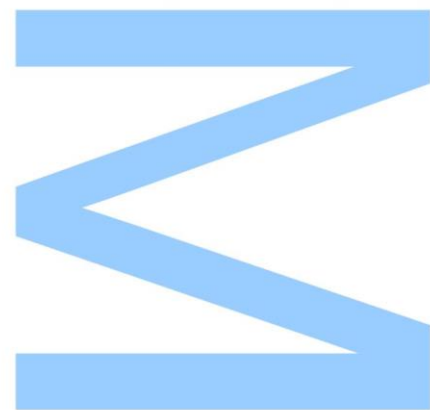


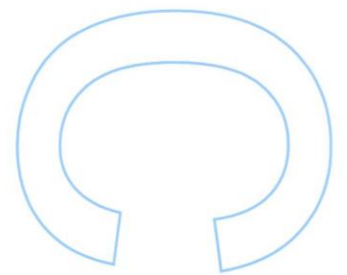
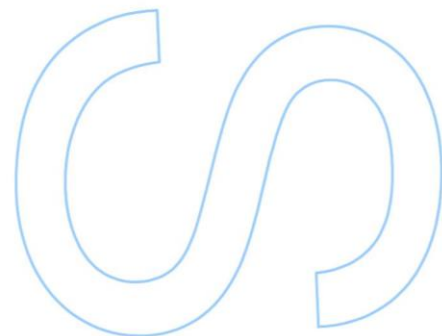
Influência do Cádmio nas Populações de *Artemia* em Portugal



Pedro Filipe Fernandes Mendes
Mestrado em Recursos Biológicos Aquático
Departamento de Biologia
2014

Orientador

Maria da Natividade Ribeiro Vieira
Professora Associada com Agregação
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

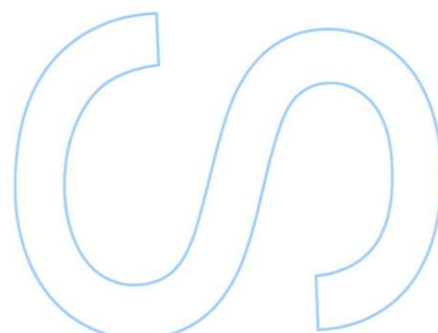
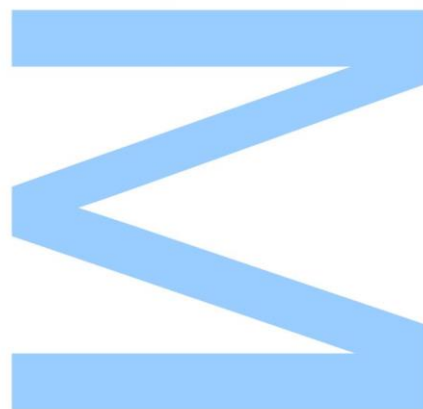




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Resumo

Atualmente, em Portugal, tem ocorrido uma invasão por parte de uma espécie de Artémia autóctone dos Estados Unidos da América (*A. franciscana*), que lentamente tem vindo a substituir as populações de *A. parthenogenetica* presentes nas salinas de todo o território português. A longo prazo, este fenómeno pode causar uma perda de biodiversidade nestes habitats. A competição entre estas espécies pode ser determinada por vários fatores, como por exemplo a presença de metais pesados no solo e água, podendo uma espécie estar mais adaptada à presença destes contaminantes no ambiente. O objetivo deste trabalho é, precisamente, comparar a sensibilidade de 3 estirpes de Artémia (*A. franciscana* do Great Salt Lake (EUA), *A. parthenogenetica* de uma salina costeira em Aveiro e *A. parthenogenetica* de uma salina interior em Rio Maior) à presença de cádmio, um metal pesado presente no ambiente, através de uma exposição aguda do mesmo durante 24h em grandes concentrações. Durante este período de tempo, os organismos foram expostos a diferentes concentrações (1900 µg/l – 3000 µg/l), tendo-se verificado a mortalidade ao fim desse período. Não foram encontradas diferenças significativas entre a estirpe de *A. parthenogenetica* de Aveiro e a *A. franciscana*, o que sugere que a presença de cádmio nem sempre beneficia a *A. franciscana* na competição com as outras estirpes autóctones da Europa. *A. parthenogenetica* de Rio Maior, por sua vez, mostrou-se muito mais sensível do que as outras estirpes estudadas. A hipótese mais provável é o facto de este metal não estar presente no seu habitat. Contudo, mais estudos serão necessários para confirmar estes resultados.

Palavras-chave: *Artemia*; cádmio; competição; espécies alóctones/autóctones; Portugal

Abstract

Recently, in Portugal, has been occurring an invasion of a United States of American native species of *Artemia* (*A. franciscana*) that has slowly taken over the native species of *A. parthenogenetica* present on Portuguese inland salt water bodies. On a long term, this occurrence can cause a loss of biodiversity in these habitats. Many factors can determine the competition between these species, such as the presence of heavy metals on the soil or water, being one species more adapted to the presence of a certain contaminant in their habitat. The main objective of this study is to compare the sensibility of 3 different strains of *Artemia* (*A. franciscana* from Great Salt Lake (USA), *A. parthenogenetica* from a costal salt water body near Aveiro and *A. parthenogenetica* from an inland salt water body near Rio Maior) to the presence of Cadmium, a heavy metal usually present in these types of habitat. The experimental procedure chosen was an acute toxicology test, on which organisms were exposed to high concentrations of these metal for 24 hours. During this period of time, *Artemia* individuals were exposed to different concentrations (1900 µg/l – 3000 µg/l) and, in the end of that period of time, mortality was measured. There were no significant differences between *A. parthenogenetica* from Aveiro and *A. franciscana*, suggesting that the presence of this contaminant not always benefit *A. franciscana* regarding the competition with the other European native strains. *A. parthenogenetica* from Rio Maior showed itself much more sensible then the other studied strains. This phenomenon could be due to its habitat not being polluted by this metal. However, more studies are needed to confirm these results.

Keywords: *Artemia*; cadmium; competition; native and exotic species; Portugal

Índice

1. Introdução.....	13
1.1. Taxonomia de <i>Artemia</i>	13
1.2. Morfologia e Biologia de <i>Artemia</i>	13
1.3. Biogeografia de <i>Artemia</i>	16
1.4. Ecologia e capacidade invasora.....	17
1.5. Poluição por cádmio e importância toxicológica do estudo.....	20
2. Metodologia.....	23
2.1. Escolha do poluente e das espécies; recolha e armazenamento de quisto.....	23
2.2. Eclosão de quistos.....	24
2.3. Preparação da solução de cádmio e dos testes toxicológicos.....	25
2.4. Análise estatística.....	25
3. Discussão e resultados.....	27
3.1. Toxicidade do cádmio.....	27
3.2. Competição interespecífica.....	29
4. Conclusão.....	31
5. Referências bibliográficas.....	33
6. Anexos.....	39

Índice de figuras e tabelas

Figura 1 – <i>Artemia salina</i> com tons azulados (adaptado de aquaportail.com)	14
Figura 2 – <i>Artemia monica</i> com tons alaranjados (adaptado de wikipedia.org)	14
Figura 3 – Representação da morfologia de <i>Artemia</i> (adaptado de Amat, 1985)	15
Figura 4 – Distribuição mundial das diferentes espécies de <i>Artemia</i> (adaptado de Garcia, 2009)	17
Figura 5 – Produção de <i>Artemia</i> a grande escala em salinas artificiais, Baía de São Francisco, EUA (adaptado de wikipedia.org)	19
Figura 6 – Quistos de <i>Artemia</i> , a seco e a eclodir, respetivamente (adaptado de MercadoLivre.com.br)	19
Figura 7 – Localização da salina de Aveiro (A) e da salina de Rio Maior (B) (adaptado de Pinto et. al., 2013)	24
Figura 8 – Curvas de mortalidade (percentagem transformada em probit da mortalidade vs logaritmo da concentração do metal) de estirpes de <i>Artemia parthenogenetica</i> de uma salina costeira (AP-AV) e de uma salina interior (AP-RM), e da espécie comercial <i>A. franciscana</i> (AF) depois de 24h de exposição ao cádmio	28
Tabela 1 – Concentrações de cádmio que causam 20% (LC20) e 50% (LC50) de mortalidade em náuplios das 3 estirpes de <i>Artemia</i> após 24h de exposição. AP-AV – <i>Artemia parthenogenetica</i> de Aveiro; AP-RM – <i>A. parthenogenetica</i> da salina interior de Rio Maior; AF – espécie exótica de <i>Artemia franciscana</i> . 95% CL – Intervalo de confiança de 95%	28
Tabela 2 – Resultados do Teste T-Student para as duas espécies onde os valores das concentrações são os mesmos (<i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro e <i>A. franciscana</i>). 95% CL – Intervalo de confiança de 95%	39

1. Introdução

1.1 Taxonomia de *Artemia*

Artemia é um género que pertence ao filo Arthropoda (Siebold e Stannius, 1848), subfilo Crustacea (Pennant, 1777), classe Branchiopoda (Latreille, 1806), ordem Anostraca (Sars, 1867), e família Artemiidae (Grochowski, 1896).

