

Influência da temperatura na toxicidade de cobre em girinos de rã verde *Pelophylax perezi*

A contaminação por metais é um problema global e um dos principais factores responsáveis pelo declínio, a nível mundial, de populações de anfíbios. Este grupo de organismos tem sido identificado como muito sensível a contaminação antropogénica, pelo que, são comumente utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental. Paralelamente a esta, também as alterações climáticas (e.g. aumento da temperatura média), têm vindo a provocar efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos. Assim, este estudo pretendeu avaliar o efeito da temperatura na toxicidade do cobre em girinos de rã verde (*Pelophylax perezi*). Para tal, girinos no estágio Gosner 21-22 foram expostos durante 96h a várias concentrações de cobre a 20 e 23°C. No decorrer e no final dos ensaios foram monitorizados diversos parâmetros: taxa de mortalidade, ocorrência de malformações, estádios de desenvolvimento e comprimento dos girinos. A mortalidade foi registada a cada 24 horas, e observou-se que na concentração mais elevada de cobre ocorreu 100% de mortalidade. No final da exposição, os girinos expostos às restantes concentrações mais elevadas de cobre apresentaram malformações e menor comprimento. Relativamente ao efeito da temperatura, a concentração letal mediana (CL₅₀) foi inferior na temperatura de 20°C, contudo não se observou interacção entre a temperatura e toxicidade do cobre. Em ambas as temperaturas testadas foram observadas diferenças significativas no comprimento dos girinos expostos às concentrações de cobre, relativamente aos do controlo.

Palavras-chave

cobre
temperatura
Pelophylax perezi
comprimento

Fátima Pinto Brandão¹

Sérgio Marques²

Sara Rodrigues¹

Bárbara Santos¹

Rita Travasso¹

Cátia Venâncio¹

Ruth Pereira²

Manuel Ortiz-Santaliestra³

Amadeu MVM Soares²

Fernando Gonçalves²

Isabel Lopes² •

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

² Departamento de Biologia & CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

³ Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos CSIC-UCLM-JCCM, Grupo de Toxicología de Fauna Silvestre, Universidade Ciudad Real La Mancha, 13071 Ciudad Real, Espanha

• ilopes@ua.pt

INTRODUÇÃO

Contaminação do ambiente por metais

Os metais são elementos omnipresentes no ambiente mesmo que em quantidades vestigiais. O seu ciclo natural é perpetuado naturalmente através de processos como a erosão e erupções vulcânicas envolvendo também o fluxo equilibrado de elementos entre a hidrosfera, geosfera e atmosfera (Seiler e Sigel, 1988). Contudo entre regiões podem ocorrer grandes variações na abundância bem como no tipo de metais existentes, uma vez que as características químicas quer da água, quer das rochas também variam. No entanto, uma vez que o ser humano utiliza em grande escala muitos metais existentes na natureza, acabam por existir desequilíbrios nos seus ciclos naturais. As principais fontes de contaminação ambiental antropogénica devem-se a actividades industriais ou agrícolas. O cobre é um dos metais que é utilizado em grande escala em ambas as actividades. Este elemento ocorre naturalmente nas rochas, solo, água, sedimentos e a concentrações mais baixas na atmosfera (ATSDR, 2004). No entanto, tal como foi revisto por Flemming e Trevors (1989) através de processos como a sua extracção, extracção de outros metais, a sua utilização industrial, o cobre acaba por ser biodisponibilizado no ambiente em concentração elevadas. Pode ainda ser introduzido no ambiente através de pesticidas, esgotos domésticos e combustão de combustíveis fósseis. Muito embora o cobre seja considerado um metal essencial, sendo a sua existência transversal a plantas e animais, assumindo um papel vital no desempenho normal de várias enzimas (ATSDR, 2004), a sua presença em quantidades elevadas no ambiente pode revelar-se tóxica quer para a flora (e.g. Mocquot et al., 1996, Borkert et al., 1998) quer para a fauna (e.g. Redick e La Point, 2004). A sua toxicidade pode ser ainda potenciada por vários factores como por exemplo a radiação UV (Baud e Beck, 2005), a temperatura (Rao e Khan, 2000) e o pH (Franklin et al., 2000). Tendo em conta as alterações climáticas que têm decorrido nas últimas décadas torna-se relevante e necessário perceber como é afectada a toxicidade de metais com elevada dispersão como o cobre com a alteração de factores abióticos (e.g. temperatura) em organismos que possam ser sensíveis a ambos os factores.

Anfíbios como espécies sensíveis à contaminação por metais e às alterações climáticas

Os anfíbios constituem um grupo especialmente crítico pois apresentam um complexo ciclo de vida com uma fase aquática (enquanto embriões e larvas) e uma fase terrestre (quando juvenis e indivíduos adultos), estando assim expostos a contaminantes nos dois *habitats* (Beiswenger, 1988). Desempenham também um papel fundamental em ambos, assumindo tanto o lugar de presas como de predadores, pelo que o impacto da contaminação ambiental nesta classe afecta toda a rede trófica. Ao estarem duplamente expostos a ameaças apresentam-se como bons indicadores de contaminação e do possível fluxo entre compartimentos aquático e terrestre (Halliday, 2000).

