [S.l: s.n.]. , 2009

BIANCHINI, A; MARTINS, SEG; JORGE, MB. **O Modelo do Ligante Biótico e suas aplicações em Ecotoxicologia**. . [S.l: s.n.], 2009.

CABRAL, Henrique et al. **Synergistic effects of climate change and marine pollution: An overlooked interaction in coastal and estuarine areas**. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. [S.l.]: MDPI AG. , 1 ago. 2019

CAO, Ruiwen et al. Seawater acidification aggravated cadmium toxicity in the oyster *Crassostrea gigas*: Metal bioaccumulation, subcellular distribution and multiple physiological responses. **The Science of the total environment**, v. 642, p. 809–823, 15 nov. 2018.

CHAVES LOPES, Fernanda et al. Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, 1 set. 2020.

CONTRERAS-PORCIA, Loretto et al. Marine metal pollution and effects on seaweed species. **Systems Biology of Marine Ecosystems**. [S.l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 35–48.

DELGADO, Jéssica de F. et al. Negative Impacts of Trace Metal Contamination on the Macroenthic Communities along the Santos Port Complex—Brazil. **Eng**, v. 4, n. 2, p. 1210–1224, 1 jun. 2023.

DI TORO, D M et al. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 20, n. 10, p. 2383–96, out. 2001.

DONG, Fang et al. Mitigation effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on Cd toxicity to the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Environmental Pollution**, v. 259, p. 113850, abr. 2020.

DUARTE, António A. L. Sampaio; VIEIRA, José M. Pereira. **Caracterização dos Ambientes Estuarinos. Mistura em Estuários**. . Braga,: [s.n.], 1997.

EPA. **Aquatic Life Ambient Freshwater Quality Criteria-Copper 2007 Revision COMPLETE**.2007. Disponível em: <<http://epa.gov/waterscience/criteria/aqlife.html>>. Acesso em: 25 fev. 2025.

FENILI, Livia Huln. **Qualidade do sedimento do canal de navegação do Porto de Santos (Santos, SP) após dragagem de aprofundamento viscana: ensaios ecotoxicológicos com *Tiburonella viscana* e *Nitokra* sp.** . São Paulo: [s.n.], 2012.

GERARD, James E. **PRINCIPLES OF ENVIRONMENTAL CHEMISTRY**. 3rd ed ed. Burlington, MA 01803: [s.n.], 2014.

GHOSH, Anupam. Kinetics of Deposition, Acute Toxicity and Bioaccumulation. 1953.

GIRARD, James E. **Principles Of Environmental Chemistry**. 3rd. ed. Burlington, MA 01803: [s.n.], 2013.

GLIBERT, Patricia M. et al. **Stressing over the Complexities of Multiple Stressors in Marine and Estuarine Systems. Ocean-Land-Atmosphere Research.** [S.l.]: American Association for the Advancement of Science. , 1 jan. 2022

GROSELL, M. et al. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 2, p. 162–172, ago. 2007.

HATJE, Vanessa.; ANDRADE, Jailson B. de. **Baía de todos os santos: aspectos oceanográficos.** [S.l.]: SciELO, 2009.

HU, Xinping; CAI, Wei Jun. Estuarine acidification and minimum buffer zone - A conceptual study. **Geophysical Research Letters**, v. 40, n. 19, p. 5176–5181, 16 out. 2013.

HUYS, RONY. Harpacticoid copepods—their symbiotic associations and biogenic substrata: a review. **Zootaxa**, v. 4174, n. 1, 11 out. 2016.

IPCC. IPCC, 2014. **CLIMATE CHANGE 2014 Synthesis Report Summary for Policymakers**, 2014.

IPCC, 2023. **Climate Change 2023: Synthesis Report, Summary for Policymakers. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.** . [S.l: s.n.], 25 jul. 2023.

JAMIL EMON, Farhan et al. **Bioaccumulation and Bioremediation of Heavy Metals in Fishes—A Review. Toxics.** [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). , 1 jun. 2023

JIANG, Xiao-dong et al. Heavy metal exposure reduces hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment. **Journal of environmental sciences (China)**, v. 19, n. 6, p. 733–7, 2007.

JIN, Peng et al. The Combined Effects of Ocean Acidification and Heavy Metals on Marine Organisms: A Meta-Analysis. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, 23 dez. 2021.

KADIENE, Esther U. et al. Bioaccumulation of metals in calanoid copepods by oral intake. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

\_\_\_\_\_. Differences in lethal response between male and female calanoid copepods and life cycle traits to cadmium toxicity. **Ecotoxicology**, v. 26, n. 9, p. 1227–1239, 1 nov. 2017.

KOMJAROVA, I.; BLUST, R. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 2, p. 81–86, ago. 2009.

KOMJAROVA, I; BLUST, R. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 138–144, 11 nov. 2008.

LI, Ming et al. Projected increase in carbon dioxide drawdown and acidification in large estuaries under climate change. **Communications Earth & Environment**, v. 4, n. 1, p. 68, 13 mar. 2023.

LOPES, Fernanda Chaves et al. Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. **Marine Pollution Bulletin**, v. 158, p. 111401, set. 2020.

LOPES, Taciana Onesorge Miranda et al. A six-year ecotoxicological assessment of the Doce river and coastal marine areas impacted by the Fundão tailings dam failure, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 371, 15 abr. 2025.

LOTUFO, Guilherme; ABESSA, Denis. Testes de toxicidade com sediment total e água intersticial estuarinos utilizando copépodes bentônicos. [S.l: s.n.], 2002. p. 262.

LUKKARI, Tuomas et al. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, v. 30, n. 2, p. 133–146, out. 2005.

MATHEWS, Teresa; FISHER, Nicholas S. Evaluating the trophic transfer of cadmium, polonium, and methylmercury in an estuarine food chain. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1093–101, maio 2008.

MATOZZO, Valerio et al. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Marine Pollution Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 34–40, jul. 2013.

MIJOŠEK, Tatjana et al. The assessment of metal contamination in water and sediments of the lowland Ilova River (Croatia) impacted by anthropogenic activities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 20, p. 25374–25389, 1 jul. 2020.

MIRANDA, Luiz Bruner de; CASTRO FILHO, Belmiro Mendes de; KJERFVE, Bjorn. **Princípios de oceanografia física de estuários**. São Paulo: Edusp, 2002.

PAQUIN, Paul R. et al. The biotic ligand model: a historical overview. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 133, n. 1–2, p. 3–35, set. 2002.

PASCAL, Pierre-Yves et al. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meiobenthic copepods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 12, p. 2201–2208, dez. 2010.

PHILLIPS, Jennifer et al. The Potential for CO<sub>2</sub>-Induced Acidification in Freshwater: A Great Lakes Case Study. **Oceanography**, v. 25, n. 2, p. 136–145, 1 jun. 2015.

RAHLFF, Janina et al. **Short-term responses to ocean acidification: effects on relative abundance of eukaryotic plankton from the tropical Timor Sea**. . [S.l: s.n.]. , 2 maio 2020

ROBERTS, David A et al. Ocean acidification increases the toxicity of contaminated sediments. **Global change biology**, v. 19, n. 2, p. 340–51, fev. 2013.

SAHA, Ajoy et al. Trace metals and pesticides in water-sediment and associated pollution load indicators of Netravathi-Gurupur estuary, India: Implications on coastal pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 199, p. 115950, fev. 2024.

SANTORE, R C et al. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and Daphnia. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 20, n. 10, p. 2397–402, out. 2001.

SANTOS, Thays Thayanne Luz; MOUNIER, Jean Louis Stéphane; MARINS, Rozane Valente. Trace metal partitioning in the parnaíba delta in dry season, equatorial coast of Brazil. **Environmental Pollution**, v. 345, p. 123500, mar. 2024.

SARMENTO, Visnu Cunha; SANTOS, Paulo Jorge Parreira. Species of Harpacticoida (Crustacea, Copepoda) from the phytal of Porto de Galinhas coral reefs, northeastern Brazil. **Check List**, v. 8, n. 5, p. 936, 1 set. 2012.

SCANES, Elliot; SCANES, Peter R.; ROSS, Pauline M. Climate change rapidly warms and acidifies Australian estuaries. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

SINGARAM, Parthasarathi et al. Heavy metals concentration in zooplankton (copepods) in the western Bay of Bengal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 45, p. 101565–101584, 1 set. 2023.

SOUSA, Eduinetty Ceci Pereira Moreira de et al. Review Of Ecotoxicological Studies Of The Marine And Estuarine Environments Of The Baixada Santista (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 62, n. 2, p. 133–147, jul. 2024.

SOUSA, E. C. P. M. et al. Acute Sensitivity to Nitokra sp Benthic Copepod to Potassium Dichromate and Ammonia Chloride. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 1, p. 75–81, 4 abr. 2012.

TAN, Qiao-Guo; WANG, Wen-Xiong. Contrasting patterns of cadmium bioaccumulation in freshwater cladocerans. **Limnology and Oceanography**, v. 56, n. 1, p. 257–267, 24 jan. 2011.

TANG, Zhihua et al. Ecological risk assessment of aquatic organisms induced by heavy metals in the estuarine waters of the Pearl River. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

TELESH, Irena et al. **Zooplankton of the Open Baltic Sea: Atlas**. . [S.l: s.n.], 2008. Disponível em: <<http://www.io-warnemuende.de/research/mebe.html>>.

THOMSEN, Jörn et al. Naturally acidified habitat selects for ocean acidification–tolerant mussels. **Science Advances**, v. 3, n. 4, 7 abr. 2017.

WANG, Minghua et al. Effects of ocean acidification on copepods. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 17–24, mar. 2018.

WEI, Hui et al. CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification increases cadmium toxicity in a marine copepod. **Marine Pollution Bulletin**, v. 173, p. 113145, dez. 2021.

YEO, Jacob Z.Q. et al. High carbon dioxide emissions from Australian estuaries driven by geomorphology and climate. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 1 dez. 2024.

ZAUKE, Gerd-Peter et al. Validation of estuarine gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in semi-controlled toxicokinetic flow-through experiments. **Environmental Pollution**, v. 90, n. 2, p. 209–219, 1995.

