



**Maria Paula Moreira AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COBRE NA TAXA DE
Pacheco Espírito Santo INGESTÃO DE CLADÓCEROS**



**Maria Paula Moreira AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COBRE NA TAXA DE
Pacheco Espírito Santo INGESTÃO DE CLADÓCEROS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Nogueira, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus filhos, João e Rita, na esperança que possam viver num planeta mais saudável.

o júri

presidente

Prof. Dr. Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares
professor catedrático da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Lúcia Maria Candeias Guilhermino
professora catedrática do ICBAS da Universidade do Porto

Prof. Dr. António José Arsénio Nogueira (orientador)
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Tenho que agradecer muito a diversas pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família que sempre me apoiou e permitiu realizar os meus sonhos.

Ao David pelo carinho e companhia.

Ao Prof. António Nogueira pelo apoio, paciência, orientação e incentivo.

Ao ISAVE – Instituto Superior de Saúde do Alto Ave, por toda a disponibilidade.

Aos meus filhos, João e Rita, que tornaram tudo mais significativo.

palavras-chave

Toxicidade, toxicidade crónica, CE₅₀, CENO, CEO.

resumo

No caso de metais, a toxicidade não pode ser predicta apenas pela determinação da sua concentração no meio. As concentrações sub-letais de elementos tóxicos no ambiente aquático quase nunca resultam em mortalidade imediata do organismo, mas provocam efeitos significativos sobre os indivíduos, dando origem a inúmeras alterações fisiológicas (Ferreira, 2003).

Embora alguns metais sejam essenciais para a vida, todos são tóxicos acima de determinada concentração. Para alguns, como o Cu, a separação entre a essencialidade e a toxicidade é muito estreita. É extremamente importante que a sua distribuição físico-química nos sistemas naturais permaneça relativamente constante.

O ecossistema aquático está continuamente exposto a um sem número de substâncias tóxicas lançadas no meio ambiente, oriundas de numerosas fontes de emissão. Este tipo de metais chega frequentemente aos pontos aquíferos em consequência de efluentes industriais, principalmente provenientes de indústrias extractoras de metais, de tintas e pigmentos, químicas, curtições, metalúrgicas e petróleo. São classificados como contaminantes químicos das águas. Estas substâncias são capazes de interagir com o organismo vivo provocando diversas alterações que podem dar origem a consequências graves em populações, comunidades e ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Aires et al, 2006).

Os organismos têm capacidade para controlar a concentração de metais em certos tecidos para minimizar os danos das formas reactivas dos metais não essenciais e para controlar a utilização selectiva dos metais essenciais (Vijver et al, 2004).

A concentração química pode ser medida com um instrumento, mas apenas organismos vivos podem medir a toxicidade. O conhecimento da concentração química e da toxicidade sob certas condições pode ajudar na predição de variadas consequências ambientais (Cairns e Mount, 1990).

Muitos autores salientam a importância da realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos como forma de alerta para um possível problema ambiental (Ferreira, 2003).

Os testes de ingestão com *Daphnia magna* na presença de cobre realizados neste trabalho permitiram-nos calcular os seguintes parâmetros de toxicidade: CE₅₀=163,5 µg Cu/L, CENO = 25 µg Cu/L e CEO = 50 µg Cu/L.

keywords

Toxicity, cronic toxicity, EC₅₀, CENO, CEO.

abstract

Metal levels of toxicity cannot be predicted by only measuring their environmental concentrations. The result of sub-lethal toxic concentrations in an aquatic environment is not the destruction of the living organisms. Instead, it results in long term major damage in the species' physiology and events that occur subsequent to the contamination (Ferreira, 2003).

Although, some metals are essential to life, all are toxic above certain concentrations. Some of them, like copper, has tiny boundaries between the essential and toxic amount. The balance between the concentrations of these elements is very important to the environment.