Os anfíbios são sensíveis aos contaminantes durante a fase adulta mas sobretudo durante a fase embrionária e larvar (Greulich e Pflugmacher 2003). Desta forma, e por estar confinada somente ao sistema aquático, a fase larvar pode ser alvo de maior exposição aos contaminantes (García-Muñoz et al., 2009). Em algumas espécies, esta é a fase de desenvolvimento mais longo, estando assim exposta durante um maior período de tempo. Este maior período de exposição atribui às larvas um papel importante como indicadores de contaminação ambiental. Mais ainda, Natale et al. (2006) observaram que larvas de *Hypsiboas pulchellus* apresentaram maior sensibilidade a crómio VI (3 a 90 mg L⁻¹) que os respectivos

embriões, o que faz com que estudos com este estágio de desenvolvimento sejam extremamente importantes para avaliar os efeitos reais que certos contaminantes possam ter nesta classe de organismos. Efectivamente, as larvas são usualmente mais sensíveis do que os embriões, pois não estão envoltas por uma camada gelatinosa, possuem guelras e apresentam um ratio superfície:volume maior, o que potencia a incorporação de contaminantes a através da derme (Bridges, 2000; Ortiz-Santaliestra et al., 2006)

Diversos estudos apontam para uma redução da sobrevivência das larvas quando expostas a metais, incluindo a cobre (Haywood et al., 2004; Horne e Dunson, 1995). Para além dos efeitos letais nos organismos, o cobre é também responsável por vários outros efeitos tóxicos sub-letais nas larvas, como alterações no crescimento e desenvolvimento, indução de malformações ou alterações comportamentais, efeitos esses que aumentam o risco de predação e diminuem a probabilidade da sobrevivência (García-Muñoz et al., 2009).

Quando comparada a toxicidade de vários metais para larvas de *Bufo melanostictus*, o cobre revelou ser um dos metais mais tóxicos, ocupando a terceira posição a seguir à prata (Ag) e ao mercúrio (Hg) num conjunto de sete metais testados (Prata > Mercúrio > Cobre > Cádmio > Zinco > Níquel > Crómio), de acordo com os valores de CL₅₀, obtidos após 96h de exposição (Khangarot e Ray, 1987).

De entre os factores que podem influenciar a exposição dos girinos à contaminação aquática podem-se referir o estágio de desenvolvimento, idade e tamanho, actividade ou período do ciclo reprodutivo. O contacto ocorre sobretudo pela derme, pelas vias respiratórias (cutânea e branquial) ou através da alimentação (Pelgrom, 1994). No entanto, os factores abióticos também devem ser integrados nos estudos, uma vez que o processo de assimilação dos metais é influenciado por exemplo, pelo pH, temperatura, salinidade ou oxigénio dissolvido (Pelgrom, 1994).

O aumento da temperatura é um dos factores que pode afectar indirectamente os anfíbios, uma vez que estes nas fases embrionárias e larvares dependem exclusivamente dos sistemas aquáticos para a sua sobrevivência. A subida rápida da temperatura pode afectar o período de ocorrência de charcos temporários, fazendo com que estes sequem mais rápido, desabrigando as populações de girinos antes destes terem tempo de se metamorfosearem. O próprio aumento da temperatura afecta também de forma directa os mecanismos fisiológicos dos indivíduos sendo responsável, por exemplo, por maiores taxas de respiração. A temperatura afecta também a toxicidade dos metais, podendo, acelerar a sua absorção. No caso dos girinos, um aumento da temperatura, ao provocar um aumento da respiração branquial, favorece o aumento da taxa de assimilação de metais. Em oposição, temperaturas mais elevadas são responsáveis por favorecer um desenvolvimento mais rápido dos organismos, podendo assim reduzir o período de exposição aos contaminantes, uma vez que estes ao se desenvolverem mais rapidamente atingem a metamorfose em períodos mais curtos.

Estudos recentes (García-Munóz et al., 2010) referem que o facto de *Pelophylax perezi* ser uma espécie bastante comum em áreas húmidas altamente alteradas, pode estar relacionado com a sua elevada tolerância a agentes tóxicos. Também a sua ampla distribuição e presença em diversos tipos de sistemas aquáticos pode estar relacionada com uma maior resistência ou capacidade de adaptação a certos graus de contaminação, a outros factores de *stress* ambiental e a condições ambientais diversas. Os resultados obtidos através de estudos com espécies mais resistentes de certa forma podem não representar a situação

real para outras espécies mais sensíveis e em declínio, mas a avaliação dos efeitos da contaminação em espécies mais sensíveis também pode sobrestimar os efeitos negativos em espécies mais resistentes, e para além disso seria eticamente incorrecto usar espécies que já estejam ameaçadas, em ensaios laboratoriais.