ZENG, Xiangfeng; CHEN, Xijuan; ZHUANG, Jie. The positive relationship between ocean acidification and pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 91, n. 1, p. 14–21, fev. 2015.

ZIDOUR, Mahammed et al. Population response of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* to its bioaccumulation of trace metals. **Chemosphere**, v. 220, p. 505–513, 1 abr. 2019.

ZITOUN, Rebecca et al. **Climate change driven effects on transport, fate and biogeochemistry of trace element contaminants in coastal marine ecosystems. Communications Earth and Environment**. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 dez. 2024

## 5. CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido à revista Estuarine, Coastal and Shelf Science

### **How pH Shapes Metal Toxicokinetics: Interplay Between Cd, Cu, Zn, and Ion Regulation in the Estuarine Copepod *Nitokra* sp**

Bolton Armando Nhamussua<sup>1</sup>, Fernanda Chaves lopes<sup>1</sup>, Josiane Araújo de Silva<sup>2</sup>, Patrícia Gomes Costa<sup>2</sup>, Adalto Bianchini<sup>2</sup>, Aline Vecchio Alves<sup>3</sup>, Rodrigo Brasil Choueri<sup>3</sup>. Camila de Martinez Gaspar Martins<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

<sup>3</sup>Departamento de Ciências do Mar. Instituto do Mar. Universidade Federal do São Paulo (Unifesp)

## ABSTRACT

Metal bioaccumulation in aquatic organisms is essential for maintaining adequate levels of trace elements required for vital physiological functions. However, metals, either essential or not, can become toxic when present in excessive concentrations in the water. Variations in the physicochemical properties of the water, such as pH, concentrations of dissolved anions, can influence metal speciation, bioavailability, and toxicity. In particular, under acidic conditions, the bioavailability of metals tends to increase due to a higher proportion of free metal ions, as hydrogen ions ( $H^+$ ) and metal cations compete for binding sites on substances like organic matter and inorganic ligands. This elevated bioavailability may interfere with the uptake of essential macronutrients such as calcium (Ca) and sodium (Na), due to competitive interactions at biotic binding sites. This study aimed to evaluate the toxicity ( $LC_{50}$ ), toxicokinetics (bioaccumulation under  $LC_{10}$  exposure followed by depuration), and the effects on Ca and Na concentrations of cadmium (Cd), copper (Cu), and zinc (Zn) in the estuarine copepod *Nitokra* sp. under two pH conditions: 8.1 (natural) and 7.6 (acidified, as projected by the IPCC, 2023). All metals followed typical dose–response toxicity curves, with Cu being the most toxic, followed by Cd and Zn, with no significant differences between pH levels. Bioconcentration factors (BCFs) were higher at pH 8.1 than at 7.6, contrary to the initial hypothesis that lower pH would enhance metal accumulation due to increased bioavailability. Although metal exposure did not significantly alter Ca and Na concentrations, subtle trends were observed: Ca levels decreased with Cd and Zn exposure, while Cu led to an increase, suggesting early physiological disturbances. In the elimination phase, Ca levels in copepods previously exposed to Cu were higher than those exposed to Cd, although not significantly different from the control. The pronounced effect of Cd points to strong competition with Ca at the cellular level. The acidified pH scenario projected by the IPCC (2023) did not significantly affect the toxicity, bioaccumulation or Na concentration in *Nitokra* sp. during exposure and depuration to Cd, Cu and Zn.

**Keywords:** CO<sub>2</sub>, acidification, Cd, Cu, Zn, bioaccumulation, microcrustacean, toxicity

## 1. INTRODUCTION

Climate change is a global-scale problem caused by human activity. Emissions of greenhouse gases (GHGs) from various sources, including individuals, communities, companies, and nations, accumulate over time and disperse globally, impacting others regardless of origin (IPCC, 2023). The GHGs responsible for global warming are mainly carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) and methane ( $\text{CH}_4$ ). The increase in GHG emissions has resulted in a global temperature rise of  $1.1^\circ\text{C}$  since the pre-industrial period (1850–1900). Between 2011 and 2020, approximately  $2,400 \pm 240$  gigatons of carbon dioxide ( $\text{GtCO}_2$ ) were emitted (IPCC, 2023). The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) predicts that  $\text{CO}_2$  emissions will double from their current levels by the year 2100. An increase in the partial pressure of  $\text{CO}_2$  ( $p\text{CO}_2$ ) causes an increase in  $\text{CO}_2$  dissolving in the water, being the main responsible of the drop in pH and in the carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) saturation status (Zeng et al., 2015). Dissolved  $\text{CO}_2$  reacts with water molecules to form carbonic acid ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), which is unstable and dissociates into bicarbonate ions ( $\text{HCO}_3^-$ ) and hydrogen ions ( $\text{H}^+$ ). The  $\text{HCO}_3^-$  can further dissociate into carbonate ions ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) and additional  $\text{H}^+$  ions. In this way, excessive  $\text{CO}_2$  emissions shift the chemical equilibrium, promoting  $\text{H}^+$  formation and leading to the acidification of aquatic environments.

Acidification is defined as the increase in  $\text{H}^+$  ion concentration in water and, causing a decrease in the pH (Dong et al., 2020). Studies have predicted that ocean surface pH could decrease by 0.3 to 0.4 until 2100 (IPCC, 2023). Although most acidification studies have focused on oceanic environments, it is known that the Great Lakes, located on the border between the United States and Canada, and large estuaries can experience acidification patterns similar to those observed in the oceans (Li et al., 2023; Phillips et

al., 2015). In response to climate change, aquatic species have shifted habitats, behaviors, and interactions (IPCC, 2014).

Another issue affecting aquatic environments is contamination by metals, which have high persistence (Delgado et al., 2023; Girard, 2013). Over the last two decades, urban, industrial, and port development has led to significant pollutant discharges into coastal waters, including estuaries (Sousa et al., 2024). The concentrations of trace metals reflect inputs from anthropogenic contamination (Santos et al., 2024). It is assumed that the toxicity of metals to aquatic organisms results from the reaction of metal ions (free metals) with physiologically active binding sites, forming a biotic metal-ligand complex, with toxicity dependent on accumulation (Di Toro et al., 2001). However, the concentrations of the free (bioavailable) forms of metals are influenced by the physicochemical characteristics of the water (EPA, 2007; Paquin et al., 2002), such as pH, salinity, and complexation with inorganic and organic molecules (Contreras-Porcia et al., 2017)

Metal cations compete with other positively charged elements ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Na^+$ ) for available binding sites with negative charges (Di Toro et al., 2001). It is known that metal ions can compete with calcium ions ( $Ca^{2+}$ ) and sodium ions ( $Na^+$ ) for their uptake sites in organisms, directly influencing their regulation and body distribution. The reduction in pH tend to increase metal bioavailability due to competitive interactions with dissolved ions (cations) present in the environment, thereby enhancing metal toxicity (Paquin et al., 2002). The higher the concentration of  $H^+$  in the medium, the greater the competition with inorganic and organic anions (e.g.,  $OH^-$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $HCO_3^-$ ). This leads to a reduction in metals complexation and, consequently, increasing their bioavailability. Additionally, water acidification compromises the ability of calcium carbonate-dependent biota to activate detoxification processes and to properly develop (Lopes et al.,

2020; Matozzo et al., 2013). Furthermore, organisms with calcareous exoskeletons may suffer further harm, as their structures containing calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) can dissolve for pH buffering. The  $\text{CO}_3^{2-}$  released from the animal's calcarean structures neutralizes  $\text{H}^+$ , preventing a significant drop in water pH (Lopes et al., 2020; Matozzo et al., 2013).

Copepods are essential components of marine and freshwater food webs and accumulate metals through dietary assimilation or direct uptake from water or respiratory structures (Kadiene et al., 2019). Metal bioaccumulation is a critical physiological process that ensures the availability of trace elements necessary for cellular function. However, although naturally present in aquatic environments, trace metals can become toxic at elevated concentrations. In copepods, metal exposure has been associated with reduced reproductive success, including decreased naupliar output, impaired hatching rates, and lower survival (Zidour et al., 2019). Given their sensitivity to environmental contaminants, copepods are recognized as effective bioindicators of metal pollution in benthic ecosystems (Sousa et al., 2024).

Considering that reduced pH increases metal bioavailability, that metals (e.g.,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) can compete with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  at uptake and deposition sites, and that both Ca and Na are functionally important, for biomineralization and osmoregulation, this study aims to investigate toxicity and the bioaccumulation kinetics of cadmium (Cd), copper (Cu), and zinc (Zn) in the estuarine copepod *Nitokra* sp. under different pH conditions driven by  $\text{CO}_2$  increase. Specifically, we assess how pH influences metal accumulation and its relationship with internal  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  concentrations, to better understand part of the physiological mechanisms underlying metal toxicity in acidified estuarine environments.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Test organism

Copepods of the genus *Nitokra* sp. obtained from the culture established in the Toxicology Laboratory at the Institute of Biological Sciences of Federal University of Rio Grande (FURG) were used in toxicity experiments. The cultures were maintained at a density of  $20 \pm 11$  adult individuals per milliliter and were fed three times per week with fish feed dissolved in deionized water and with the microalga *Thalassiosira* sp. Water was renewed every 15 days. The copepods were cultured in ultrapure water adjusted to 17 ppt salinity with Instant Ocean<sup>®</sup> sea salt and maintained in a BOD incubator to ensure constant temperature and photoperiod conditions, which were  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  and 12:12h light: dark, respectively. A laboratory control chart for *Nitokra* sp. was established, and reference assays were periodically conducted, yielding results of  $0.86 \pm 0.13$  mg/L Zn (SO<sub>4</sub>).