The aquatic ecosystem is very often exposed to the contamination of these toxic compounds, especially in the case of toxic metals. This contamination comes from human activity and natural sources in the different compartments of the environment. Industrial companies (metal extractors, paint factories, leather and oil businesses) are the principal factors of water chemical pollution. All those substances interact with living organisms. These changes on the system can have huge consequences on the ecology, the level of the consequences depending on the amount and time of contamination (Aires et al, 2006).

Those substances interact and affect living organisms in a negative way. Until a certain toxic level is achieved, living organisms are able to control the tissue contamination. They control the damage of non-essential metals and they are able to select the essential metals (Vijver et al, 2004).

The chemical concentration can be measured by an instrument, but only a living organism can measure the toxicity. Knowledge of the chemical concentration and the level of toxicology can be very important in control of environment hazards (Cairns e Mount, 1990).

Many authors claim the importance of making tests to measure the toxic level of aquatic living organisms as a way to prevent environmental pollution damages (Ferreira, 2003).

According to our data, the toxic copper concentration in the *Daphnia magna* is 163,5 µg Cu/L. We also found a NOEC of 25 µg Cu/L and OEC of 50 µg Cu/L.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – METAIS PESADOS NO AMBIENTE AQUÁTICO.....	1
1.2 – IMPORTÂNCIA DOS METAIS NA MANUTENÇÃO DA VIDA.....	1
1.3 – TOXICIDADE DOS METAIS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS.....	3
1.3.1 – O cobre e os organismos aquáticos	7
1.4 – TESTES DE TOXICIDADE CRÓNICA.....	8
1.4.1 – Parâmetros analisados nos testes de toxicidade crónica	11
1.5 – ANÁLISE DE RESULTADOS DE TESTES DE TOXICIDADE.....	13
1.5.1- Ensaio de toxicidade.....	14
1.6 – ALGUNS ESTUDOS DE TOXICIDADE CRONICA RECENTEMENTE REALIZADOS	15
1.7 – PROBLEMA E QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO.....	16
1.7.1 Objetivos Específicos	17
2 - MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 - ORGANISMO TESTE.....	19
2.2 - METODOLOGIA DE CULTURA.....	22
2.3 - METODOLOGIA DE TESTE	28
2.3.1 - Princípio do método.....	28
2.4 - PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE O TESTE	30

2.5 – PROCEDIMENTO DO TESTE.....	30
2.6 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	32
2.7 – Determinação do CE ₅₀	33
2.7.1 - Estabelecimento de uma relação dose-resposta.....	33
2.7.2 - Ensaio para avaliar a diferença entre organismos expostos a diferentes doses contra um controlo negativo (dose 0).....	34
3 – RESULTADOS.....	35
4 - DISCUSSÃO.....	41
5 - CONCLUSÕES.....	43
6 - BIBLIOGRAFIA.....	45
7 – ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Relação Dose-resposta	13
Figura 2: <i>Daphnia magna</i>	21
Figura 3: Culturas de <i>Daphnia magna</i>	23
Figura 4: Culturas de <i>Chlorella vulgaris</i>	26
Figura 5: Peso seco em <i>C. vulgaris</i> em função da absorvância determinado em diluições 1/10 da <i>Chlorella vulgaris</i>	27
Figura 6: Peso seco em <i>C. vulgaris</i> em função da absorvância determinado em soluções não diluídas de <i>Chlorella vulgaris</i>	27
Figura 7: Peso seco de <i>C. vulgaris</i> em função da absorvância determinado com todas as soluções de <i>Chlorella vulgaris</i> (diluídas e não diluídas).	28
Figura 8: Testes de toxicidade crónica com <i>Daphnia magna</i>	31
Figura 9: Testes de toxicidade crónica com <i>Daphnia magna</i>	32
Figura 10: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) observado no teste 1: 0 a 100 $\mu\text{g Cu/L}$	35
Figura 11: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) observada no teste 2: 0 a 400 $\mu\text{g Cu/L}$	36
Figura 12: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) agrupando os resultados dos testes 1 e 2	36
Figura 13: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) observada no teste 3: 0 a 300 $\mu\text{g Cu/L}$	37
Figura 14: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) observada no teste 4: 0 a 300 $\mu\text{g Cu/L}$	38
Figura 15: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) agrupando os resultados dos testes 3 e 4.	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Equivalência entre os parâmetros propostos nos dois modelos (história de vida e história de vida e recursos disponíveis)	11
Tabela II: Níveis de organização biológica e medições a efectuar	12
Tabela III: Composição do meio ASTM para cultura de <i>D. magna</i>	22
Tabela IV: Composição do meio JM para cultura de <i>C. vulgaris</i>	24
Tabela V: Composição do meio EG para cultura de <i>C. vulgaris</i>	25
Tabela VI: Resumo dos valores de EC ₅₀ encontrados experimentalmente	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CE ₅₀	Concentração Efectiva Média
CENO	Concentração de Efeito Não Observável
OEC	Concentração de Efeito Observável
CL ₅₀	Concentração Letal Média
JM	Meio de Jaworski (Jaworski's Medium)
EG	Meio de Euglena gracilis (Euglena gracilis Medium)