A espécie *Xenopus laevis* é uma espécie padronizada para representar a classe dos anfíbios em ensaios ecotoxicológicos. Contudo, esta espécie é representativa apenas das regiões sub-tropicais e, portanto não é adequada para estudos ecotoxicológicos em regiões com climas temperados. Assim, a rã verde *Pelophylax perezi* apresenta-se como uma das potenciais candidatas a espécie padrão de zonas temperadas para estudos em ecotoxicologia. Isto porque ocupa diversos tipos de *habitat*, é uma espécie abundante e pouco sensível à manipulação em laboratório (Garcia-Paris et al. 2004; Ortiz-Santaliestra et al., 2010). Para além destas características, *P. perezi* apresenta a vantagem, face a outras espécies de climas temperados, de ser abundante e não estar ameaçada, e proporcionar um grande número de massas de ovos durante a sua época de reprodução, permitindo o seu uso na realização de ensaios ecotoxicológicos.

Neste contexto, o principal objectivo do nosso estudo foi avaliar a influência da temperatura nos efeitos que o cobre pode induzir na sobrevivência e no desenvolvimento de girinos de rã verde (*Pelophylax perezi*).

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos-teste e local de colheita

Massas de ovos de *P. perezi* nos estádios 10-12 (descritos por Gosner, 1960) foram recolhidos num lago temporário junto à barrinha de Esmoriz/Lagoa de Paramos (+40° 58' 5.85", -8° 38' 55.24") e mantidos em laboratório em meio FETAX (Dawson e Bantle, 1987) até atingirem o estágio Gosner 21-22, em condições abióticas controladas, nomeadamente fotoperíodo 16h^L:8h^D e temperatura 23±1°C. Esta espécie representada na Figura 1, ocorre em toda a Península Ibérica, sendo um dos anfíbios mais abundantes, podendo ainda ser encontrada no sul da França. Ocupa quase todos os tipos de massas de água, em todos os tipos de *habitats* e é conhecida por tolerar água salobra e concentrações moderadas de contaminação aquática, tal como se observa pela sua presença em *habitats* agrícolas altamente eutróficos (Egea-Serrano et al., 2009; Ortiz-Santaliestra et al., 2010).



FIGURA 1: Rã verde Ibérica (*Pelophylax perezi*) (autor: Sara Rodrigues).

Os estádios Gosner 21 e 22, referidos anteriormente, encontram-se representados na Figura 2. O estágio 21 é caracterizado por apresentar a córnea transparente, olhos claramente visíveis e barbatanas opacas. O estágio 22 caracteriza-se por apresentar as membranas caudais transparentes (Gosner, 1960).

O local de colheita é adjacente à Barrinha de Esmoriz/Lagoa de Paramos. Esta é uma lagoa costeira situada no litoral Norte de Portugal, entre os concelhos de Ovar e Espinho que ocupa uma área de cerca de 396 hectares (Fernandes, 2007). Esta lagoa é a zona húmida mais significativa no litoral Norte, entre a Ria de Aveiro e o Estuário do Rio Minho (ICN, 2006). Na actualidade, a Barrinha de Esmoriz/Lagoa de Paramos

encontra-se integrada na reserva Ecológica Nacional, classificada como biótopo CORINE (no âmbito da Comissão da União Europeia) e integrada na rede Natura 2000 (SIMRIA, 2002; ICN, 2006). Ao nível das fontes de poluição que esta lagoa está sujeita, ela tem sido destino de inúmeras descargas de efluentes, sendo as principais fontes de poluição as descargas não controladas de águas residuais domésticas e industriais e situações difusas referentes às actividades agrícola e agropecuária (SIMRIA, 2002; AMRIA, 2006).

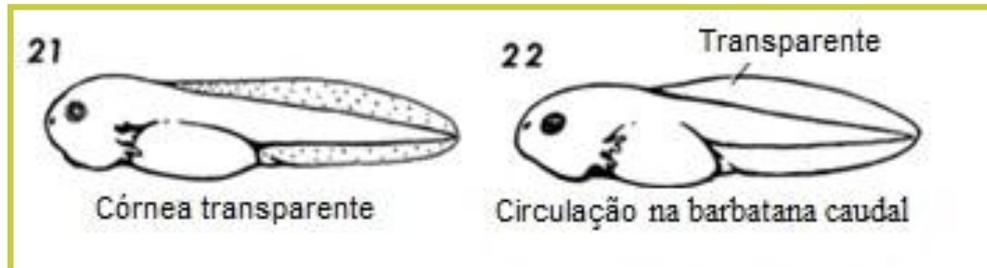


FIGURA 2: Representação esquemática dos estádios Gosner 21 e 22 de anuros (esquema adaptado de Gosner, 1960).