A primeira vez que este crustáceo foi descrito data de 1755, quando Schlösser descreveu uma população, já extinta atualmente, que habitava as salinas de Lymington, em Inglaterra. Três anos mais tarde, em 1758, Linneo denominou esta mesma espécie como *Cancer salinus* (Garcia, 2009; López, 2012). Esta denominação foi usada durante muito tempo, mais precisamente até 1919, quando William Elford Leach a definiu como *Artemia salina* (Amat, 1985), nome que ainda hoje é usado para identificar a espécie. Contudo, com os avanços e evolução das técnicas de identificação genómica e morfológica, foram definidas novas espécies (Amat *et al.*, 2005), que até à data eram todas classificadas como sendo *Artemia salina* (Hontoria e Amat, 1992).

Atualmente, o género *Artemia* compreende um grupo de seis espécies bissexuais (Amat *et al.*, 2005): *A. franciscana* (Kellogg, 1906), *A. persimilis* (Piccinelli & Prosdocimi, 1968), *A. salina* (Leach, 1819), *A. urmiana* (Gunther, 1890), *A. sinica* (Cai, 1989) e *A. tibetiana* (Abatzopoulos *et al.*, 1998). Além destas espécies, também é incluída no género uma espécie partenogenética (*A. parthenogenetica*) que apresenta grande diversidade em populações diferentes, não sendo consensual entre autores que seja apenas uma espécie e não várias diferentes (Amat *et al.*, 2005).

1.2 Morfologia e Biologia de *Artemia*

Artemia, no geral, apresenta um corpo alongado, fino e segmentado, revestido por um exoesqueleto frágil, com um tamanho compreendido entre os 8-10mm nos machos e 10-12mm nas fêmeas. Na espécie partenogenética, alguns indivíduos atingem, por vezes os 20mm de comprimento (Amat, 1985). *Artemia* apresenta, também, um leque variado de cores, que pode variar com o aumento da salinidade. Geralmente, a cor exibida é vermelha alaranjada com alguns tons de azul, mas, quando em águas com uma salinidade relativamente elevada, podem apresentar tons de vermelho muito carregado (Figuras 1 e 2) (Amat, 1985).

No que toca à morfologia, podemos dividir o corpo em três zonas distintas, sendo estas a cabeça, o tórax e o abdómen, facilmente observáveis e distinguíveis a olho nu (Figura 3) (Amat, 1985).

A cabeça está dividida em cinco segmentos, onde se podem identificar vestígios do olho naupliar, formado por três ocelos. Nas extremidades laterais da cabeça verifica-se a existência de dois pedúnculos que têm, no fim, dois olhos (no estado adulto). Este sistema olho-pedúnculo pode servir de distinção de espécies (comprimento do pedúnculo) e sexo do indivíduo (nas espécies bissexuais), apresentando os machos maior largura do mesmo. Quanto ao olho, os machos também têm, geralmente, os olhos ligeiramente maiores (Amat, 1985). Na base de cada um destes dois pedúnculos, nascem uma antena e uma anténula. Estes órgãos também servem para distinguir macho de fêmea, uma vez que o macho apresenta as antenas em forma de tenaz, que servirá para se agarrarem à fêmea aquando da copulação. Nos três últimos restantes segmentos encontra-se a boca, que possui um par de mandíbulas e dois pares de maxilas (Amat, 1985).

O tórax apresenta 11 segmentos, cada um com um par de apêndices foliáceos denominados de filópodes, que por sua vez apresentam exopoditos (estruturas finas e permeáveis a iões que funcionam como brânquias e órgão osmoregulador) e endopoditos (locomoção/orgãos natatórios) (Amat, 1985).

O abdómen é constituído por 8 segmentos. Os primeiros dois segmentos são chamados de segmentos sexuais, pois é aqui que podemos encontrar o saco ovífero e o útero, nas fêmeas, ou o pénis e a vesícula seminal, nos machos. A seguir, encontram-se seis segmentos que terminam numa última estrutura, o télson, onde está assente a cauda, com uma ligeira bifurcação, que apresenta também dimorfismo. O tipo de bifurcação é uma das características que causa controvérsia na atribuição de uma só espécie às várias populações de *A. parthenogenetica* (Amat, 1985).



Fig. 1 – *Artemia salina* com tons azulados.



Fig. 2 – *Artemia monica* com tons alaranjados.

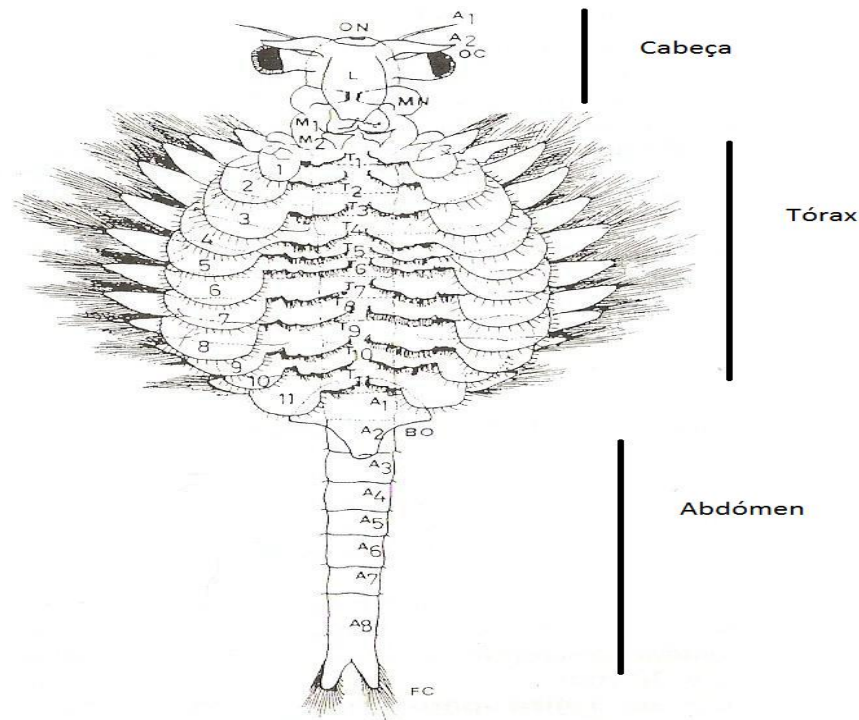


Fig. 3 – Representação da morfologia de *Artemia* (adaptado de Amat, 1985)

Quanto à biologia da espécie, *Artemia* é um crustáceo evolutivamente bastante primitivo no que toca ao seu sistema nervoso e circulatório, sendo estes pouco complexos. O seu sistema nervoso é constituído apenas por uma cérebro rudimentar e uma cadeia de gânglios distribuída por todo o corpo pela parte ventral. Já o sistema circulatório é aberto, apresentado um coração em forma de tubo que é aberto em diversas partes, por onde circula a hemolinfa. Todas as trocas gasosas entre o organismo e o meio circundante são feitas através dos exopoditos, estrutura referida na secção da morfologia como brânquias e órgão osmoregulador de *Artemia*. A principal capacidade fisiológica que permite que *Artemia* habite sem problemas ambientes salinos extremos (onde se verifica baixo teor de oxigénio dissolvido) é a presença de uma hemoglobina na hemolinfa (Hb3), tendo esta grande afinidade com o oxigénio. Isto permite que o organismo não precise de aumentar a taxa respiratória, aumentando apenas a concentração da hemoglobina em questão (Amat, 1985).