### 2.2. Experimental Design

Experimental design followed the one described by Altafim et al. (2023) with adaptations. For both, the acute toxicity tests and metal bioaccumulation tests, the copepod *Nitokra* sp. were exposed separately to different concentrations of Cd, Cu, and Zn at pH 8.1 (natural pH of ocean as well as some estuaries) and 7.6 (the pH predicted by the IPCC considering a drop of 0.5 in the current level; IPCC, 2023) in full factorial design. The pH treatments were divided into plastic boxes, each corresponding to a pH 8.1 and pH 7.6 (Figure 1). Ambient temperature was maintained at  $24^\circ\text{C}$  under a 12:12 h light:dark photoperiod. The exposure media was composed by ultrapure water adjusted to 17 ppt salinity with Instant Ocean<sup>®</sup> sea salt for all tests with or without metals. The pH was reduced by injecting CO<sub>2</sub> into a beaker containing the same water used in the treatments. The CO<sub>2</sub> was infused into the atmosphere of the chamber, thereby being indirectly introduced into the exposure medium of each experimental unit. A very weak aeration, insufficient to cause noticeable movement of the medium, was kept in the beakers. It was necessary to maintain the stability of pH 8.1.

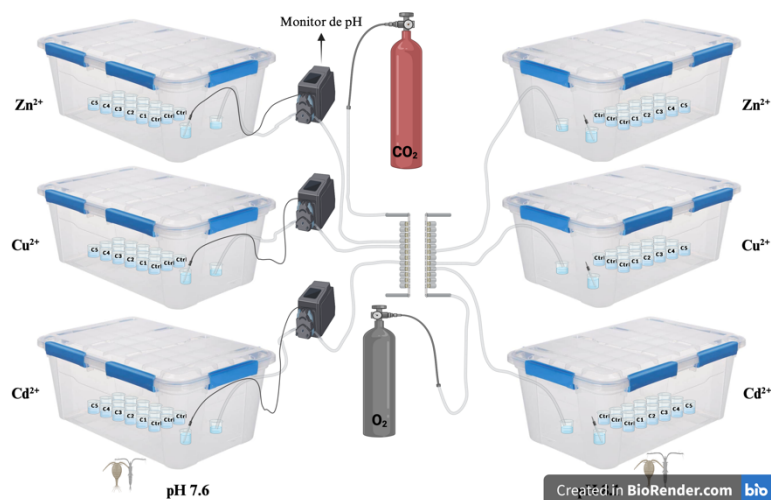


**Figure 1** - Experimental design scheme showing acidification via CO<sub>2</sub> injection

The CO<sub>2</sub> injection and pH control system consists of a series of solenoid valves connected to automatic CO<sub>2</sub> injection monitors, which regulate the CO<sub>2</sub> flow to lower the pH to 7.6, maintaining this level if the pH remains above 7.6. The CO<sub>2</sub> was injected into a separated 100 mL beaker containing 60 mL of water with a salinity of 17 ppm, facilitating the dispersion of CO<sub>2</sub> within the chamber and promoting the indirect introduction of CO<sub>2</sub> into the experimental media in the test vessels. A Hanna brand pH probe, model mini pH controller (BL981411), was placed in another 100 mL glass beaker containing 60 mL of water and a salinity of 17 ppm to monitor and measure the pH during the chamber tests. This electrode informs the pH to turn on or off the opening and closing mechanism of the solenoid valve according to the established pH, in our case 7.6.

### 2.3. Chemical Solutions

The stock solutions of Zn, Cd, and Cu at 10 g/L were prepared zinc sulfate pentahydrate (ZnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), and copper chloride (CuCl<sub>2</sub>) dissolved in ultrapure MiliQ water, respectively. Subsequently, working solutions of 100 mg/L for each metal were prepared and added to the treatment beakers to achieve the desired concentrations depending on the experiment (see sections 2.4 and 2.5).

## 2.4. Acute Toxicity Test

The acute toxicity test was performed using adult *Nitokra* sp. copepods filtered through a 120 µm mesh net at a density of 10 animals per experimental unit (beaker), following the procedure outlined by Lotufo & Abessa (2002) and Kadiene et al (2017). Concentrations of Cd were 0.040, 0.080, 0.150, 0.220, and 0.360 mg/L, concentrations of Cu were 0.015, 0.020, 0.040, 0.220, and 0.440 mg/L, and Zn were 0.250, 0.500, 1, 2, and 4 mg/L, based on the concentrations established by Kadiene et al, (2017) and Zidour et al, (2019). The final volume of the test solution in each beaker was 60 mL, with treatments conducted in triplicate along with a control.

Animal mortality was recorded after 96 h of exposure using a stereomicroscope (Opticam®). Mortality was considered when copepods were immobile or curved in a "V" position. The number of dead animals in each experimental unit was recorded. The test was validated when survival was more than 80% in the negative control following the ASTM protocol designation E1706-19 (ASTM, 2019).

## 2.5. Metal Accumulation and Depuration Test

The toxicokinetic study was conducted in two phases. In the first phase, denoted as the “accumulation phase”, copepods were exposed to Cd, Cu, and Zn for 48 h, at the corresponding LC<sub>10</sub> concentration (see Table 1), estimated in the present study. In fact, we used the average of LC<sub>10</sub> values across both pH level, since no statistically significant differences were observed between pH 8.1 and 7.6 (see Results section). Thus, for the accumulation phase, copepods were exposed to 0.03 mg/L Cd, 0.02 mg/L Cu and 0.39 mg/L Zn. The second phase, called “depuration phase”, commenced immediately following the exposure period and lasted for another 48 h, during which the organisms were maintained in the same medium used previously, but without the addition of metals.

Both phases were conducted at pH levels of 8.1 and 7.6. Additionally, during both the accumulation and depuration phases, copepods were sampled at the following time intervals: 0, 6, 12, 24, and 48 h.

To start this experiment, *Nitokra sp.* specimens present in the culture medium were initially concentrated by filtering them through a 120  $\mu\text{m}$  mesh screen into a 125 mL beaker filled with 100 mL of culture medium (artificial saltwater at 17 ppt). As in the acute toxicity test, only adult copepods were selected. The concentrated *Nitokra sp.* was stirred at 150 rpm to ensure homogenization. Three 1 mL samples were taken for counting the organisms, yielding a count of  $22.10 \pm 10$  copepods/ mL in the experiment with Cd,  $19.7 \pm 6.3$  copepods/ mL in the experiments with Cu, and  $18.4 \pm 4.5$  copepods/ mL in the experiment with Zn. Each experimental unit received 5 mL of adult copepods. Exposures were conducted in glass beakers containing 60 mL of water, with four replicates per treatment.

Each experimental replicate was placed in a separate container to ensure true experimental independence and statistical validity. Thus, it was used four containers maintained at pH 7.6 and four at pH 8.1. Additionally, sampling at each experimental time for both phases was not performed from the same experimental unit (beaker); instead, each beaker was designated for a specific sampling time. Animals of each beaker were sampled by filtration through a 120  $\mu\text{m}$  mesh. Copepods retained in the mesh were then rinsed with an EDTA solution (200  $\mu\text{M}$ ) to remove adsorbed metal, followed by a rinse with distilled water. The organisms were then rinsed again with distilled water in reverse flow to facilitate their transfer from the mesh into a 15 mL Falcon tube, which were centrifuged at 500 x g for 5 min at 4 °C, three times. The supernatant (water used to rinse de animals) were discarded and copepods in the bottom of the tube were resuspended in 1 mL of distilled water and transferred to 2 mL cryogenic tubes for

subsequent processing and ion analysis, as described in the following section. It is worth saying that each metal exposure was run independently, with its control, and the sampling size at each experimental time, regardless of the experimental phase, consisted of 4 pools of *Nitokra* sp. Analyses in pools sampled along the experiment included the specific exposure metal as well as Ca and Na.

## 2.6. Ion Analysis

Pools of copepods were dried for 24 h in an oven at 60 °C, weighted (dry weight), and then completely digested with 500 µL of 65% (SupraPur®) nitric acid (HNO<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Germany) for another 24 h at 60 °C. The final volume of each digested sample was adjusted to 1 mL by adding high-purity ultrapure water (resistivity of 18.2 MΩ cm) (Aquapur Evolution AQ3000, Permution, Curitiba, PR, Brazil). The samples of biota were then appropriately diluted (five times) before analysis, while the sample water was not diluted.

Water samples (10 mL) were collected from the acute toxicity (three replicates) and toxicokinetic (accumulation and depuration, four replicates each) tests for metal concentration analysis. For the toxicity tests, samples were taken from the control, lowest, and highest metal concentrations at 0 h and 96 h. For the toxicokinetic tests, samples were taken at the beginning and end (0 h and 48 h) of both the accumulation and depuration phases. The samples were filtered using a 10 mL syringe and a syringe filter with a 0.45 µm. To preserve the metals in the water samples, they were acidified with 1% nitric acid (HNO<sub>3</sub>) and stored at 4 °C for later metal analysis.

Determination of metals, Ca e Na was performed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Plasma Quant MS Q, Analytik Jena, Jena, Germany). ICP-MS parameters were adjusted as follows: radio frequency (RF) power:

1300 W; plasma (argon) flow: 15 L min<sup>-1</sup>; auxiliary flow: 1.2 L min<sup>-1</sup> argon flow in the nebulizer: 0.42 L min<sup>-1</sup>; replicate readings: 5; dwell time: 50 ms; and detector operation mode: dual mode. Yttrium-89 (89Y<sup>+</sup>) was used as an internal standard. The following isotopes and respective gases were employed for metal quantification: 114Cd[H<sub>2</sub>], 65Cu [He], 66Zn[H], 44Ca, and 23Na. Concentrations were determined based on calibration curves built for each element analyzed, using a serial dilution of a multielement standard (1000 mg L<sup>-1</sup>) solution (Merck, Darmstadt, Germany). Coefficients of determination (R<sup>2</sup>) of the calibration curves were 0.999675 (Cd), 0.999842 (Cu), 0.999937 (Zn), 0.999945 (Na), and 0.999914 (Ca).

Quality assurance and control comprised the regular analysis of blanks and spiked matrices, as well as of a certified reference material (CRM) for fish protein (DORM-5) from the National Research Council Canada (Ottawa, Canada). Mean recovery rates for metals analyzed in the CRM corresponded to 91% (Cd), 87% (Cu), 82% (Zn), 84% (Ca) and 90% (Na). It is worth mentioning that, for most residue analytical method guidelines, an acceptable recovery range is 70% to 120% or 70%–110%, depending on the regulatory guideline (Schoenau, 2019). The limit of detection (LOD) was calculated as three times the standard deviation (SD) value of the blank signals ( $3 \times \text{SD}$ ;  $n = 10$ ). The LOD corresponded to 0.0014, 0.057, 0.21, 0.020, and 0.034  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Cd, Cu, Zn, Ca, and Na, respectively. The limit of quantification (LOQ) was ten times the SD value of the blank signals ( $10 \times \text{SD}$ ;  $n = 10$ ). The LOQ was 0.0047, 0.19, 0.71, 0.065, and 0.112  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Cd, Cu, Zn, Ca, and Na, respectively. Results of biota are expressed as  $\mu\text{g/mg}$  dry weight, and results of water are expressed as  $\text{mg/L}$ .