Protocolo experimental

O meio artificial, FETAX (Dawson e Bantle, 1987), foi utilizado como controlo ($0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$) e como meio de diluição para as restantes concentrações de cobre testadas ($0,2$; $0,4$; $0,8$; $1,6$ e $3,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cu}$). Para a preparação destas soluções foi usado Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, Germany). Para o ensaio foram utilizados frascos de plástico estéreis de 50 ml em que se colocou 50 ml de FETAX nas réplicas do controlo e 50 mL das soluções de cobre nos restantes tratamentos. Foram preparadas três réplicas para cada tratamento com o cobre e quatro réplicas para o controlo. O mesmo desenho experimental foi repetido para cada uma das temperaturas testadas (20 e 23°C). Os testes de exposição aguda decorreram durante 96h e com um fotoperíodo de $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{D}}$. Foram seleccionados os girinos que se encontravam na mesma fase de desenvolvimento (estádio Gosner 21-22) e foram distribuídos aleatoriamente 5 girinos por cada réplica de cada uma das concentrações. Parâmetros abióticos como pH e oxigénio dissolvido foram monitorizados, para fins de validação do ensaio. A cada 24h foi registado o número de mortos, sendo estes removidos e o meio renovado. Às 48h e 96h foram também registados os estádios de desenvolvimento e apenas no final do ensaio os girinos foram observados para registo da ocorrência de malformações e para determinação do comprimento corporal.

Análise estatística

As concentrações letais médias (i.e., que causam 50% de mortalidade; CL_{50}) e os respectivos limites de confiança a 95%, após 96 horas de exposição, para as temperaturas de 20°C e 23°C , foram calculadas através do software Probit (Sakuma, 1998). Para avaliar o efeito significativo das concentrações de Cu e da temperatura nos organismos, assim como a existência de uma interacção significativa entre ambos os factores, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) bifactorial, seguida de um teste de Dunnet, para análise de diferenças significativas entre cada um dos tratamentos e o controlo (Zar, 1996). A aplicação deste método implica que os dados tenham passado primeiramente no teste de normalidade e de igualdade de variância (Zar, 1996).

RESULTADOS

Efeitos letais do cobre a diferentes temperaturas

De uma forma geral, verificou-se que a mortalidade registada nos diferentes tratamentos foi superior na temperatura mais baixa (20°C). Os girinos expostos a cobre à temperatura de 20°C apresentaram maior sensibilidade a este metal do que os girinos expostos a cobre à temperatura de 23°C: CL_{50,96h} (LC 95%) de 0,66 (0,5-,87) mg Cu L⁻¹ e 0,85 (0,64-1,1) mg Cu L⁻¹, respectivamente. Após apenas 24h do início do ensaio experimental, os girinos expostos a 3,2 mg Cu L⁻¹ encontravam-se todos mortos, em ambas as temperaturas.

Efeitos sub-letais induzidos pelo cobre a diferentes temperaturas – comprimento corporal dos girinos

Os girinos expostos à temperatura de 23°C apresentaram maior comprimento corporal do que os expostos a 20°C ($F_{1,105} = 7,98$; $p = 0,006$) (Figuras 3 e 4). Foi ainda observado que os girinos expostos às concentrações de cobre testadas apresentaram um menor comprimento corporal do que os girinos expostos aos respectivos controlos (FETAX), para a temperatura de 20°C ($F_{4,48} = 45,617$; $p < 0,001$) (Figura 3) e para a temperatura de 23°C ($F_{4,57} = 50,851$; $p < 0,001$) (Figura 4). Relativamente ao efeito combinado entre temperatura e concentração, não se observaram interações significativas ($F_{4,105} = 1,794$; $p=0,136$). Deste modo, verificou-se que a temperatura não influenciou de forma directa a toxicidade do cobre.

Avaliação dos efeitos induzidos pelo cobre – malformações

Os girinos expostos às concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 mg Cu L⁻¹, apresentaram uma percentagem de malformações entre 21% e 50% em ambas as temperaturas, exceptuando os girinos expostos a 0,8 mg Cu L⁻¹ à temperatura de 23°C (Tabela 1).

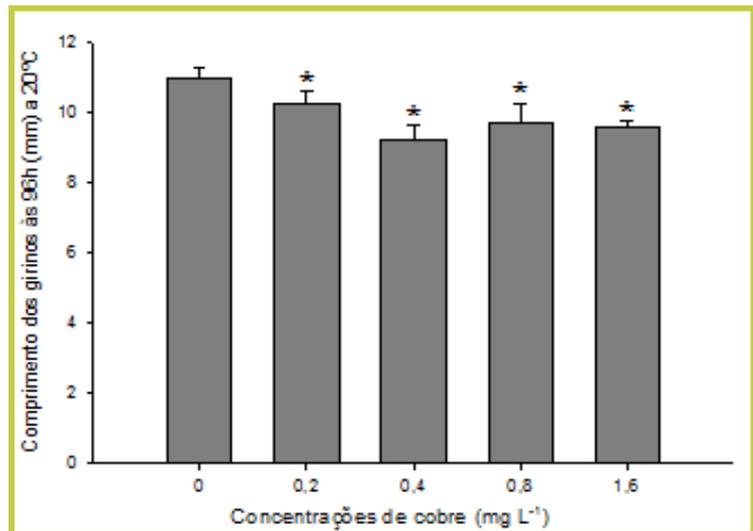


FIGURA 3: Média do comprimento dos girinos de *Pelophylax perezi* após 96h de exposição às respectivas concentrações de Cu a 20°C. Os "*" representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), relativamente ao controlo. As barras de erro representam o desvio padrão.