Na alimentação, os filópodes estão encarregues de fazer chegar à boca qualquer alga unicelular, protozoário ou bactéria que for filtrada pela *Artemia* a partir do meio. O seu sistema digestivo é, também ele, bastante primitivo. Após a ingestão do alimento, este chega a um par de ventrículos globulares que funcionam como estômago, sendo depois expelido pelo ânus.

A reprodução de *Artemia*, por sua vez, é bastante eficiente e evoluída. Estes organismos podem apresentar reprodução bissexual e assexual, apenas com presença de

fêmeas. De acordo com as condições do meio, as fêmeas podem produzir dois tipos de descendência: se as condições do meio forem favoráveis e ótimas para *Artemia*, o embrião desenvolve-se no útero, de onde nascem logo os náuplios (tipo ovovivípara); ou, se as condições do meio não forem favoráveis (alta/baixa temperatura/salinidade muito alta, baixo teor de oxigénio, etc.), o desenvolvimento do embrião cessa em estado de gástrula e este é coberto por uma camada de córion segregada por glândulas localizadas no útero, as glândulas de casca (tipo ovípara) (Amat, 1985). De seguida, a fêmea liberta esses mesmos quistos, que podem permanecer conserváveis por grandes períodos de tempo. Quando eclodidos, fornecendo luz, temperatura, e salinidade ideais (Madhu *et al.*, 2009), cada quisto vai dar origem a um náuplio, o qual vai progredindo ao longo de 18 estados larvares (Vanhaecke & Persoone, 1984). Nos primeiros estados larvares, os náuplios alimentam-se das suas reservas vitelinas, não estando o seu sistema digestivo completamente desenvolvido aquando dos primeiros dias de vida (Amat, 1985).

1.3 Biogeografia de *Artemia*

Artemia está dispersa praticamente por todo o mundo (Figura 4), sendo a única exceção a sua inexistência, pelo que se sabe até hoje, na Antártida (Garcia, 2009).

Começando pelas espécies de interesse neste estudo, *A. franciscana* é uma espécie endémica de todo o continente americano, mas, com o passar do tempo, tem-se verificado a sua dispersão por diversas partes do mundo. Isto deve-se à sua comercialização e introdução intencional em salinas (Amat, 1985; Amat *et al.*, 2007), problemática que irá ser também estudada neste trabalho. A outra espécie a ser estudada será a *A. parthenogenetica*, que, segundo muitos autores (Amat *et al.*, 2007; Browne e Wanigasekera, 2000), tem vindo a ser substituída pela *A. franciscana* nos seus próprios habitats, devido a vários factores que beneficiam esta última na competição. Encontra-se principalmente na bacia do Mediterrâneo, mas já foi verificada a sua existência na costa atlântica africana e na Ásia (López, 2012). No Mediterrâneo, ocorre juntamente com *A. salina*, não havendo qualquer competição pelo facto de ocorrerem em diferentes alturas do ano (Amat *et al.*, 2007; Hontoria e Amat, 1992). Muitos autores também defendem que a denominação desta espécie merece uma reforma, visto haver muitas populações bastante distintas umas das outras, de acordo com o local onde vivem (Amat *et al.*, 1995). Por exemplo, neste estudo, serão usadas duas estirpes muito distintas de *A. parthenogenetica*, uma de uma salina interior de Rio Maior e outra de uma salina costeira, perto de Aveiro.

Além destas, ainda se pode verificar a ocorrência de mais 4 espécies:

- *Artemia persimilis*, espécie originária da América do Sul, que se pensava ser exclusivamente endémica da Argentina, mas foi recentemente encontrada também no Chile (Gajardo *et al.*, 2001; Piccinelli & Prosdocimi, 1968);
- *Artemia sinica*, que é endémica da Ásia, encontrando-se principalmente na China e Mongólia (Cai, 1989);
- *Artemia tibetiana*, que se encontra apenas em lagos salgados do Tibete (Abatzopoulos *et al.*, 1998);
- *Artemia urmiana*, endémica do Lago Urmia, no Irão, de onde provém o seu nome (Gunther, 1890).

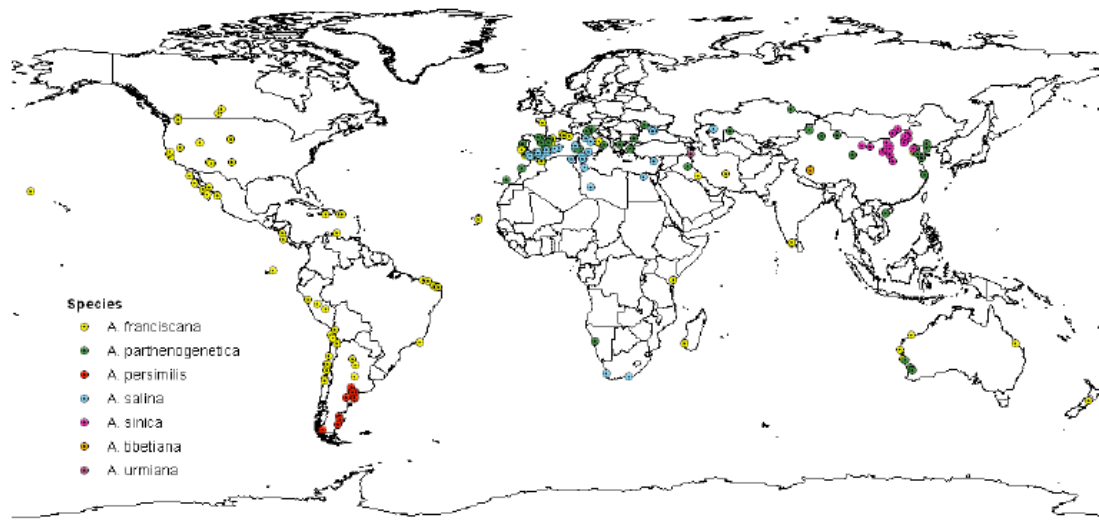


Fig. 4 – Distribuição mundial das diferentes espécies de *Artemia* (adaptado de Garcia, 2009)

1.4 Ecologia e capacidade invasora

O principal habitat de *Artemia* são as salinas e grandes lagos de água salgada, tanto interiores como costeiros, quer em zonas tropicais, frias ou temperadas (Persoone & Sorgeloos, 1980) (Figura 5). Estes ecossistemas possuem características que, para a maioria dos seres vivos, são adversas. Contudo, *Artemia* desenvolve-se bem neste tipo de locais, onde se verifica uma salinidade muito alta, podendo sobreviver a salinidades de até 370 ppt. Nestas condições, porém, *Artemia* não se reproduz, devido ao facto de ter de gastar todas as suas energias para osmorregulação (transporte activo), pondo em risco a sobrevivência da população (Persoone & Sorgeloos, 1980). Além da salinidade, outros factores podem determinar a existência ou não de *Artemia* num determinado local, como a temperatura, disponibilidade de alimento, presença de predadores, concentração de oxigénio dissolvido e

finalmente, e não menos importante, a presença de outras estirpes e espécies de *Artemia* que possam competir pelo mesmo nicho ecológico.

Quanto ao limite inferior de tolerância à salinidade, não há um valor estabelecido, sendo o mesmo definido pelos valores que favoreçam o aparecimento de predadores (Amat, 1985; Van Stappen, 2002), uma vez que *Artemia* não possui nenhum mecanismo anatómico de defesa contra os mesmos.

O intervalo de temperaturas em que se pode encontrar *Artemia* é bastante alargado, podendo ser observada na natureza entre os 5 e os 35°C, mas a temperatura ótima, segundo Amat, 1995, está compreendida entre os 25 e os 30°C. Contudo, este intervalo varia consideravelmente com as diferentes espécies (Van Stappen, 2002). Geralmente, a solubilidade do oxigénio é inversamente proporcional à temperatura e salinidade. Assim, é facilmente deduzível que estes ecossistemas sejam bastante anóxicos (Amat, 1985). Para contrariar esta deficiência em oxigénio disponível, *Artemia* recorre ao metabolismo anaeróbico, utilizando a hemoglobina Hb3 em concentrações muito grandes para facilitar a captação de oxigénio. Quando isto acontece, a sua cor fica muito mais vermelha/alaranjada.