## 2.7. Measurements of physicochemical parameters and carbonate speciation

Physicochemical parameters, including temperature, dissolved oxygen, pH, salinity, and conductivity, were measured daily throughout the toxicity and metal accumulation and depuration test using a multiparameter probe (Graigar AZ86031 handheld IP67 Combo series). Total alkalinity was measured only at the beginning and end of the acute toxicity test, whereas in the accumulation and depuration test, it was measured daily. Total alkalinity for each pH ( $n=4$  *per* pH) was determined using the method described by Sarazin et al. (1999). This method involves preparing a reaction solution containing formic acid ( $\text{HCOOH}$ , 0.1 M), bromophenol blue (500 mg/L), and sodium chloride ( $\text{NaCl}$ , 2 M). Then, 2 mL of this solution was mixed with 2 mL of a water samples from the experiment and 2 mL of sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) at concentrations ranging from 0.75 mM to 3.25 mM, which were used to construct the standard curve. After gentle shaking, the samples were transferred to a microplate, and absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (BioTek EL808). The carbon chemical species were calculated based on salinity, temperature, total alkalinity (TA), and pH using an Excel macro programmed with CO<sub>2</sub>SYS. The calculations utilized the constants from Mehrbach et al. (1973), adjusted by Dickson & Millero (1987), and the KSO<sub>4</sub> constant from Dickson (1990).

## 2.8. Statistical analysis

The LC<sub>50</sub> (median lethal concentration for 50% of the organisms) and LC<sub>10</sub> (median lethal concentration for 10% of the organisms) for each metal were estimated using the Trimmed Spearman-Kärber test at a 95% confidence interval after the chi-square test was greater than 0.05, following ASTM protocol designation E1706-19 (ASTM, 2019). Similarly, toxicity curves for each treatment were generated using the R-Studio program and algorithms from the *drc* package. The Welch's t-test was used to

evaluate the presence or absence of significant differences in toxicity ( $LC_{50}$ ) and the concentration of each metal in water at pH levels 8.1 and 7.6, employing a 95% significance level. This analysis was carried out after the data normality assumptions (Shapiro-Wilk test) and residual correlation (Durbin-Watson test) were unmet. The toxicokinetic models were developed based on first-order kinetics, using the following equation:

$$\frac{dC_p(t)}{dt} = K_a \times C_w - K_d \times C_p(t) \text{ for } 0 < t < t_c$$

or

$$\frac{dC_p(t)}{dt} = -K_d \times C_p(t) \text{ for } t > t_c$$

where  $t$  is time (h),  $t_c$  represents the duration of the accumulation phase (h),  $C_p$  is the internal concentration of the metal ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ),  $C_w$  is the concentration of the metal measured in water ( $\text{mg}/\text{L}$ ),  $K_a$  is the uptake rate constant, and  $K_d$  is the depuration rate constant ( $\text{h}^{-1}$ ).

The bioaccumulation factor ( $BCF_k$ ) was determined using a kinetic approach, based on uptake and depuration rate constants derived from toxicokinetic modeling using absorption rates ( $K_u$ ) and elimination rates ( $K_e$ ) in the following formula:

$$BCF_k = \frac{k_u}{k_e}$$

The steady-state method was utilized to calculate the bioconcentration factor ( $BCF_{ss}$ ):

$$BCF_{ss} = \frac{C_p}{C_w}$$

As Ratier et al. (2022) explained, the corresponding toxicokinetic (TK) model was constructed automatically using algorithms implemented in the `rbioacc` package in R-Studio. These algorithms included fitting a single-compartment generic TK model to the

raw data, estimating the time required for 95% elimination of the chemical, calculating the goodness-of-fit (GoF), and calculating summary statistics of the distribution (e.g., median).

A two-way analysis of variance (ANOVA) was performed at a 95% confidence level for both the accumulation and depuration phases. It was structured as follows:  $Y = \mu + \alpha + \beta + \alpha\beta + \varepsilon_{ij}$ , where  $Y$  is the concentration of metals (Ca and Na) in the organism,  $\mu$  is the overall mean,  $\alpha$  is the effect of pH,  $\beta$  is the effect of metal treatment (including control),  $\alpha\beta$  is the interaction between pH and metal treatment, and  $\varepsilon_{ij}$  is the residual error. Datasets that met the requirements of homoscedasticity of residuals, autocorrelation, and normality were used for the ANOVA analysis. Significant variables identified in the ANOVA tests were subsequently evaluated using the Tukey *post hoc* test ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3. RESULTS

#### 3.1. Acute toxicity of Zn, Cu, and Cd in different pHs

The  $LC_{50}$  and  $LC_{10}$  and respective confidence intervals were estimated for Cd, Cu, and Zn at both pHs (8.1 and 7.6) and are presented in Table 1. All metals exhibited a typical toxicity curve pattern, as shown in Figure 2. Based on the toxicity values, Cu was the most toxic metal to *Nitokra* sp., followed by Cd and then Zn at both pHs. Furthermore, no statistically significant differences in toxicity were observed between pH 8.1 and 7.6. Nevertheless, a trend was noted in which Cu toxicity decreased and Cd toxicity increased under acidified conditions.

Figure 2 presents the dose–response profiles for the toxicity tests with Cd, Cu, and Zn, fitted using the log-logistic model. The adjustment applied was consistent across all assays.

**Table 1** - Values of LC<sub>50</sub> and LC<sub>10</sub> (mg/L), and the lower and upper limit, for Zn, Cd, and Cu for *Nitokra sp.* at pH 8.1 and 7.6. Toxicity values were estimated using the Trimmed Spearman-Kärber method.

| pH                      | 8.1         |              |               | 7.6         |               |               |
|-------------------------|-------------|--------------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| Metal                   | Zn          | Cu           | Cd            | Zn          | Cu            | Cd            |
| LC <sub>50</sub> (mg/L) | 0.71        | 0.029        | 0.307         | 0.78        | 0.086         | 0.121         |
|                         | (0.63-0.80) | 0.023-0.333) | (0.159-0.456) | (0.61-0.95) | (0.045-0.128) | (0.085-0.157) |
| LC <sub>10</sub> (mg/L) | 0.43        | 0.015        | 0.041         | 0.35        | 0.030         | 0.020         |

Table 2 shows the mean concentrations of metals present in the water from the acute toxicity test. Overall, the measured concentrations closely matched the nominal concentrations used in the experiment.

**Table 2** - Mean concentrations  $\pm$  standard error of metals measured in water samples (n=3) from the acute toxicity. The average represents water sampled at the beginning and at the end of the experiment (96 h). Water was sampled from control, low, and high concentration testes for each metal. The “< LOQ” represents values below the Limit of Quantification of the method (see section 2.6).

| Metal concentration in water samples (mg/L) |              |                    |                   |                    |
|---------------------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| pH                                          | Treatment    | Cd                 | Cu                | Zn                 |
| 8.1                                         | Control      | 0.003 $\pm$ 0.004  | 0.001             | <LOQ               |
|                                             | Lower conc.  | 0.087 $\pm$ 0.001  | 0.014 $\pm$ 0.006 | 0.232 $\pm$ 0.016  |
|                                             | Higher conc. | 0.284 $\pm$ 0.01   | 0.596 $\pm$ 0.150 | 1.898 $\pm$ 0.753  |
| 7.6                                         | Control      | 0.002 $\pm$ 0.0002 | <LOQ              | 0.001 $\pm$ 0.0002 |
|                                             | Lower conc.  | 0.024 $\pm$ 0.003  | 0.016 $\pm$ 0.003 | 0.116 $\pm$ 0.108  |
|                                             | Higher conc. | 0.226 $\pm$ 0.0245 | 0.702 $\pm$ 0.135 | 2.442 $\pm$ 0.3371 |

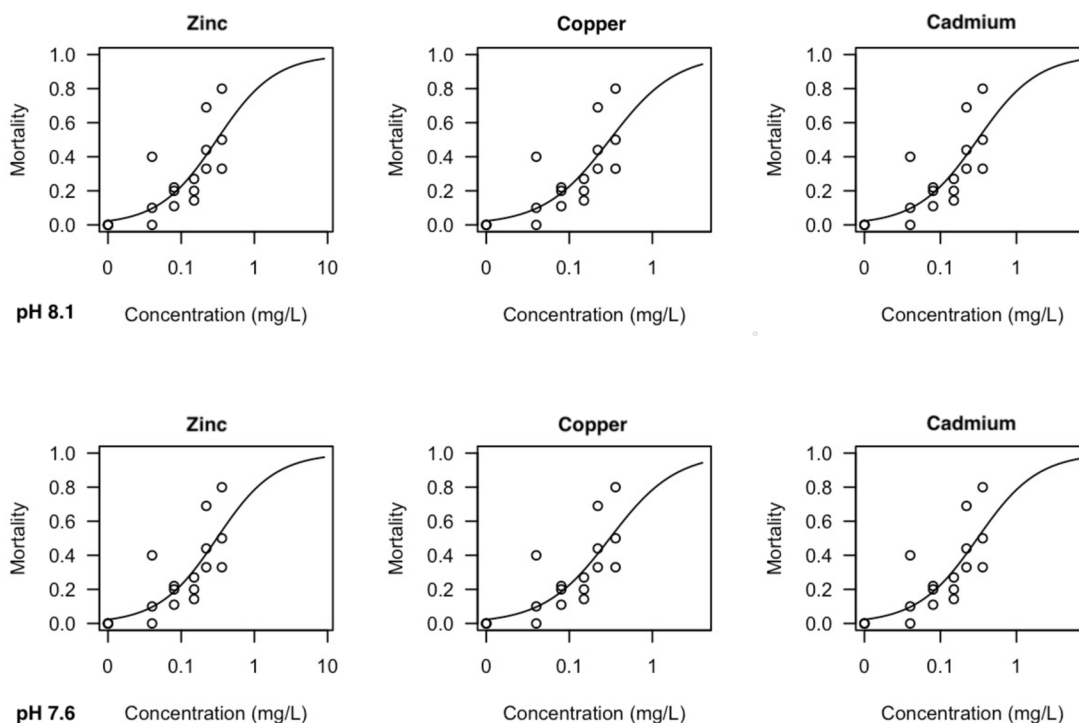


**Figure 2** - Acute toxicity curves (log-logistic) for Zn, Cu, and Cd at pH 8.1 and pH 7.6 for *Nitokra* sp.

### 3.2. Toxicokinetics

Figure 3 presents the probability distribution of bioaccumulation metrics for Cd, Cu, and Zn during both the accumulation (0–48 h) and depuration (48–96 h) phases. All metals were bioaccumulated during the 48-h exposure period. Cd and Zn exhibited similar accumulation and depuration trends under both pH conditions, although Zn showed a proportionally higher elimination rate than Cd. Cu reached apparent saturation within 24 h, earlier than the other metals. Notably, at pH 8.1, Cu was more efficiently eliminated, with concentrations returning to near-initial levels, unlike the patterns observed at pH 7.6 and for the other metals.