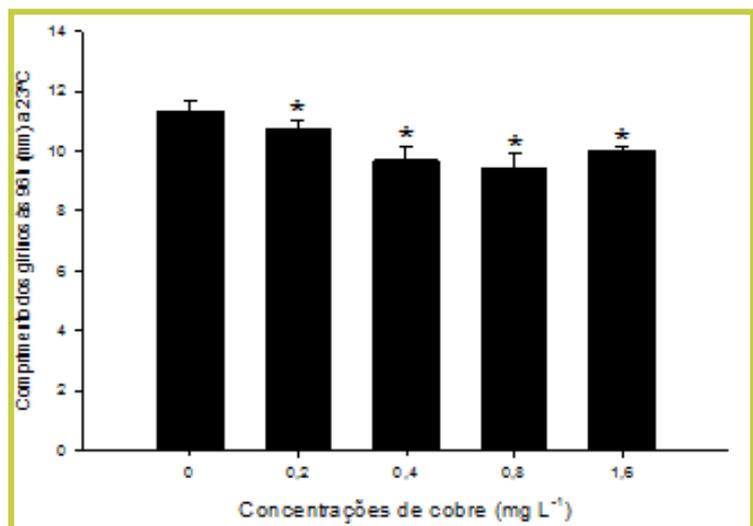


FIGURA 4: Média do comprimento dos girinos de *Pelophylax perezi* após 96h de exposição às respectivas concentrações de Cu a 23°C. Os "*" representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$), relativamente ao controlo. As barras de erro representam o desvio padrão.

A concentração mais baixa de cobre testada não provocou ocorrência de malformações nos organismos, tal como nos respectivos controlos mantidos em meio FETAX.

Na Figura 5 observam-se alguns exemplos de malformações, causadas pela exposição ao cobre. Na cauda podem observar-se deformações diversas (ex. edema) (Figura 5A a 5C). Na Figura 5D pode-se também observar a diferença de tamanhos no final das 96h entre os girinos.

TABELA 1: Percentagem de malformações observadas em organismos vivos, após 96h de exposição ao cobre, a diferentes temperaturas 20 e 23°C.

Temperatura (°C)	Concentração de Cu (mg L ⁻¹)	% de anomalias	Nº organismos vivos
20	0	0	20
	0,2	0	15
	0,4	50	12
	0,8	33,3	3
	1,6	33,3	3
23	0	0	20
	0,2	0	15
	0,4	21,4	14
	0,8	9,1	11
	1,6	50	2



FIGURA 5: Malformações observadas após 96h de exposição em girinos expostos a concentrações de cobre. A-Deformação na cauda; B e C- Edema na cauda; D- Tamanho corporal reduzido. (Autor: Sérgio Marques).

No final do ensaio, todos os girinos tinham atingido os estádios Gosner 24-25 (Figura 6), não se tendo registado diferenças significativas entre os tratamentos com o cobre submetidos às duas temperaturas. Estes estádios caracterizam-se pelo desenvolvimento do opérculo e conseqüente desaparecimento das brânquias externas e formação inicial de padrões de pigmentação. O estágio 24 ainda apresenta brânquias de um dos lados do corpo e o estágio 25 já não tem brânquias apresentando o espiráculo do lado esquerdo.

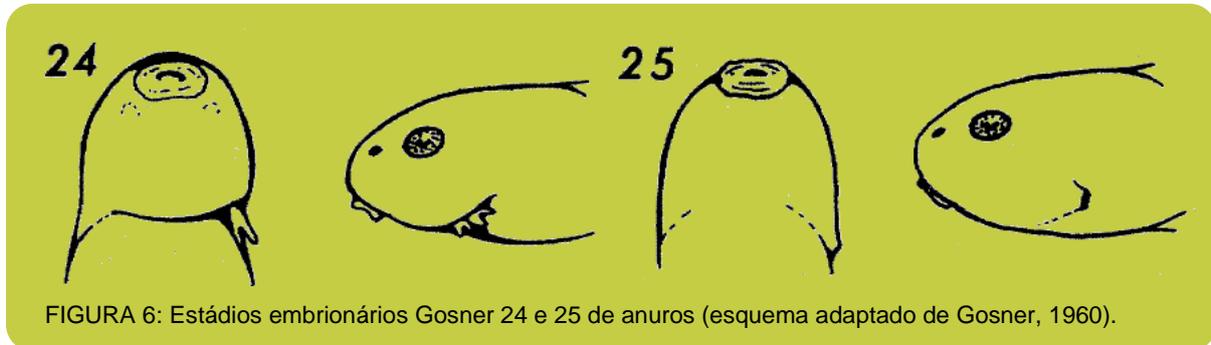


FIGURA 6: Estádios embrionários Gosner 24 e 25 de anuros (esquema adaptado de Gosner, 1960).