Assim, o que permite assegurar a sua sobrevivência e reprodução são os seus vários mecanismos de adaptação fisiológica às condições que poucos competidores/predadores conseguem.

Os quistos (Figura 6) produzidos pelas glândulas de casca uterinas são o factor principal da boa taxa de dispersão e reprodução de *Artemia*. Estes quistos são o elemento chave no que diz respeito à colonização de *Artemia* em novos locais, uma vez que são muito resistentes e apenas eclodem quando as condições de temperatura, fotoperíodo e salinidade são ideais (Amat, 1985).

A dispersão pelos diferentes biótopos é efetuada de forma contínua (i.e. ocupação gradual de áreas, a partir de um ponto de colonização inicial, à medida que aumenta o número de indivíduos), quer por processos naturais (e.g. através de quistos dispersos por aves limícolas ou vento), quer por processos artificiais (e.g. através da inoculação intencional de quistos em salinas) (Amat *et al.*, 2005).

Artemia está, geralmente, presente em diversos tipos de ecossistemas hipersalinos, que são ambientes extremos de alta importância ecológica e económica (Crisman *et al.*, 2009). Nas últimas décadas, populações autóctones de *Artemia* têm sido afectadas negativamente em várias regiões da Europa por várias razões, incluindo a competição por espécies alóctones invasoras, como é o caso da *A. franciscana*. Estas espécies alóctones têm demonstrado uma vantagem competitiva, nomeadamente um período pré-reprodutivo mais curto e maior número de ninhadas, sobre outras espécies e estirpes europeias (*A. parthenogenetica* e *A. salina*) (Amat *et al.*, 2007).



Fig. 5 – Produção de *Artemia* a grande escala em salinas artificiais, Baía de São Francisco, EUA (adaptado de wikipedia.org, 2009)



Fig. 6 – Quistos de *Artemia*, a seco e a eclodir, respetivamente (adaptado de MercadoLivre.com.br, 2000)

A maior tolerância para variações abióticas, além da menor sensibilidade à poluição e a maior capacidade de reprodução têm sido as razões apontadas como os factores mais importantes que podem favorecer a *Artemia franciscana* na competição com as espécies autóctones europeias (Amat *et al.*, 2007). Por exemplo, Browne & Wanigasekera, 2000,

verificaram que *A. franciscana* é mais tolerante a uma alta temperatura (30°C) do que a *A. salina*.

Contudo, alguns estudos têm demonstrado que algumas substâncias, tais como contaminantes químicos e metais pesados, podem nem sempre beneficiar a *A. franciscana* na competição com as espécies de *Artemia* autóctones europeias. De facto, provou-se que alguns biótipos de *A. parthenogenetica* são mais tolerantes a alguns metais pesados (e.g. mercúrio e cádmio) e insecticidas do que a *A. franciscana* (Varó *et al.*, 1998; Sarabia *et al.*, 2002). Estes metais pesados estão presentes na maioria dos ecossistemas onde se pode encontrar *Artemia*, principalmente devido a factores antropogénicos. Assim, é importante compreender a influência destes elementos na competição entre espécies, com vista a facilitar a resolução do problema da introdução de espécies exóticas e erradicação das espécies autóctones, uma vez que esta problemática pode estar a ser causada pelo homem.

No sul da Europa, o período de tempo onde as condições são mais extremas (maior temperatura e menor humidade) é o verão, altura em que as salinas têm pouca água e a temperatura da mesma pode chegar aos 30°C (Vieira & Bio, 2011). No fim do verão, onde ainda se verificam estas condições, os náuplios que começam a eclodir poderão estar sujeitos a uma maior concentração de metais pesados e outros poluentes, uma vez que a quantidade de água nas salinas é menor (Rodrigues *et al.*, 2011).

1.5 Poluição por cádmio e sua importância toxicológica

Cádmio é um metal de transição branco azulado, dúctil, maleável (Sienko, 1976) e não é conhecida qualquer função biológica associada (Rainbow, 1985). É, portanto, um elemento não essencial com grande toxicidade e é facilmente acumulável pelos seres vivos aquáticos a partir do ambiente (Del Ramo *et al.* 1993), sendo este um problema de longa data nos habitats aquáticos em geral (Nriagu, 1988; Nriagu & Pacyna, 1988). É também uma substância tóxica de referência, estando disperso por todo o tipo de habitats. O seu mecanismo de toxicidade está relativamente bem estudado e compreendido. Até hoje, não há registo de qualquer episódio catastrófico de contaminação de salinas por cádmio a um nível que seja potencialmente perigoso para o ambiente e para os seres vivos que nelas habitam, além de ser pouco biodisponível em grandes valores de salinidade, que caracterizam este tipo de locais (Rahimi *et al.*, 2010).

Contudo, a atmosfera é uma fonte contínua de cádmio para a água das salinas. As erupções vulcânicas e a respiração das plantas têm sido as razões apontadas para a presença de cádmio na atmosfera (Williams & Harrison, 1984). A sua entrada no ecossistema pode também ocorrer de uma maneira indireta, através do escoamento de locais de despejo de lixo

e campos agrícolas, e de maneira direta, por efluentes de estações de tratamento de esgotos, indústrias de fundição e minas (ATSDR, 1997).

Recentemente, tem-se verificado uma diminuição da salinidade em grandes lagos de água salgada e salinas como consequência da mudança do clima (Sarabia *et al.*, 2003). Este estudo ganha importância com este factor, uma vez que a absorção e toxicidade do cádmio em organismos aquáticos é muito afetada pela salinidade, aumentando à medida que a concentração de sal diminui (Blust *et al.*, 1992).

Sendo *Artemia* a principal fonte de alimentação de larvas de peixes carnívoros e crustáceos em aquacultura, este estudo de contaminação é relevante, quer a nível ecológico, quer a nível económico, pois a bioacumulação do metal em questão poderá passar de nível trófico em nível trófico, chegando finalmente ao consumidor final, o homem.

Do ponto de vista toxicológico, *Artemia* é um dos organismos mais importantes para testes de toxicidade, principalmente devido à sua reduzida variabilidade genética e grande resistência/adaptação a condições abióticas, já estudada por vários autores (e.g. Okamura *et al.*, 2000; Crisinel *et al.*, 1994). Este factor é considerado uma vantagem sobre os outros organismos, normalmente usados na área da ecotoxicologia, sendo estes menos adaptados a várias condições abióticas, tanto em laboratório como no ambiente (Nunes *et al.*, 2006).

Assim, a melhor forma de verificar a resistência de uma certa espécie a um determinado poluente, será através de um teste de toxicidade aguda, onde se poderá expor náuplios com poucas horas de vida a uma determinada concentração do contaminante, verificando-se depois a mortalidade. Esta mortalidade característica das primeiras 24-48 horas de vida poderá fornecer dados importantes no que toca à competição interespecífica e resistência a um poluente, uma vez que uma menor mortalidade leva à persistência dessa mesma espécie nos ecossistemas.

O objetivo deste estudo foi, portanto, comparar a sensibilidade de *Artemia* autóctone de Portugal e de *Artemia* alóctone ao stresse causado por pequenas concentrações de cádmio na água e verificar se a toxicidade de cádmio influencia a competição interespecífica.

2. Metodologia

2.1 Escolha do poluente e das espécies; recolha e armazenamento de quistos

Inicialmente, estava previsto testar-se a sensibilidade das estirpes de *Artemia* ao mercúrio e ao cádmio, dois poluentes presentes nos ambientes estudados. Muitos testes foram feitos, mas o resultado para o mercúrio foi inconclusivo, tendo-se obtido grande discrepância em réplicas de testes. Uma razão para tal erro poderá ser o uso de cloreto de mercúrio (única fonte de mercúrio disponível na altura da elaboração do estudo), que facilmente deposita e não é muito solúvel na água pura usada para fazer as soluções. Por conseguinte, em quantidades tão baixas (μl), o factor de erro tornava-se muito grande, tendo o teste com este metal sido excluído do trabalho. Assim, foi apenas usado o cádmio, conseguindo-se chegar a resultados conclusivos acerca da toxicidade do mesmo.