After 48 h of exposure to Cd, Cu, and Zn at pH 7.6, the estimated time required for 95% elimination of each metal from the animals was 132.2, 59.8, and 72.3 h for Cd, Cu, and Zn, respectively (Figure 3A, 3B, and 2C). In contrast, at pH 8.1, the corresponding elimination times were estimated as 163.1, 30.8, and 98 h for Cd, Cu, and Zn, respectively (Fig. 3D, 3E, and 3F).

Table 3 shows the concentration of metals in the media over the accumulation and depuration phase, and Table 4 shows the bioconcentration factor (BCF<sub>ss</sub>) which was calculated by dividing the mean concentration of metals in pooled copepod samples (C<sub>p</sub>, µg/mg) and the mean metal concentration in the water (C<sub>w</sub>, mg/L). The BCF<sub>ss</sub> values ranged from approximately 13 for Zn to 30 for Cu, indicating the great potential of copepods in accumulating metals. Cu was the most bioaccumulated metal. Under reduced pH (7.6), overall bioaccumulation declined, suggesting a pH-dependent effect on metal uptake: Cu accumulation was 1.3-fold lower and Zn accumulation 1.6-fold lower under acidified conditions.

Table 5 presents the bioconcentration factor (BCF<sub>k</sub>) estimated from probability distributions. Summary statistics include the 95% uncertainty interval, with the central tendency represented by the median (50th percentile). The estimated BCF<sub>k</sub> values were generally consistent with the measured values and were lower at pH 7.6 compared to pH 8.1 for both Cd and Zn. For Cu, BCF<sub>k</sub> values were similar between pH levels. The uptake constant (k<sub>u</sub>) was slightly higher at pH 8.1 than at pH 7.6 for all tested metals.

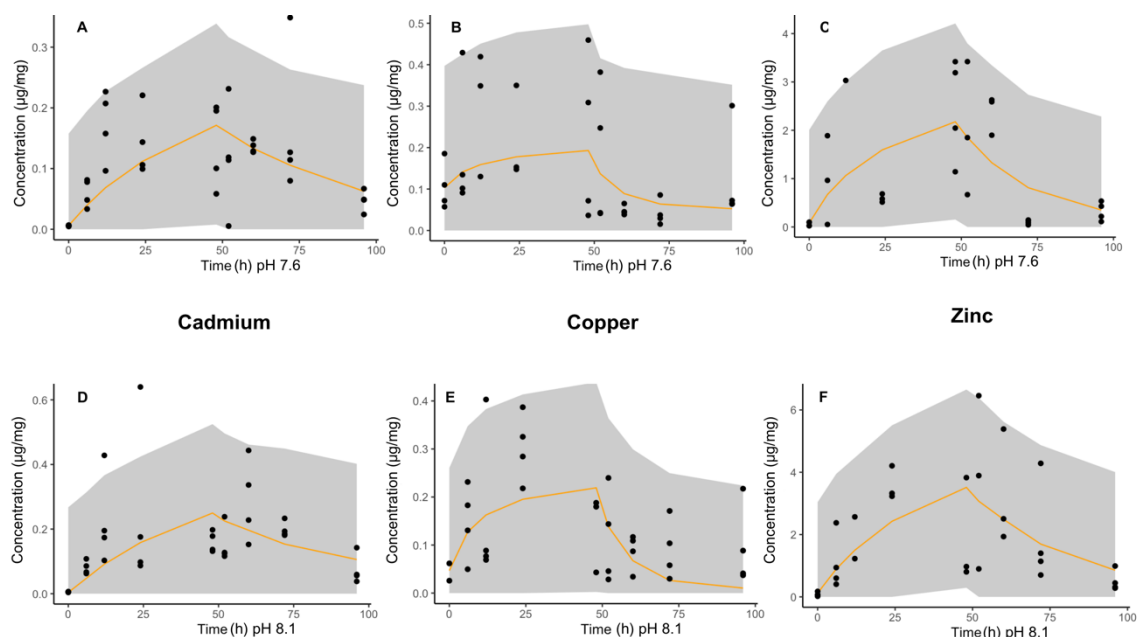


**Figure 3** - Profile of accumulation (0–48 h) and depuration (48–96h) of Cd, Cu, and Zn at pH 7.6 (graphs A-C) and pH 8.1 (graphs D-F) by the *Nitokra* sp. Concentrations of Cd, Cu, and Zn over the exposure period (0 – 48 h) were: 0.03, 0.02, and Zn 0.39 mg/L, respectively. Black dots represent each pool (n=4), yellow curves indicate the predicted median values, and the shaded gray areas represent the 95% uncertainty intervals. Graphs were generated with the **rbioacc** package.

**Table 3** - Concentration of metals in water from the accumulation-depuration experiment with *Nitokra* sp. Data are presented as mean  $\pm$  standard error. The “< LOQ” represents values below the Limit of Quantification of the method (see section 2.6).

| Experimental condition | pH  | Sample time | Metal concentration (mg/L) |                 |         |                 |                 |                   |
|------------------------|-----|-------------|----------------------------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-------------------|
|                        |     |             | Control                    | Cd              | Control | Cu              | Control         | Zn                |
| Acumulation            | 8.1 | 0 h         | < LOQ                      | 9.41 $\pm$ 2.99 | < LOQ   | 19.9 $\pm$ 0.33 | < LOQ           | 65.5 $\pm$ 14.88  |
|                        |     | 48 h        | < LOQ                      | 6.24 $\pm$ 0.48 | < LOQ   | 10.7 $\pm$ 2.30 | 17.2 $\pm$ 3.52 | 278.4 $\pm$ 15.89 |
|                        | 7.6 | 48 h        | < LOQ                      | 4.45 $\pm$ 0.15 | < LOQ   | 19.3 $\pm$ 0.25 | 12.7 $\pm$ 2.70 | 299.5 $\pm$ 8.44  |
| Depuration             | 8.1 | 0 h         | < LOQ                      | < LOQ           | < LOQ   | 21.7 $\pm$ 1.21 | < LOQ           | < LOQ             |
|                        |     | 48 h        | < LOQ                      | < LOQ           | < LOQ   | 20.6 $\pm$ 0.96 | < LOQ           | 35.8 $\pm$ 8.07   |
|                        | 7.6 | 0 h         | < LOQ                      | < LOQ           | < LOQ   | 19.3 $\pm$ 0.45 | < LOQ           | < LOQ             |
|                        |     | 48 h        | < LOQ                      | < LOQ           | < LOQ   | 19.7 $\pm$ 0.44 | < LOQ           | < LOQ             |

**Table 4** - The steady-state bioconcentration factor (BCF<sub>ss</sub>) was calculated as the ratio between the mean concentration of metals in pooled copepod samples (C<sub>p</sub>, µg/mg) and the mean metal concentration in the water (C<sub>w</sub>, mg/L).

|                        | pH 8.1 |       |       | pH 7.6 |       |       |
|------------------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| Metals                 | Cd     | Cu    | Zn    | Cd     | Cu    | Zn    |
| C <sub>p</sub> (µg/mg) | 0.161  | 0.459 | 3.753 | 0.139  | 0.458 | 2.449 |
| C <sub>w</sub> (mg/L)  | 0.008  | 0.015 | 0.172 | 0.007  | 0.020 | 0.182 |
| BCF <sub>ss</sub>      | 20.13  | 30.03 | 21.83 | 19.86  | 22.9  | 13.46 |

**Table 5** - Toxicokinetic parameters and bioconcentration factors (BCF<sub>k</sub>) estimated for Cd, Cu, and Zn in *Nitokra sp.*, including uptake rate constant (k<sub>u</sub>), elimination rate constant (k<sub>e</sub>), and time to 95% depuration (t<sub>95%</sub>).

|                       | pH 8.1 |       |        | pH 7.6 |       |       |
|-----------------------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Metals                | Cd     | Cu    | Zn     | Cd     | Cu    | Zn    |
| K <sub>u</sub> (µg/h) | 0.336  | 0.946 | 0.357  | 0.261  | 0.488 | 0.272 |
| K <sub>e</sub> (µg/h) | 0.018  | 0.097 | 0.03   | 0.023  | 0.048 | 0.041 |
| t <sub>95%</sub> (h)  | 162.35 | 31    | 100.54 | 130.41 | 61.5  | 72.82 |
| BCF <sub>k</sub>      | 18.95  | 9.76  | 12.17  | 11.77  | 10.03 | 6.77  |

Figure 4 presents the concentrations of Ca and Na in copepod pools following 48 h of exposure to Cd, Cu, and Zn (accumulation phase), while Figure 5 displays the concentrations after a subsequent 48 h depuration phase. No significant differences were detected in Na concentrations in *Nitokra sp.* across treatments or pH levels in either phase of the experiment (Figures 4B and 5B). As shown in Figure 4A, neither metal exposure

nor pH significantly affected Ca concentrations during the accumulation phase. However, during the depuration phase (Figure 5A), although pH had no significant effect, copepods previously exposed to Cu exhibited higher Ca concentrations than those exposed to Cd.