DISCUSSÃO

A diferença obtida para a mortalidade ocorrida e para os valores de CL_{50} às 96h entre as duas temperaturas, pode ser devida ao facto de os girinos na temperatura mais elevada ($23^{\circ}C$) terem apresentado um desenvolvimento mais rápido, tornando-se assim ligeiramente menos sensíveis ao cobre e, deste modo, diminuindo os efeitos da exposição quando comparados com os girinos expostos a $20^{\circ}C$. Esta menor sensibilidade ao metal pode dever-se ao rácio superfície/volume ser menor nos girinos maiores, fazendo com que a absorção do cobre através da pele seja proporcionalmente menor, ou poderá ser também devido a estes possivelmente terem atingido o estágio de Gosner 25 mais rapidamente durante o ensaio e este estágio ser mais resistente (e.g. brânquias externas desaparecem ficando ocultas pelo desenvolvimento do opérculo). Contudo, a determinação do estágio de Gosner só foi verificado no final, ou seja após 96h.

Quando avaliado o efeito do cobre individualmente, foram observadas diferenças significativas no comprimento corporal nos indivíduos em todas as concentrações de cobre testadas nas duas temperaturas. Estes resultados estão de acordo com Lefcort et al. (1998) e Haywood et al. (2004), os quais referem que o atraso do crescimento é um efeito comum, devido à exposição a metais, pois os organismos gastam mais energia nos mecanismos de desintoxicação (Rowe et al., 1998) ficando com menos reservas para o crescimento e atingindo por isso tamanhos inferiores. Também Haywood et al. (2004) e García-Munõz et al. (2010) verificaram reduções significativas no crescimento de girinos de *Xenopus laevis* em concentrações baixas de cobre. Igualmente, Redick e La Point (2004) detectaram diferenças significativas no comprimento, em comparação com os controlos, em girinos de *Lithobates pipiens* expostos durante sete dias a concentrações de cobre superiores a $0,071 \text{ mg L}^{-1}$. Os organismos passaram posteriormente por uma fase de recuperação (ausência de contaminante) e após 8 e 15 dias de recuperação os organismos continuavam significativamente mais pequenos que os do controlo.

Não se observou interação entre temperatura e concentrações de cobre, ou seja, a temperatura não influenciou de forma significativa a toxicidade de cobre, contrariamente ao verificado em outros estudos já

realizados (Lemus e Chung, 1999), os quais pressupõem que a temperatura afecta a toxicidade dos metais de forma diferente consoante as concentrações do metal em causa. Porém, a falta de interacção entre a temperatura e o cobre pode ser devido às temperaturas escolhidas não serem suficientemente elevadas ou baixas para exercerem algum efeito na toxicidade do cobre. Neste caso, a ausência de interacção entre a temperatura e a concentração do metal indica que não ocorreu nenhuma alteração fisiológica, promovida pela temperatura, que tenha influenciado positiva ou negativamente a sensibilidade dos organismos ao Cu. Contudo, verificou-se que o aumento da temperatura de 20°C para 23°C favoreceu o crescimento dos indivíduos. Assim, a temperatura pode ter promovido de forma indirecta uma maior tolerância aos metais. Isto pode ter acontecido devido ao facto de as temperaturas escolhidas (20 e 23°C) estarem inseridas no intervalo de tolerância térmico destes organismos, isto é, os indivíduos toleram uma certa gama de temperaturas sem que estas sejam factores adicionais de stress.

A contaminação por metais pode originar uma redução no crescimento, tal como verificado neste estudo, o que pode comprometer a população de girinos. Isto porque, girinos de tamanho inferior apresentam menor capacidade de competição por recursos, bem como maior vulnerabilidade a predadores pois possuem menor velocidade de locomoção (Semlitsch e Gibbons, 1988). Segundo Snodgrass et al. (2004), o desenvolvimento ocorre por períodos mais longos até atingirem a metamorfose, o que poderá comprometer a sobrevivência dos organismos (por exemplo, em lagos temporários podem vir a sofrer de dissecação se não metamorfosearem rapidamente). O sucesso da metamorfose, segundo Snodgrass et al. (2004), determina directamente o número de larvas que são recrutadas do meio aquático para o terrestre e, por isso, o número de indivíduos que poderão contribuir para a reprodução e consequente perpetuação da espécie.

Chen et al. (2007), também verificou com girinos de *L. pipiens* (expostos desde o estágio Gosner 19 até ao 25) que a taxa de crescimento diminuía significativamente ao longo de um gradiente de concentrações de cobre (25 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Verificou também que a exposição ao cobre alterava a capacidade natatória dos indivíduos apesar de não apresentarem anomalias morfológicas visíveis, fazendo pressupor que o metal pode ser responsável por efeitos adversos em funções neuro-musculares. A capacidade de natação permite-lhes escapar aos predadores pelo que, indivíduos em que esta capacidade tenha sido afectada, podem ser capturados com mais facilidade (Raimondo et al., 1998).