A temperatura era outro factor que se pensou estudar, realizando os ensaios a diferentes temperaturas, mas, após alguma pesquisa bibliográfica, verificou-se que não influenciava de todo a absorção dos metais pesados em *Artemia* (Almeida *et al.* (in press)).

Para elaboração deste trabalho foram utilizadas duas estirpes de *Artemia parthenogenetica*, uma de uma salina costeira de Aveiro e outra de uma salina interior de Rio Maior (Figura 7) e uma espécie comercializada de *Artemia franciscana*, endémica do Great Salt Lake (EUA). Estas espécies foram selecionadas para este estudo por duas razões: habitam diferentes ecossistemas (salinas costeiras, salinas interiores, grandes lagos) e têm sido estudadas ao longo dos tempos por vários autores, havendo assim um bom conhecimento da sua ecologia (Vieira, 1988; Vieira, 1990; Pinto *et al.*, 2013).

Os cistos de *Artemia parthenogenetica* de Aveiro foram recolhidos numa salina costeira, onde se sabe que em alguns períodos do ano está contaminada com diversos poluentes, entre eles mercúrio e cádmio (e.g. Pereira *et al.*, 2009). Os cistos de *A. parthenogenetica* de Rio Maior, por sua vez, foram recolhidos numa salina interior, que, aparentemente, não está exposta a qualquer tipo de contaminação substancial. De acordo com Calado e Brandão, 2009, esta salina é abastecida por água de um depósito de sal gema, situado na Serra dos Candeeiros, classificado como não poluído. Os cistos de *A. franciscana* são de origem comercial (Ocean Nutrition – batch 20809124).

Todos os cistos foram armazenados num local sem humidade, escuro, e a baixa temperatura (4-5°C).

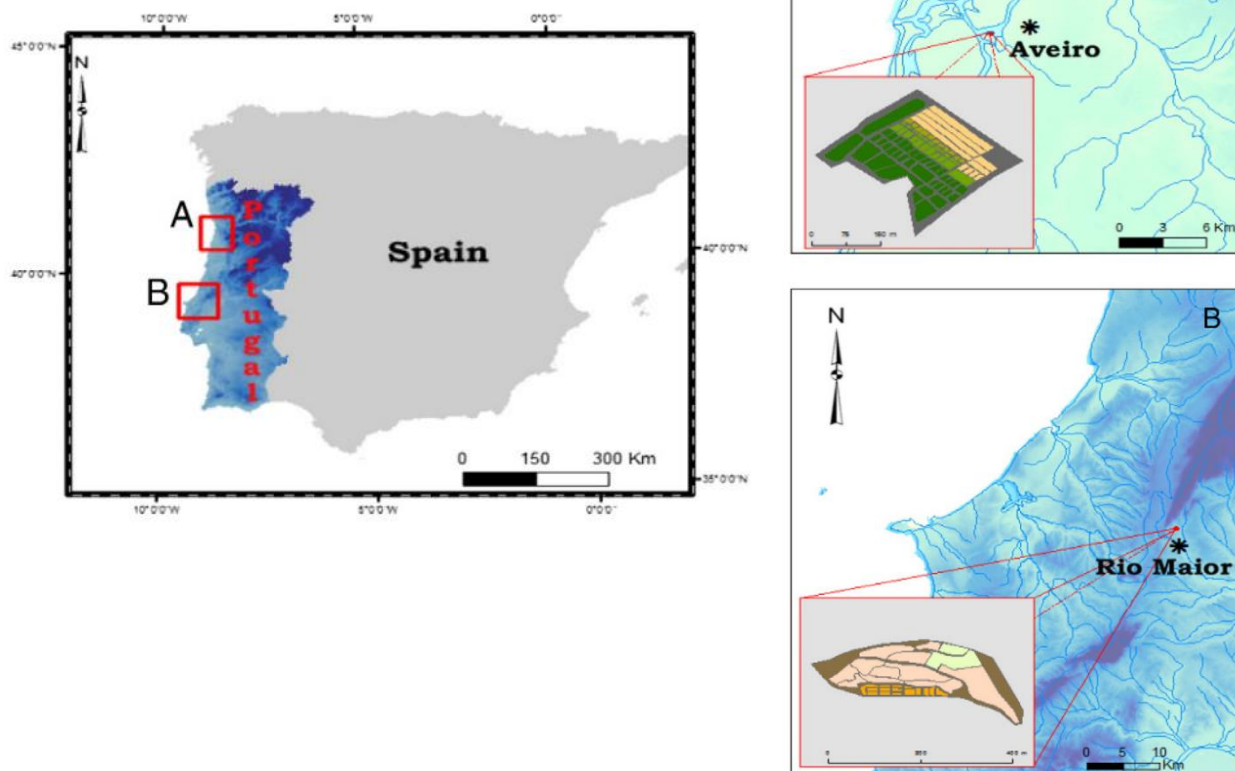


Fig. 7 – Localização da Salina de Aveiro (A) e da salina de Rio Maior (B) (adaptado de Pedro *et al.*, 2013)

2.2 Eclosão de quistos

Para a eclosão dos quistos, foi usada água do mar artificial. Para tal, dissolveu-se sal marinho (Tropic Marin - Wartenberg, Germany) em a água ultra pura com uma concentração de 35g/L. Os quistos foram então colocados num recipiente cónico, ao qual se juntou a água previamente feita, deixando a eclodir com aeração contínua e a uma temperatura na ordem dos 22-25°C. Ao fim de 24 horas, os náuplios recém-nascidos foram separados das cascas e quistos não eclodidos, e colocados num novo recipiente com água do mar artificial e contínuo fornecimento de oxigénio durante mais 24 horas. Neste período, os náuplios devem maturar e atingir o estado larvar de pré-nutrição exógena Instar II ou Instar III (Vanhaecke & Persoone, 1984).

2.3 Preparação da solução de cádmio e dos testes toxicológicos

Os testes de toxicidade aguda foram realizados em laboratório, utilizando os princípios gerais descritos por Varó *et al.* (1998). Foi feito um teste preliminar para cada espécie (AP-RM, AP-AV, AF) com o objetivo de definir as concentrações onde se obtém um intervalo de mortalidade de 5% – 95%, factor este que define a validade do teste (Vanhaecke & Persoone, 1984). Após teste preliminar, as concentrações escolhidas para cada espécie foram: AP-RM: 1900, 2100, 2300, 2500, 2600, 2700 ($\mu\text{g/L}$); AP-AV: 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000 ($\mu\text{g/L}$); AF: 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000 ($\mu\text{g/L}$). Depois de definidas as concentrações, foi feita uma solução mãe de cloreto de cádmio (ClCd) (100mg/L) diluído em água ultra pura, para fazer as diluições necessárias para cada ensaio. Apesar de ter sido usado cloreto de cádmio, todas as concentrações descritas neste trabalho serão expressas apenas em concentração de cádmio.

Cada teste foi realizado em placas de 96 micro-poços de 1ml, usando 315 náuplios, distribuídos por cada poço da seguinte forma: 6 concentrações, 3 réplicas de cada concentração, 15 náuplios por poço. Foi também adicionado a cada teste um grupo controlo (apenas água do mar artificial) com 3 réplicas, também usando 15 indivíduos por poço.

Depois de pipetar os náuplios, adicionar a quantidade de poluente e perfazer com água do mar artificial para obter cada concentração, as placas foram colocadas no escuro, durante 24h, verificando-se, de seguida, a mortalidade em cada um dos poços. O critério usado (mortalidade) foi definido como a ausência de movimento durante 10 segundos, verificado através da observação ao microscópio ótico (ZEISS – Stemi 2000-C). Os testes foram feitos em simultâneo para eliminar possíveis factores de erro e todas as placas foram devidamente cobertas para evitar evaporação e contaminação accidental.