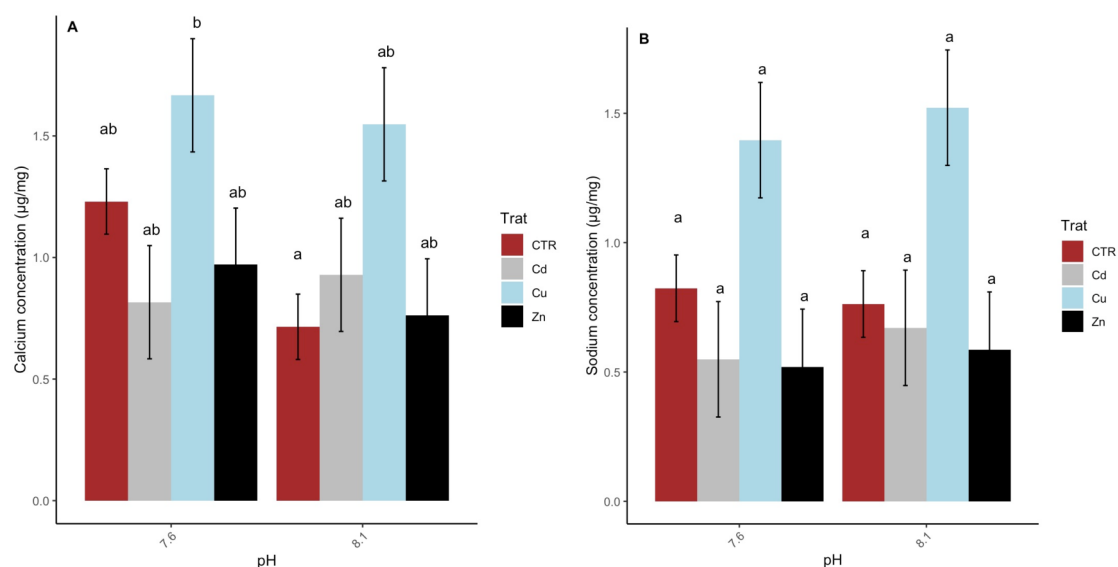


**Figure 4** - Mean  $\pm$  standard error concentrations of calcium (A) and sodium (B) in *Nitokra* sp. pools ( $n = 4$ ) following 48 h of exposure to equipotent  $LC_{10}$  concentrations of Cd (0.03 mg/L), Cu (0.02 mg/L), and Zn (0.39 mg/L) at pH 7.6 and 8.1. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g/mg}$  dry weight. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ), as determined by two-way ANOVA.

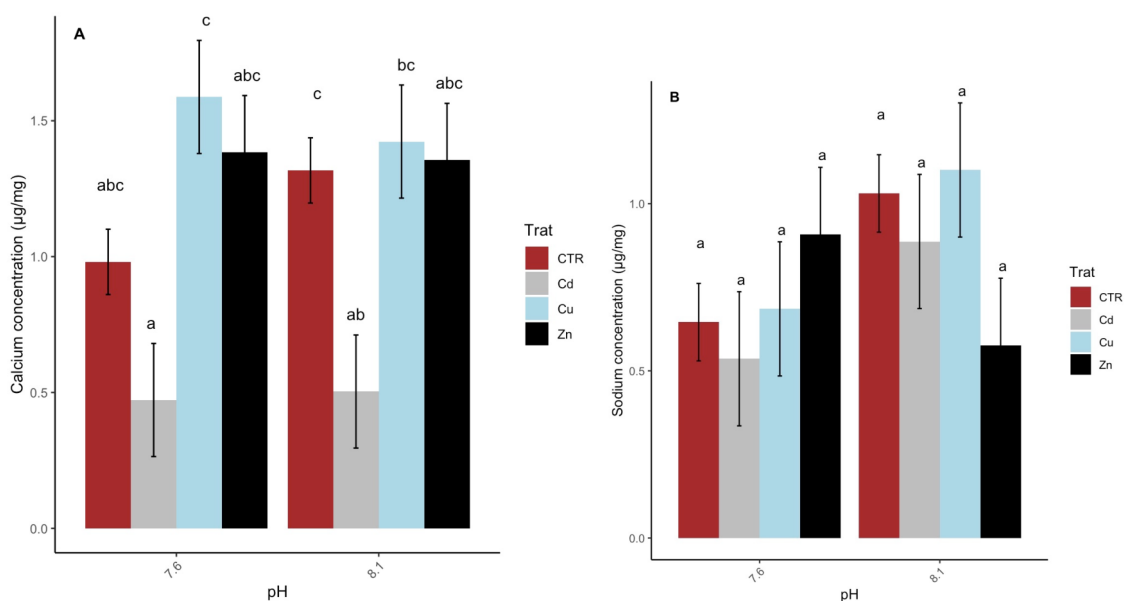


**Figure 5** - Mean  $\pm$  standard error concentrations of calcium (A) and sodium (B) in *Nitokra* sp. pools ( $n = 4$ ) at 48 h of depuration from exposure to equipotent  $LC_{10}$  concentrations of Cd (0.03 mg/L), Cu (0.02 mg/L), and Zn (0.39 mg/L) at pH 7.6 and 8.1. Concentrations are expressed in  $\mu\text{g/mg}$  dry weight. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ), as determined by two-way ANOVA.

### 3.2. Physical-chemical parameters

Table 6 presents the physicochemical parameters measured during both the acute toxicity and toxicokinetic assays, and Table 7 presents the carbon chemical species. Mean values for each parameter were calculated by pooling data from both experiments.

**Table 6** - Physicochemical parameters measured during both toxicity test (Acute test and toxicokinetic assays). Mean values  $\pm$  standard error for each parameter were calculated by pooling data from both experiments. The abbreviations correspond to the parameters temperature (T °C), dissolved oxygen (DO), pH, salinity (S‰), and electrical conductivity (EC).

| Test         | Fase    | pHs         | 8.1            |                |                |                | 7.6            |                |
|--------------|---------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|              |         | Metal       | Zn             | Cu             | Cd             | Zn             | Cu             | Cd             |
| Acute Test   | initial | T °C        | 23.3 $\pm$ 0.2 | 23.3 $\pm$ 0.2 | 22.4 $\pm$ 0.3 | 22.7 $\pm$ 0.1 | 22.2 $\pm$ 0.1 | 24.2 $\pm$ 0.1 |
|              |         | DO          | 5.7 $\pm$ 0.1  | 5.6 $\pm$ 0.2  | 3 $\pm$ 0.1    | 6.2 $\pm$ 0.2  | 6.2 $\pm$ 0.1  | 4.1 $\pm$ 0.1  |
|              |         | pH          | 8 $\pm$ 0.2    | 8.1 $\pm$ 0.1  | 7.9 $\pm$ 0.1  | 7.4 $\pm$ 0.2  | 7.5 $\pm$ 0.1  | 7.4 $\pm$ 0.1  |
|              |         | S‰          | 17.6 $\pm$ 0.1 | 17.7 $\pm$ 0.1 | 17.6 $\pm$ 0.2 | 16.9           | 16.9           | 17. $\pm$ 0.1  |
|              |         | EC (mS/ cm) | 27.7 $\pm$ 0.1 | 27.8 $\pm$ 0.1 | 27.6 $\pm$ 0.4 | 26.8 $\pm$ 0.1 | 26.7           | 27.1 $\pm$ 0.1 |
|              | Final   | T °C        | 21 $\pm$ 1.3   | 21.4 $\pm$ 0.4 | 19.2 $\pm$ 0.5 | 22.6 $\pm$ 0.2 | 23.1 $\pm$ 0.4 | 25.8 $\pm$ 0.4 |
|              |         | DO          | 4.25 $\pm$ 0.1 | 4.4 $\pm$ 0.5  | 3.2 $\pm$ 0.1  | 6.2 $\pm$ 0.1  | 5 $\pm$ 0.2    | 4.9 $\pm$ 0.1  |
|              |         | pH          | 7.95 $\pm$ 0.1 | 8 $\pm$ 0.1    | 7.8 $\pm$ 0.2  | 7.5 $\pm$ 0.1  | 7.6 $\pm$ 0.2  | 7.6 $\pm$ 0.2  |
|              |         | S‰          | 17.9 $\pm$ 0.1 | 17.9 $\pm$ 0.2 | 18.1 $\pm$ 0.1 | 17.2 $\pm$ 0.1 | 17.5 $\pm$ 0.6 | 18.2 $\pm$ 0.1 |
|              |         | EC (mS/ cm) | 28.1 $\pm$ 0.1 | 28.2 $\pm$ 0.3 | 28.4 $\pm$ 0.1 | 27.1 $\pm$ 0.3 | 27.6 $\pm$ 0.8 | 28.5 $\pm$ 1.3 |
| Chronic Test |         | T °C        | 25.03          | 24.32          | 24.8           | 25.59          | 24.41          | 25             |
|              |         | DO          | 5.33           | 5.36           | 4.75           | 4.7            | 5.31           | 4.55           |
|              |         | pH          | 8.03           | 8.08           | 8.13           | 7.64           | 7.51           | 7.58           |

|                    |       |       |       |       |       |       |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>S‰</b>          | 18.6  | 18.45 | 18.35 | 17.75 | 17.78 | 18    |
| <b>EC (mS/ Cm)</b> | 29.14 | 28.93 | 28.81 | 27.97 | 28    | 28.28 |

**Table 7** - The carbonate speciation system was assessed from acute toxicity and toxicokinetic tests. Mean values for each parameter were calculated by pooling data from both experiments. Abbreviations represent total alkalinity (TA), partial pressure of carbon dioxide ( $p\text{CO}_2$ ), bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ), and calcite ( $\Omega$  Ca) and aragonite ( $\Omega$  Ar) saturation state. Sampled values are the average of 4 samples per pH.