Noutro trabalho de Lefcort et al. (1998), girinos de *Rana luteiventris* foram expostos a zinco e a chumbo, e os autores verificaram que em concentrações médias dos dois metais os girinos não apresentavam os comportamentos anti-predatórios normais, ou seja, não reagiam à presença dos predadores como os girinos dos grupos controlo, que imediatamente procuravam um refúgio e reduziam os seus níveis de actividade.

Outro efeito foi também observado no final deste estudo, nomeadamente a ocorrência de anomalias na cauda. Num estudo desenvolvido por Chen et al. (2007) foram também registadas anomalias para concentrações de 100 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$, no entanto, estas foram apenas observadas em tratamentos com cobre nos estádios mais jovens (estádio 25) e não em girinos em estádios mais avançados (25-42), indicando que os girinos de *L. pipiens* em estádios anteriores ao estágio 25 são mais susceptíveis a efeitos teratogénicos, ou seja, malformações. Haywood et al. (2004) verificou ainda que a severidade e frequência das anomalias se acentuava com o aumento das concentrações. As malformações mais óbvias eram curvaturas espinais e sobretudo edemas. Contudo, o mecanismo pelo qual as anomalias ocorrem ainda é vagamente conhecido.

CONCLUSÃO

A exposição ao cobre afectou a sobrevivência e o desenvolvimento dos girinos de *P.perezi* tendo provocado mortalidade dos indivíduos expostos às concentrações mais elevadas. Foram também observados efeitos sub-letais, como a ocorrência de malformações e redução do tamanho corporal. Todos estes efeitos são importantes pois podem ser responsáveis pela diminuição da capacidade de sobrevivência dos indivíduos e portanto afectar a população.

Quando se avalia a toxicidade de metais, e neste caso em particular do cobre, é importante também avaliar o efeito da temperatura, pois esta altera diversos mecanismos fisiológicos dos organismos e mecanismos bioquímicos na circulação, biotransformação ou no aprisionamento dos tóxicos, embora no nosso estudo a temperatura não tenha afectado a toxicidade do cobre de forma directa.

Contudo, a temperatura mais elevada testada parece ter favorecido o crescimento dos girinos e portanto podemos concluir que a temperatura é um factor importante e que pode ter implicações na sobrevivência das populações de anfíbios.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A avaliação dos efeitos letais produzidos pela exposição a metais não deve ser considerada como resposta biológica única. Ensaio de toxicidade sub-letais também deverão ser efectuados, para avaliar impactos ecológicos mais relevantes. Estudos de bioacumulação de metais, avaliação de efeitos histopatológicos e morfológicos, ou quantificação de biomarcadores moleculares poderão ser incluídos em trabalhos posteriores. A influência que outros factores abióticos (e.g. pH, radiações UVs) poderão ter na toxicidade de vários metais deverá ser investigada, uma vez que a nível ecológico é importante conhecer quais os efeitos da combinação entre os possíveis factores de perturbação para as populações de anfíbios, sendo estes derivados das alterações climáticas ou da contaminação ambiental. Neste assunto será importante avaliar até que ponto um aumento da temperatura superior ao testado neste trabalho poderá continuar a favorecer um desenvolvimento mais rápido dos girinos ou passar a constituir um factor de perturbação adicional. Como os anfíbios são organismos chave na cadeia trófica, seria também importante perceber como podem ser receptores e transmissores de contaminantes para os outros níveis tróficos.