2.4 Análise estatística

Para cada teste de toxicidade efetuado com as três diferentes estirpes, foi obtida uma reta de toxicidade transformando as percentagens de mortalidade na unidade estatística “probit” e comparando-as com respectiva concentração logaritmicada do metal. As concentrações medianas letais (CL50) e as concentrações que causam 20% de mortalidade (CL20) foram calculadas a partir das equações obtidas nas retas acima referidas, com um intervalo de confiança de 95%. O cálculo do CL20 é indicado devido ao seu potencial interesse para estudos de avaliação de risco, neste caso, na área da contaminação de salinas e seres vivos associados.

Uma vez que as concentrações de *Artemia parthenogenetica* da salina interior de Rio Maior não são as mesmas que as das outras duas estirpes (AP-AV e AF), não podem ser analisadas em conjunto com as mesmas. Assim, este grupo será analisado através de uma análise crítica e empírica. Em relação às estirpes que obedecem aos requisitos pedidos para a análise estatística conjunta, foi feito um Teste T-Student para amostras independentes.

Para todos os testes e gráficos, foi usado o SPSS Statistics 20.0 e o Microsoft Excel 2010.

3. Discussão e Resultados

3.1 Toxicidade do cádmio

As curvas de toxicidade das três estirpes de *Artemia* (AP-AV, AP-RM, AF), obtidas a partir dos testes de toxicidade aguda, são apresentadas na Figura 8. Nos ensaios, a mortalidade obtida nos poços controlo foi 0% em todas as estirpes. A possível evaporação da água dos poços, durante as 24 horas do teste, foi desprezada, assim como a possível absorção/deposição de cádmio nas paredes dos micropoços, devido ao facto de que, se ocorreu, terá sido constante em cada um dos ensaios. Os valores obtidos dos LC50 e LC20 variaram, respetivamente, entre 2231,160 - 2667,784 e 2065,119 - 2590,036 µg/L (Tabela 1). A estirpe que demonstrou maior resistência foi a *A. franciscana*, apresentando um LC50 de 2667,784 µg/L, valor ligeiramente superior ao LC50 da *A. parthenogenetica* de Aveiro (2660,574 µg/L). Por sua vez, a estirpe de *A. parthenogenetica* de Rio Maior apresentou um LC50 bastante inferior, na ordem dos 2231,160 µg/L.

Não foram encontradas diferenças significativas entre AF e AP-AV no que toca a sensibilidade ao cádmio, tendo sido testadas em conjunto e com as mesmas concentrações do metal. AP-RM apresentou uma sensibilidade muito superior em relação às duas estirpes acima mencionadas, uma vez que, após o teste preliminar, as concentrações escolhidas foram muito menores. Através da análise dos valores, conclui-se que há diferenças significativas na sensibilidade desta estirpe em comparação com as outras duas mais resistentes. Estes resultados confirmam que, possivelmente, tendo em conta o facto da água da salina de Rio Maior não apresentar concentrações significativas de cádmio (Calado & Brandão, 2009), esta estirpe não evoluiu um mecanismo de resistência natural como a sua homóloga de Aveiro.

Em relação às duas espécies onde não foram verificadas diferenças significativas, já foi documentado que ambos os locais estão contaminados, em alguns períodos do ano, com metais pesados, incluindo o cádmio (Jayasekara *et al.*, 1986; Almeida *et al.* (in press)). Contudo, AP-AV pode ter sido exposta, ao longo do tempo, a maiores concentrações de cádmio, uma vez que, ainda que em pequenas quantidades, já foi verificada a presença deste contaminante nas águas da Ria de Aveiro (Figueira *et al.*, 2011). Assim, essa exposição prévia ao contaminante pode ter contribuído para a menor sensibilidade da população de AP-AV em relação à população de Rio Maior. Em relação a AF, é importante referir que, também esta, está exposta a pequenas concentrações de cádmio, de acordo com Brinx *et al.*, 2003. No referido trabalho, foi analisada a água do Great Salt Lake, Utah, USA, e verificada a presença do metal em concentrações inferiores a 0,05 mg/L. Já no trabalho de Figueira *et al.*, 2011, foi

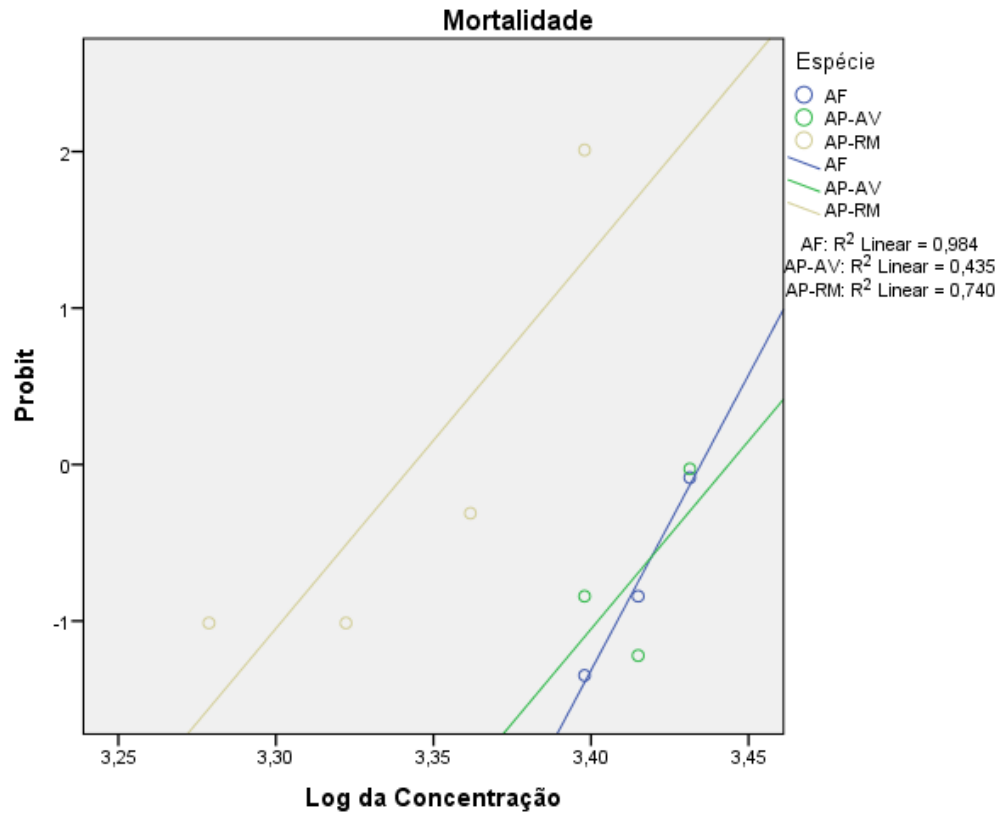


Fig. 8 – Curvas de mortalidade (percentagem transformada em probit da mortalidade vs logaritmo da concentração do metal) de estirpes de *Artemia* parthenogenetica de uma salina costeira (AP-AV) e de uma salina interior (AP-RM), e da espécie comercial *A. franciscana* (AF) depois de 24h de exposição ao cádmio.

Estirpe de <i>Artemia</i>	LC ₂₀	LC ₅₀
	(95% CL)	(95% CL)
	(µg/L)	(µg/L)
<i>A. parthenogenetica</i> (AP-RM)	2065,119 (1409,055 – 2239,515)	2231,160 (1907,228 – 2496,430)
<i>A. parthenogenetica</i> (AP-AV)	2570,866 (2182,042 – 2660,652)	2660,574 (2508,547 – 2818,013)
<i>A. franciscana</i> (AF)	2590,036 (2463,115 – 2647,603)	2667,784 (2599,148 – 2739,985)

Tabela 1 – Concentrações de cádmio que causam 20% (LC20) e 50% (LC50) de mortalidade em náuplios das 3 estirpes de *Artemia* após 24h de exposição. AP-AV – *Artemia parthenogenetica* de Aveiro; AP-RM – *A. parthenogenetica* da salina interior de Rio Maior; AF – espécie exótica de *Artemia franciscana*. 95% CL – Intervalo de confiança de 95%.

verificada a concentração no solo lameoso da Ria de Aveiro de até 0,16 mg/Kg. Esta diferença de concentrações do metal no ambiente aparenta ser o principal fator que influencia a competição num determinado local, uma vez que *Artemia* é um organismos que prospera num grande leque de temperatura e salinidade, as duas espécies têm o mesmo regime alimentar e os locais de onde as populações são oriundas têm relativamente a mesma latitude.