| <b>pH</b>  | <b>Metal</b> | <b>TA</b>                | <b>pH</b> | <b><math>p\text{CO}_2</math></b> | <b><math>\text{HCO}_3^-</math></b> | <b><math>\text{CO}_3^{2-}</math></b> | <b><math>\text{CO}_2</math></b> | <b><math>\Omega</math> Ca</b> | <b><math>\Omega</math> Ar</b> |
|------------|--------------|--------------------------|-----------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|            |              | ( $\mu\text{mol/kgSW}$ ) |           | ( $\mu\text{atm}$ )              | ( $\mu\text{mol/kgSW}$ )           | ( $\mu\text{mol/kgSW}$ )             | ( $\mu\text{mol/kgSW}$ )        |                               |                               |
| <b>7.6</b> | Zn           | $1561.4 \pm 229$         | 7.6       | 2191.4                           | 1512.4                             | 20.3                                 | 66.8                            | 0.56                          | 0.35                          |
|            | Cu           | $1804.4 \pm 162.3$       | 7.5       | 3016.5                           | 1759.5                             | 19.0                                 | 94.8                            | 0.52                          | 0.32                          |
|            | Cd           | $942.2 \pm 46.7$         | 7.6       | 1295.2                           | 909.4                              | 12.2                                 | 40.0                            | 0.34                          | 0.1                           |
| <b>8.1</b> | Zn           | $1881.4 \pm 170.4$       | 8.0       | 1114.1                           | 1755.5                             | 53.5                                 | 34.3                            | 1.47                          | 0.90                          |
|            | Cu           | $1991.6 \pm 293.6$       | 8.1       | 927.3                            | 1833.5                             | 67.8                                 | 29.1                            | 1.85                          | 1.14                          |
|            | Cd           | $1039.2 \pm 184.3$       | 8.1       | 483.0                            | 945.7                              | 35.4                                 | 15.0                            | 0.97                          | 0.60                          |

#### 4. DISCUSSION

The LC<sub>50</sub> values of Cu and Zn at pH 8.1 were comparable to those reported in other studies (Wei et al., 2021) and consistent with the sensitivity chart from the laboratory where the tests were conducted ( $0.86 \pm 0.13$  mg/L Zn). The Cu was identified as the most toxic metal to *Nitokra* sp., as evidenced by the data in Table 1. This pattern aligns with previous findings in other copepod species, such as *Eurytemora affinis* and *Diaptomus forbesi*, where Cu exhibited greater toxicity compared to other metals (Ghosh, 1953; Zidour et al., 2019). Interestingly, the bioconcentration factors calculated from the metal concentrations measured in copepod pools and the surrounding water indicate that Cu was also the most bioaccumulated metal compared to Cd and Zn. This suggests a direct relationship between bioaccumulation and toxicity, in line with the principles proposed by the Biotic Ligand Model (BLM) Paquin et al., 2002).

In this study, metal toxicity was also evaluated under both natural pH conditions (8.1) and those projected by the IPCC (7.6) for future ocean acidification scenarios (IPCC, 2023). Before discussing the toxicity data, it is important to address the results related to the maintenance of the experimental setup under acidified conditions. In this sense, the analysis of carbonate species shown in Table 7 confirmed that the treatments exhibited a higher concentration of CO<sub>2</sub> at pH 7.6 compared to pH 8.1, consistent with previous research findings (Altafim et al., 2023; Chaves Lopes et al., 2020). At pH 7.6 (Control:  $0.37 \pm 0.1$ , Zn:  $0.38 \pm 0.33$ , Cu:  $0.76 \pm 0.33$ , and Cd:  $0.31 \pm 0.19$ ), calcite saturation ( $\Omega$  Ca) was also lower than at pH 8.1 (Control:  $1.01 \pm 0.13$ , Zn:  $0.75 \pm 0.74$ , Cu:  $1.51 \pm 0.28$ , and Cd:  $0.83 \pm 0.01$ ). The saturation of aragonite ( $\Omega$  Ar) followed this trend as well, with lower values at pH 7.6 (Control:  $0.22 \pm 0.06$ , Zn:  $0.23 \pm 0.2$ , Cu:  $0.46 \pm 0.2$ ) compared to pH 8.1 (Control:  $0.62 \pm 0.08$ , Zn:  $0.46 \pm 0.45$ , Cu:  $0.92 \pm 0.17$ , and Cd:  $0.50 \pm 0.01$ ), indicating reduced availability of these calcium carbonate minerals at the more acidic pH in acute toxicity

test. A similar pattern of behavior exhibited by the carbonated species was observed in both the accumulation and depuration tests. Calcite and aragonite are two crystalline polymorphs of  $\text{CaCO}_3$ , whose solubility in water varies according to environmental chemical conditions. Calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) play a critical role in maintaining the ionic balance by interacting with negatively charged species such as  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  (Brander et al., 2017).

Turning to the toxicity findings, we hypothesized that Zn, Cu, and Cd toxicity would increase at the lower pH, as the metals become more bioavailable in more acidic conditions, with  $\text{H}^+$  ions competing with metal ions for the chelators present in the water. However, the data presented in this study appear to refute this hypothesis as the  $\text{LC}_{50}$  values indicated greater toxicity at pH 8.1 compared to pH 7.6. These results contrast with Wei et al. (2021), who noted that  $p\text{CO}_2$ -driven acidification could potentially increase the acute toxicity of Cd in marine copepods. The acute toxicity of Zn, Cu, and Cd in copepods under  $p\text{CO}_2$ -acidified conditions has been assessed in a limited number of studies, yielding variable results. Notably, in media acidified to pH values corresponding to 400 and 1000  $\mu\text{atm CO}_2$ , the copepod *Tigriopus japonicus* exhibited  $\text{LC}_{50}$  values for Cd of 12.03 mg/L and 9.08 mg/L, respectively (Wei et al., 2021). These findings contrast with our results on metal toxicity (see Table 1 for the  $\text{LC}_{50}$  and Table 7 for the  $p\text{CO}_2$ ). In contrast, the marine copepod *Acartia tonsa* displayed  $\text{LC}_{50}$  values for Cd of 1.41, 0.98, and 0.05 mg/L at pH levels of 6.30, 6.23, and 6.07 mg/L, respectively, and for Cu, the  $\text{LC}_{50}$  values were reported as 0.32 and 0.26 mg/L at pH 6.64 and 6.23, respectively, in  $p\text{CO}_2$ -acidified water (Pascal et al., 2010). Experiments with *Daphnia magna* showed that pH did not interfere with the accumulation of Cu and Pb, and showed a positive linear relationship between pH and the absorption rate constants of Zn (Komjarova and Blust, 2009). Such variations in responses suggest that the toxic effects of Zn, Cu, and Cd may be species-specific and potentially influenced by physiological or ecological

differences among copepod taxa. However, it is important to highlight that some findings do support the patterns observed in our study.

Concerning the experiment about bioaccumulation and depuration, previous studies have shown that bioaccumulation of Cd, Cu, and Zn may become significant under associated conditions of acidification and global warming, suggesting that combined stressors could amplify metal uptake in estuarine organisms (Altafim et al., 2023). Amphipods exposed to 17 and 23  $\mu\text{g/L}$  of Cd over 21 days (Zauke et al., 1995) exhibited bioaccumulation and depuration patterns similar to those observed in this study for Cd and Zn in *Nitokra sp.* across both pH levels, despite the difference in duration of exposure. Comparable results were also reported for the copepod *E. affinis* exposed to 7  $\mu\text{g/L}$  of Cd for 144 hours (Zidour et al., 2019). However, a non-linear response over depuration were documented for the Cladoceras *Daphnia galeata*, *Ceriodaphnia dubia*, and *Moina macrocopa* (Tan and Wang, 2011), as well as for the copepod *E. affinis* (Zidour et al., 2019). These findings challenge the hypothesis that the absence of saturation in Cd accumulation in crustaceans is solely due to a limited capacity to eliminate non-essential metals, suggesting species-specific differences in metal handling.

The rapid uptake and subsequent stabilization of Cu accumulation at both pH levels may be related to competitive interactions between copper and other ions, or the physiological requirement for copper as a component of hemolymph—the respiratory pigment in crustaceans—and other essential biomolecules. Notably, a clear effect of pH on the depuration profile was observed: organisms exposed to Cu at pH 8.1 eliminated the metal more rapidly and efficiently than those exposed at pH 7.6.

Both BCF, the measured (BCF<sub>ss</sub>) and the estimated (BCF<sub>k</sub>), for all metals were generally lower at pH 7.6 compared to pH 8.1 (Tables 4 and 5). This, as previously discussed, aligns with

the observed toxicity values but does not support our initial hypothesis of increased metal bioavailability and incorporation under more acidic conditions. Nonetheless, the BCF values for *Nitokra* sp. were quite high, indicating that this species is an effective bioaccumulator of metals and is subject to the effects of these toxicants. The BCF calculated for *Nitokra* sp. was greater than those reported for the gammarids *Gammarus salinus* and *Gammarus zaddachi* BCF (Zauke et al., 1995).

There was no significant influence of metals on the concentration of Ca and Na during the accumulation phase. However, a negative trend in Ca contents during exposure to Cd, and to a lesser extent, Zn, and an increase during exposure to Cu at pH 7.6 are evident. A similar trend was also observed for Cu at pH 8.1. These findings suggest a potential disruption in calcium balance caused by metal in acidified scenarios. Competitive interactions with the divalent ions Cd and Zn by the binding active sites in the copepods could be the reason for the reduced Ca concentration. In some way, Cu seems to facilitate Ca burden by the animals, leading to an increase in its concentration. A reduction in Zn toxicity associated with elevated Ca levels in the organism has been reported to *Daphnia magna* (KOMJAROVA and BLUST, 2008). Tan and Wang (2011) reported a positive correlation between Ca content and Cd accumulation in Cladoceras, suggesting that high Ca uptake may be linked to greater Cd sensitivity, an observation that contrasts with our findings.