agradecimentos • Este trabalho teve apoio do projecto PTDC/AAC-AMB/104532/2008, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e pelo FEDER através do programa COMPETE. A FCT, FSE e POHP contribuíram ainda através do programa Ciência 2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMRIA, Plano Municipal da Água (2006) (acesso em 23/04/2011; <http://www.amria.pt>)
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2004). Toxicological Profile for Copper. U.S. Department of health and human services, 314 pp.
- Beiswenger RE (1988). Integrating anuran amphibian species into environmental assessment programs. U.S. Forest Service. General Technical Report RM 166: 159-165.
- Baud DR, Beck ML (2005). UV-B/copper interactions in the survival of spring peeper, *Pseudacris crucifer*, tadpoles. *Southeastern Naturalist* 4:15-22.
- Borkert CM, Cox FR, Tucker MR (1998). Zinc and copper toxicity in peanut, soybean, rice and corn in soil mixtures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29(19): 2991-3005.
- Bridges CM 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 91-96.
- Chen TH, Jackson G, William K 2007. Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern Leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(7): 1470–1475.
- Dawson DA, Bantle JA (1987). Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus* (FETAX). *Journal of Applied Toxicology* 7: 237-244.
- Egea-Serrano A, Tejedo M, Torralva M (2009). Populational divergence in the impact of three nitrogenous compounds and their combination on larvae of the frog *Pelophylax perezi* (Seoane, 1885). *Chemosphere* 76: 869-877.
- Fernandes MCC (2007). Contaminação da Barrinha de Esmoriz/Lagoa de Paramos por metais pesados: efeitos bioquímicos e histológicos em *Liza saliens*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto-douro. (acesso em 25/04/2011; <http://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/3833/1/25%20Tese%20Vers%C3%A3oC%C3%B3pia.pdf>).
- Flemming CA, Trevors JT (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution* 44:143-158.
- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ, Lim RP (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology* 48:275-289.
- García-Munõz E, Guerrero F, Parra G (2010). Intraspecific and Interspecific Tolerance to Copper Sulphate in Five Iberian Amphibian Species at Two Developmental Stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 312-321.
- García-Munõz E, Guerrero F, Parra G (2009). Effects of Copper Sulfate on Growth, Development, and Escape Behavior in *Epidalea calamita* Embryos and Larvae. *Archives for Environmental Contamination and Toxicology* 56:557-565
- García-París M, Montori A, Herrero P (2004) Amphibia. Lissamphibia. In: García-Munõz E, Guerrero F, Parra G (2010). Intraspecific and Interspecific Tolerance to Copper Sulphate in Five Iberian Amphibian Species at Two Developmental Stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 312–32.
- Gosner KL (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* 16(3): 183-190.
- Greulich K, Pflugmacher S (2003). Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology* 65: 329–336.
- Halliday T (2000). Do frogs make good canaries? *BioScience* 47: 143-146.
- Haywood LK, Alexander GJ, Byrne MJ, Cukrowska E (2004). *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium. *African Zoology* 39(2):163–74.
- Horne MT, Dunson WA (1995). Effects of Low pH, Metals, and Water Hardness on Larval Amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 500-505.
- ICN, Instituto de Conservação de Natureza, 2006. (acesso em 22/04/2011; <http://www.icn.pt>)
- Khargarot BS, Ray PK (1987). Sensitivity of Toad Tadpoles, *Bufo melanostictus* (Schneider), to Heavy Metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 38: 537-527.
- Lefcort H, Meguire RA, Wilson LH, Etinger WF. (1998). Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behaviour of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35:447–56.
- Lemus MJ, Chung KS (1999). Effect of Temperature on Copper Toxicity, Accumulation and Purification in Tropical Fish Juveniles *Petenia Kraussi* (Pisces: Cichlidae). *Caribbean Journal of Science*, 35: 64-69.
- Mocquot B, Vangronsveld J, Clijsters H, Mench M (1996). Copper toxicity in young maize (*Zea Mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. *Plant and Soil* 182:287-300.

- Natale GS, Ammassari LL, Basso NG, Ronco AE (2006). Acute and chronic effects of Cr(VI) on *Hypsiboas pulchellos* embryos and tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:261-267.
- Ortiz-Santaliestra ME, Marco A, Fernández MJ, Lizana M (2006). Influence of developmental stage on sensitivity to ammonium nitrate of aquatic stages of amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 105-111.
- Ortiz-Santaliestra ME, Fernández-Benítez MJ, Lizana M, Marco A (2010). Adaptation to osmotic stress provides protection against ammonium nitrate in *Pelophylax perezi* embryos. *Environmental Pollution* 158: 934–940.
- Pelgrom SMGJ (1994). Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content. *Aquatic Toxicology* 30: 117-135.
- Raimondo SM, Rowe CL, Congdon JD (1998). Exposure to coal ash impacts swimming performance and predator avoidance in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Herpetology* 32: 289–292.
- Rao DGVP, Khan MAQ (2000). Zebra mussels: enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. *Water Environment Research* 72(2):175-178.
- Redick MS, La Point TW (2004). Effects of sublethal copper exposure on behavior and growth of *Rana pipiens* tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72:706-710.
- Rowe CL, Kinney OM, Nagee RD, Congdon JD (1998). Elevated maintenance cost in an anuran (*Rana catesbeiana*) exposed to mixture of trace elements during embryonic and early larval periods. *Physiological Zoology* 71:27–35.
- Sakuma, M (1998). Probit analysis of preference data. *Applied Entomology and Zoology* 33: 339-347 (acesso em Dezembro de 2010; <http://bru.gmpc.ksu.edu/proj/priprobit/download.asp>).
- Seiler HG, Sigel H (1988). Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Dekker, Inc, New York. 1024pp.
- Semlitsch RD, Gibbons JW (1988). Fish predation in size-structured populations of treefrog tadpoles. *Oecologia* 75: 321-326.
- SIMRIA (Saneamento Integrado dos Municípios da Ria) (2006) (acesso em 23/04/2011; <http://www.simria.pt>).
- Snodgrass JW, Hopkins WA, Broughton J, Gwinn D, Baionno JA, Burger J (2004). Species-specific responses of developing anurans to coal combustion wastes. *Aquatic Toxicology* 66: 171-182.
- Zar JH (1996). Biostatistical Analysis, 3rd ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, pp. 662.