3.2 Competição interespecífica

A população de *A. parthenogenetica* de Rio Maior é, taxonomicamente, da mesma espécie que a população de Aveiro, mas é muito mais sensível; a contaminação verificada é maior na Ria de Aveiro do que no Great Salt Lake, e inexistente em Rio Maior; os resultados dos testes de toxicidade foram semelhantes em *A. parthenogenetica* de Aveiro e *A. franciscana*.

A partir dos tópicos acima referidos, podemos deduzir que o facto de haver diferenças significativas entre as duas populações de *A. parthenogenetica*, leva a crer que a *A. parthenogenetica* de Aveiro tenha, realmente, desenvolvido e adaptado um mecanismo de resistência ao poluente necessário para conseguir prosperar neste habitat, uma vez que a concentração encontrada na Ria de Aveiro é existente, ao contrário da Salina de Rio Maior, onde não está documentada a presença deste metal pesado. Ao mesmo tempo, o mecanismo de defesa desenvolvido por esta população de Aveiro equipara-a à *A. franciscana* no que toca a sensibilidade ao cádmio, não havendo diferenças significativas. Assim, os resultados obtidos confirmam que *A. franciscana* pode nem sempre ser beneficiada na competição com as estirpes europeias, principalmente no que toca a stress causado pela exposição aguda a metais pesados característica dos habitats estudados. É importante salientar que os quistos de *A. franciscana* usados neste estudo são de origem comercial, tendo, provavelmente, permanecido muito pouco tempo em contacto com a água do Great Salt Lake. Este factor pode ser importante, uma vez que a presença de contaminantes na fase de quisto pode alterar a mortalidade e sensibilidade dos náuplios (Varó *et al.*, 2006).

Em casos de competição entre *A. franciscana* e a espécie *A. parthenogenetica*, a potencial influência do stress químico agudo poderá depender mais da sensibilidade específica de cada população, e não tanto da espécie em questão. Para testar esta hipótese, e devido à sua alta sensibilidade ao cádmio, *A. parthenogenetica* de Rio Maior poderia, em futuros trabalhos, ser testada num ensaio de longa duração com exposições crónicas a cádmio, isto com o objetivo de verificar se esta população desenvolveria uma resistência semelhante à população de Aveiro. Num possível cenário real de competição entre *A. franciscana* e a população de *A. parthenogenetica* de Rio Maior, a alta sensibilidade da última

não lhe permite competir com a espécie invasora, sendo este local o que requer mais atenção por parte das entidades competentes, uma vez que está muito susceptível à invasão (a acontecer atualmente) e à erradicação completa da população nativa desta zona.

Por sua vez, a competição entre *A. franciscana* e população de *A. parthenogenetica* de Aveiro é mais complicada de definir. Já foi verificado neste estudo que a sensibilidade entre as duas estirpes é muito semelhante. Contudo, há outros fatores que influenciam a dinâmica destas populações de *Artemia*, como a temperatura (Browne & Wanigasekera, 2000), o período pré-reprodutivo e o número de ninhadas (Amat *et al.*, 2007). De acordo com estes estudos, a espécie invasora tem menor sensibilidade à temperatura, maior número de ninhadas e um período pré-reprodutivo mais curto, que funcionam como vantagens competitivas. Resta saber o balanço que cada um destes itens tem em relação à idêntica sensibilidade ao cádmio. De qualquer das maneiras, a “balança” deve favorecer, uma vez mais, a *A. franciscana*, sendo também importante monitorizar e controlar o máximo possível a invasão neste local, com vista a preservar o ecossistema e a diversidade de espécies que nele habitam. Porém, é interessante compreender que, neste trabalho, foi tentada a simulação em laboratório da primeira fase da introdução de uma espécie (*A. franciscana*) num habitat distinto do qual a mesma é endémica. Isto é, os quistos que foram importados do Great Salt Lake e testados, correspondem a uma só geração. Não se podem tirar conclusões quanto à adaptação a longo prazo de *A. franciscana* à constante concentração de cádmio das salinas portuguesas. Todavia, a partir dos resultados obtidos, e visto que a concentração do metal é maior nas salinas de Aveiro em relação ao Great Salt Lake, podemos esperar que, ao longo do tempo, *A. franciscana* se consiga tornar mais resistente que a *A. parthenogenetica* da salina de Aveiro. Ainda assim, mais estudos serão necessários para comprovar este facto.

4. Conclusão

As conclusões retiradas deste estudo estão de acordo com o que previamente foi estudado em relação à resistência da espécie *A. franciscana* e das espécies europeias (*A. parthenogenetica*; *A. salina*) aos metais pesados e outros contaminantes ambientais, como insecticidas organo-fosforados (e.g. Varó, 1998; Sarabia *et al.*, 2002), concluindo que, de facto, a espécie *A. franciscana* nem sempre é beneficiada na competição com as espécies autóctones europeias. Algumas estirpes podem ser tão ou mais resistentes à poluição por metais pesados, em relação à *A. franciscana*. No entanto, outras serão mais sensíveis, isto dependendo do local onde prosperam. Geralmente, estirpes de locais que apresentam maiores concentrações de poluente, vão ser mais resistentes ao mesmo. Após este estudo, fica a ideia que a resistência específica de cada estirpe/população é definida mais pelo local onde habita (diferentes concentrações de metais pesados), e não tanto pela espécie em questão, podendo o ambiente alterar o *pool* genético destas populações.

Não foram encontradas diferenças significativas no que diz respeito à sensibilidade ao cádmio no ambiente entre a espécie *A. franciscana* e a estirpe de *A. parthenogenetica* de Aveiro, enquanto que a estirpe de *A. parthenogenetica* de Rio Maior se mostrou bastante mais sensível que as outras espécies acima referidas. Estes estudos demonstram que a *Artemia franciscana* nem sempre é beneficiada pela presença de cádmio em relação às outras espécies autóctones da Europa. Contudo, este assunto precisa de ser verificado e aprofundado em futuros estudos com interesse em perceber melhor como funciona a competição destas espécies nos diferentes locais que habitam e procurar compreender a adaptação a longo prazo deste organismo às condições adversas do meio.

5. Referências bibliográficas

- Abatzopoulos T.J., Zhang, B. & Sorgeloos, P., 1998. International study on *Artemia*. LIX. *Artemia tibetiana* preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's republic of China). *International Journal of Salt Lake Research* **7**: 41–44.
- Amat, F., 1985. Biología de Artemia. *Informes Tecnicos del Instistuto Investigaciones Pesqueras* **126-127**: 3-60.
- Amat, F., Barata, C., Hontoria, F., Navarro, J. C. & Varó, I., 1995. Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *International Journal of Salt Lake Research*, **3 (2)**: 175-190.
- Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., Vieira, N. & Mura, G., 2007. Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica*, **26 (2)**: 387-404.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sánchez, M.I., Figuerola, J. & Hortas, F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, **7**: 37-47.
- ATSDR – Agency For Toxic Substance and Disease Registry., 1997. *Annual Report*
- Blust, R., Kockelbergh, E. & Baillieul, M., 1992. Effect of salinity on the uptake of cadmium by the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol.* **84**: 245-254.
- Brix, K.V., R.D.Cardwell, and W.J. Adams. 2003. Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotox Environ. Safety*. **54**: 169-175.
- Browne, R.A. & Wasigasekera, G., 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **244**: 29-44.
- Cai, Y., 1989. A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). *The Wasmann Journal of Biology*, **47**: 105–110.
- Calado, C. & Brandão, J.M., 2009. Salinas interiores de Portugal: o caso das marinhas de Rio Maior. *Geonovas*, **22**: 45-54.
- Calado, C., Brandão, J., 2009. Salinas interiores em Portugal: o caso das marinhas de Rio Maior. *Geonovas*. **22**: 45–54.