At pH 8.1, there was also no difference in Ca concentrations between treatments, despite the tendency of an increase in Ca concentration over Cu 48 h-exposure. Elevated  $pCO_2$  may alter the magnesium-to-calcium (Mg:Ca) ratio in the newly formed exoskeleton and prolong the intermolt interval, thereby reducing growth rates (Brander et al., 2017). Additionally, a reduction in the digestive gland  $Ca^{2+}$ -ATPase activity at pH 7.6 was observed in mussels and was associated

with detrimental homeostasis (Lopes et al., 2020). The  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is the pump responsible for Ca uptake and regulation in animal bodies, and are essential for providing the macronutrient for the formation of calcareous structures.

The accumulation rate constants of Cd, Cu, and Zn in *Nitokra* sp. were slightly lower at pH 7.6 compared to pH 8.1 (Table 5). These results align with the Zn concentrations observed at pH 6 and pH 8 by Komjarova and Blust (2009) but contradict their claim that competition between protons and Cd ions is unlikely under slightly acidic conditions, given Cd's higher affinity for membrane binding sites compared to protons.

A similar pattern was observed during the elimination phase in the Ca concentration for Cu and Cd treatments. Cu increased Ca levels, whereas Cd caused a decrease. However, this difference was not observed in comparison to the control. Cd exhibited an even more pronounced effect, with noticeable differences in Ca concentrations in copepods after the exposure period. This suggests that competition between Cd and Ca within the copepod is even more pronounced. When the competition among trace metals is weak, a greater absorption of Ca is observed (Komjarova and Blust, 2008), which would be the case of Cu. It is important to note, however, that this metal showed the highest bioconcentration factor (BCF<sub>ss</sub>). Additional sources of Cu are likely available, as it is an essential metal. Moreover, Cu exists in both  $\text{Cu}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$  forms, which may reduce its competition with  $\text{Ca}^{2+}$  for uptake by the animals, depending on its speciation. It is important to note that salinity and pH influence metal speciation and, consequently, the bioavailable forms of these ions.

During the accumulation phase, Cu also influenced Na uptake; though not significantly, the effect was noticeable at both pH levels. This contrasts with results reported for freshwater

species but aligns with findings by Martins et al. (paper submitted), which indicate that Cu does not utilize the same uptake pathways as Na in the blue crab *Callinectes sapidus*.

## 5. CONCLUSION

The acidified pH scenario projected by the IPCC (2023) did not significantly affect the toxicity, bioaccumulation, or Na concentration in *Nitokra* sp. during exposure to Cd, Cu, and Zn, nor during the depuration phase. However, among the tested metals, Cu and Cd emerged as the most impactful contaminants at both pH levels, exhibiting distinct behaviors. The Cu exposure led to increased Ca and Na concentrations, whereas Cd reduced them, particularly at pH 7.6. The steady-state BCF values (BCF<sub>ss</sub>) demonstrated the ability of *Nitokra* sp. to accumulate Cd, Cu, and Zn, with higher values observed at pH 8.1. This suggests possible competition between cations and indicates that the physiological condition of the animals under acidified conditions influences metal bioaccumulation. Understanding the implications of these effects and how they may impact the ecology of these organisms remains unclear.

## REFERENCES

- ABNT, 2021. Ecotoxicologia aquática-Método de ensaio com copépodos marinhos e estuarinos (Copepoda, Crustacea), Rio de Janeiro: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
- Altafim, G.L., Alves, A.V., Trevizani, T.H., Figueira, R.C.L., Gallucci, F., Choueri, R.B., 2023. Ocean warming and CO<sub>2</sub>-driven acidification can alter the toxicity of metal-contaminated sediments to the meiofauna community. *Science of the Total Environment* 885. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163687>
- ASTM, 2019. E1706 - 19: Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, United States: ASTM International
- Chaves Lopes, F., Rosa de Castro, M., Caldas Barbosa, S., Primel, E.G., de Martinez Gaspar Martins, C., 2020. Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. *Mar Pollut Bull* 158. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111401>
- Contreras-Porcia, L., Meynard, A., López-Cristoffanini, C., Latorre, N., Kumar, M., 2017. Marine metal pollution and effects on seaweed species, in: *Systems Biology of Marine Ecosystems*. Springer International Publishing, pp. 35–48. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-62094-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-62094-7_3)
- Delgado, J. de F., Amorim, R.M., Lima, L. da S., Gaylarde, C.C., Neto, J.A.B., Pinto, S.C. de S., Gonçalves, B.F. dos S., Fonseca, E.M. da, 2023. Negative Impacts of Trace Metal Contamination on the Macrobenthic Communities along the Santos Port Complex—Brazil. *Eng* 4, 1210–1224. <https://doi.org/10.3390/eng4020071>
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem* 20, 2383–96.
- Dong, F., Wang, P., Qian, W., Tang, X., Zhu, X., Wang, Z., Cai, Z., Wang, J., 2020. Mitigation effects of CO<sub>2</sub>-driven ocean acidification on Cd toxicity to the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Environmental Pollution* 259, 113850. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113850>
- EPA, 2007. Aquatic Life Ambient Freshwater Quality Criteria-Copper 2007 Revision COMPLETE.
- Ghosh, A., 1953. Kinetics of Deposition, Acute Toxicity and Bioaccumulation. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1953-x/Published>
- Girard, J.E., 2013. Principles Of Environmental Chemistry, 3rd ed. Burlington, MA 01803.

- IPCC, 2023. IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report, Summary for Policymakers. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. <https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647.001>
- IPCC, 2014. IPCC, 2014. CLIMATE CHANGE 2014 Synthesis Report Summary for Policymakers.
- Kadiene, E.U., Ouddane, B., Hwang, J.S., Souissi, S., 2019. Bioaccumulation of metals in calanoid copepods by oral intake. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45987-2>
- Komjarova, I., Blust, R., 2009. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. *Aquatic Toxicology* 94, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.018>
- KOMJAROVA, I., BLUST, R., 2008. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. *Aquatic Toxicology* 90, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.007>
- Li, M., Guo, Y., Cai, W.J., Testa, J.M., Shen, C., Li, R., Su, J., 2023. Projected increase in carbon dioxide drawdown and acidification in large estuaries under climate change. *Commun Earth Environ* 4. <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00733-5>
- Lopes, F.C., Rosa de Castro, M., Caldas Barbosa, S., Primel, E.G., de Martinez Gaspar Martins, C., 2020. Effect of the UV filter, Benzophenone-3, on biomarkers of the yellow clam (*Amarilladesma mactroides*) under different pH conditions. *Mar Pollut Bull* 158, 111401. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111401>
- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Bressan, M., Marin, M.G., 2013. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Mar Pollut Bull* 72, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.004>
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 3–35. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00112-6)

- Pascal, P.-Y., Fleege, J.W., Galvez, F., Carman, K.R., 2010. The toxicological interaction between ocean acidity and metals in coastal meiobenthic copepods. *Mar Pollut Bull* 60, 2201–2208. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.018>
- Phillips, J., McKinley, G., Bennington, V., Bootsma, H., Pilcher, D., Sterner, R., Urban, N., 2015. The Potential for CO<sub>2</sub>-Induced Acidification in Freshwater: A Great Lakes Case Study. *Oceanography* 25, 136–145. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2015.37>
- Santos, T.T.L., Mounier, J.L.S., Marins, R.V., 2024. Trace metal partitioning in the parnaíba delta in dry season, equatorial coast of Brazil. *Environmental Pollution* 345, 123500. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123500>
- Sousa, E.C.P.M. de, Zaroni, L.P., Gasparro, M.R., Pereira, C.D.S., 2024. Review Of Ecotoxicological Studies Of The Marine And Estuarine Environments Of The Baixada Santista (São Paulo, Brazil). *Braz J Oceanogr* 62, 133–147. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592014063006202>
- Tan, Q.-G., Wang, W.-X., 2011. Contrasting patterns of cadmium bioaccumulation in freshwater cladocerans. *Limnol Oceanogr* 56, 257–267. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.1.0257>
- Wei, H., Bai, Z., Xie, D., Chen, Y., Wang, M., 2021. CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification increases cadmium toxicity in a marine copepod. *Mar Pollut Bull* 173, 113145. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113145>
- Zauke, G.-P., von Lemm, R., Meurs, H.-G., Butte, W., 1995. Validation of estuarine gammarid collectives (Amphipoda: Crustacea) as biomonitors for cadmium in semi-controlled toxicokinetic flow-through experiments. *Environmental Pollution* 90, 209–219. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)00108-P](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)00108-P)
- Zeng, X., Chen, X., Zhuang, J., 2015. The positive relationship between ocean acidification and pollution. *Mar Pollut Bull* 91, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.001>
- Zidour, M., Boubechiche, Z., Pan, Y.J., Bialais, C., Cudennec, B., Grard, T., Drider, D., Flahaut, C., Ouddane, B., Souissi, S., 2019. Population response of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* to its bioaccumulation of trace metals. *Chemosphere* 220, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.148>

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O cenário de pH acidificado projetado pelo IPCC (2023) não afetou significativamente a toxicidade, bioacumulação ou concentração de Na em *Nitokra* sp. durante a exposição ao Cd, Cu e Zn, nem durante a fase de depuração. No entanto, entre os metais testados, Cu e Cd emergiram como os contaminantes mais impactantes em ambos os níveis de pH, exibindo comportamentos distintos. A exposição ao Cu levou ao aumento das concentrações de Ca e Na, enquanto o Cd reduziu — particularmente a pH 7,6. Os valores de BCF em estado estacionário (BCF<sub>ss</sub>) demonstraram a capacidade de *Nitokra* sp. de acumular Cd, Cu e Zn, com valores mais altos observados a pH 8,1. Isso sugere possível competição entre cátions e indica que a condição fisiológica dos animais em condições acidificadas influencia a bioacumulação de metais. Compreender as implicações desses efeitos e como eles podem impactar a ecologia desses organismos permanece incerto.

Com base nestas observações, recomenda-se a futuros estudos uma abordagem ecotoxicológica com condições experimentais que envolvem todos os cenários de mudanças climáticas, acidificação e aquecimento global. Recomenda-se avaliar traços de reprodução usando o mesmo delineamento experimental, assim como em gerações diferentes em espécies de copépodes. E por fim o uso de concentrações subletais de 15 – 20% (CL<sub>15</sub> - CL<sub>20</sub>), uma vez que essas concentrações podem estar em grandes quantidades em certas regiões devido a ação androgênica e enriquecimento geológico do meio.