- Crisinel, A., Delaunay, L., Rossel, D., Tarradellas, J., Meyer, H., Saiah, H., Vogel, P., Delisle, C., Blaise, C., Hansen, P.D., 1994. Cyst-based ecotoxicity tests using Anostracans: Comparison of two species of *Streptocephalus*. *Environmental Toxicology and Water Quality* **9**: 317.
- Crisman, T.L., Takavakoglou, V., Alexandridis, T., Antonopoulos, V., Zalidis, G., 2009. Rehabilitation of abandoned saltworks to maximize conservation, ecotourism and water treatment potential. *Global Nest Journal* **11**: 24–31.
- Del Ramo J., Martinez M., Pastor A., Torreblanca A., & Diaz – Mayans J., 1993. Effect of cadmium pre-exposure in cadmium accumulation by brine shirimp *Artemia*: involvement of low-molecular-weight cadmium – binding ligands. *Marine Environmental Research*. **35**: 29-33.
- Figueira, E., Lima, A., Branco, D., Quintino, V., Rodrigues, A.M., Freitas, R., 2011. Health risk of consuming cockles (*Cerastoderma edule* L.) from a low contaminated coastal system. *Environ. Int.*, **37** (5) (2011): pp. 965–972
- Gajardo, G., Beardmore, J.A. & Sorgeloos, P., 2001. International study on *Artemia*. LXII. Genomic relationships between *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, inferred from chromocentre numbers. *Heredity*, **87** (2): 172-7.
- Garcia, J.M., 2009. Implicaciones de la dispersión actual e histórica para la biología evolutiva y conservación de *Artemia* y otros invertebrados acuáticos con estadio de diapausa. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Biologia da Universidade de Sevilha, 142 pp.
- Gunther, R.T., 1890. Crustacea. Em: Gunther RT (ed) Contributions to the Natural History of Lake Urmi, N.W. Persia and its Neighbourhood. *Journal of the Linnean Society (Zoology)* **27**: 394–398.
- Hontoria, F. & Amat, F., 1992. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. Mediterranean populations. *Journal of Plankton Research*, **14** (7): 949-959.
- Jayasekara, S., D. B. Brown & R. P. Sharma., 1986. Tolerance to cadmium and cadmium-binding ligands in Great Salt Lake brine shrimp (*Artemia salina*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **11**: 23-30.
- Kellogg, V.A., 1906. A new *Artemia* and its life conditions. *Science*, **24**: 594–596.
- Leach, W.E., 1819. Entomostraca, *Dictionnaire des Science Naturelles*, **14**: 524.

- López, G.R.M., 2012. El recurso de *Artemia* de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Valência, 257 pp.
- Madhu, K., 2009. *Artemia*: growth and reproduction, cysts decapsulation, hatching techniques and biomass production- Winter School on Recent Advances in Breeding and Larviculture of Marine Finfish and Shellfish.
- Nriagu, J. O. & Pacyna, J. M., 1988. Global contamination of air. Water and soils with trace metals. *Nature*. **333**: 134- 139.
- Nriagu, J. O., 1988. A silent epidemic of environmental metal poisoning. *Environ. Pollut.* **50**: 139-161.
- Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M., Stappen, G., 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* **144**: 453–62.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R.J., Pacepavicius, G.J., Lau, Y.L., 2000. Fate and Ecotoxicity of the New Antifouling Compound Irgarol 1051 in the Aquatic Environment. *Water Research* **34**: 3523-3530.
- Pereira, M. E., Lillebo, A. I., Pato, P., Válega, M., Coelho, J. P., Lopes, C.B., Rodrigues, S., Cachada, A., Otero, M., Pardal, M. A., Duarte, A. C., 2009. Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environmental Monitoring and Assessment* **155**: 39–49
- Persoone, G. & Sorgeloos, P., 1980. General aspects of biogeography of *Artemia*. em: Persoone, G., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia, Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*, 3. *Universa Press*, Wetteren, Belgium: 3-24.
- Piccinelli, M. & Prosdocimi, T., 1968. Descrizione tassonomica delle due species *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* n. sp. Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Letter, Rendiconti B **102**: 170–179
- Pinto, P., Bio, A., Hontoria, F., 2013. Portuguese native *Artemia parthenogenetica* and *Artemia franciscana* survival under different abiotic conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **440**: 81-89
- Rahimi, B. & Manavi, P. N., 2010. Availability, Accumulation and Elimination of Cadmium by *Artemia urmiana* in Different Salinities. *J. BIOL. ENVIRON. SCI.*, 2010, **4(12)**: 149-157
- Rainbow, P. S., 1985. Accumulation of Zn, Cu, and Cd by crabs and barnacles. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **21**: 669-686

- Rodrigues, C.M., Bio, A., Amat, F., Vieira, N., 2011. Artisanal salt production in Aveiro/Portugal - an ecofriendly process. *Saline Systems* **7**: 1-3.
- Sarabia, R., 2003. Developmental and reproductive effects of low cadmium concentration on *Artemia parthenogenetica*. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **38(6)**: 1065-1071.
- Sarabia, R., Del Ramo, J., Varo, I., Díaz-Mayans, J., Torreblanca, A., 2002. Comparing the acute response to cadmium toxicity of nauplii from different populations of *Artemia*. *Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC* **21**: 437-44.
- Van Stappen, G., 2002. Chapter IV. Zoogeography, em: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg J.S., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia* basic and applied biology. *Klüwer Academic Publishers*: 171-224.
- Vanhaecke, P. & Persoone, G., 1984. The ARC-test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia* nauplii. Methodology and evaluation. p. 143-157. In: Ecotoxicological testing for the marine environment. **Vol. 2**. Persoone G., E. Jaspers & C. Claus (Eds). State Univ. Ghent, Belgium; *Inst. Mar. Sci. Res.*, Bredene, Belgium. 588p.
- Varó, I., Amat, F., Navarro, J.C., Barreda, M., Pitarch, E., Serrano, R., 2006. Assessment of the efficacy of *Artemia* sp (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival. *Sci. Total Environ.* 2006 Jul 31; **366(1)**: 148-53.
- Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, **48(6)**: 563-9.
- Varó, I., Serrano, R., Navarro, J.C., López, F.J., Amat, F., 1998. Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **61**: 778-85.
- Vieira, N., 1988. Culture of *Artemia* from Aveiro (Portugal) fed with wheat bran and seaweed. *Artemia Research and its Applications*, **3**:327-329.
- Vieira, N., 1990. Contribution to the knowledge about the biology of *Artemia* salt pans. Its importance in aquaculture and in the dynamics of this ecosystem. *Larviculture & Artemia Newsletter*, **21**: 64.
- Vieira, N., Bio, A., 2011. Spatial and temporal variability of water quality and zooplankton in an artisanal salina. *Journal of Sea Research* **65**: 293-303.

Williams, C. R. & Harrison R. M., 1984. Cadmium in the atmosphere. *Experientia*. 15 January 1984, **40**: 29-36

6. Anexos

Tabela 2 – Resultados do Teste T-Student para as duas espécies onde os valores das concentrações são os mesmos (*A. parthenogenetica* de Aveiro e *A. franciscana*). 95% CL – Intervalo de confiança de 95%.

[CdCl] = 2500 µg/L

Group Statistics

	Espécie	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mortalidade	AF	3	1,33	,577	,333
	AP-AV	3	3,00	3,606	2,082

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Mortalidade	Equal variances assumed	6,250	,067	-,791	4	,473	-1,667	2,108	-7,520	4,187
	Equal variances not assumed			-,791	2,102	,509	-1,667	2,108	-10,327	6,993

[CdCl] = 2600 µg/L

Group Statistics

	Espécie	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mortalidade	AF	3	3,00	1,732	1,000
	AP-AV	3	1,67	2,082	1,202

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Mortalidade	Equal variances assumed	,143	,725	,853	4	,442	1,333	1,563	-3,008	5,674
	Equal variances not assumed			,853	3,872	,443	1,333	1,563	-3,065	5,731

[CdCl] = 2700 µg/L

Group Statistics

Espécie	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Mortalidade AF	3	7,00	7,211	4,163
AP-AV	3	7,33	2,082	1,202

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
										Lower	Upper
Mortalidade	Equal variances assumed	4,266	,108	-,077	4	,942	-,333	4,333	-12,365	11,698	
	Equal variances not assumed			-,077	2,331	,945	-,333	4,333	-16,657	15,990	