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – METAIS PESADOS NO AMBIENTE AQUÁTICO

Os metais têm contribuído de forma significativa para a poluição do ar, do solo e da água, interferindo temporária ou permanentemente na manutenção dos ecossistemas (terrestres e aquáticos). Metais pesados são elementos químicos que apresentam número atômico superior a 22. Normalmente, precipitam sob a forma de sulfuretos, e quando ultrapassam determinada concentração tornam-se nocivos para a vida.

O ecossistema aquático está continuamente exposto a um sem número de metais lançados no meio ambiente, oriundas de numerosas fontes de emissão. Este tipo de metais chega frequentemente aos pontos aquíferos em consequência de efluentes industriais, principalmente provenientes de indústrias extractoras de metais, de tintas e pigmentos, químicas, curtições, metalúrgicas e petróleo. São classificados como contaminantes químicos das águas. Estas substâncias são capazes de interagir com o organismo vivo provocando diversas alterações que podem dar origem a consequências graves em populações, comunidades e ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Aires et al, 2006). Após entrarem no ecossistema aquático, os metais distribuem-se pelo material em suspensão (biótico e abiótico), pelo sedimento e pela água superficial.

1.2 – IMPORTÂNCIA DOS METAIS NA MANUTENÇÃO DA VIDA

Muitos metais desempenham papéis fisiológicos específicos, incluindo os metais alcalinos (Na, K), alcalino-terrosos (Ca, Mg), metais de transição, seis dos quais são metais essenciais para a maioria dos seres vivos (Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo) e quatro são essenciais para alguns organismos (Cr, V, Ni, Sn). Uma característica

dos metais de transição é a sua capacidade de mudar de estado de oxidação, podendo assim participar em reacções redox. O Fe e o Cu são centros activos de várias metaloenzimas que catalisam reacções de transferência de electrões, de oxidação e de oxigenação (e.g., citocromo C, monoamina oxidase, citocromo P450). O Co, Mn e Zn constituem centros activos de enzimas que catalisam reacções de metilação, carboxilação e hidratação de uma série de compostos (metionina sintetase, piruvato carboxilase, anidrase carbónica).

Embora alguns metais sejam essenciais para a vida, todos são tóxicos acima de determinadas concentrações. Para alguns metais, como o Cu, a separação entre a essencialidade e a toxicidade é muito estreita. É extremamente importante que a sua distribuição físico-química nos sistemas naturais permaneça relativamente constante.

Os animais necessitam de uma grande multiplicidade de elementos químicos para manter o seu metabolismo normal. Este grande número de elementos químicos, pode ser dividido em três classes principais:

- Macroelementos – Ca, P, Mg, Na, K, S, Cl – necessários em quantidades diárias relativamente grandes (da ordem de grama), e geralmente exercem mais do que uma função (fisiológica e/ou metabólica).

- Microelementos – Fe, F, I, Mn, Co, Cu, Zn - necessários em quantidades diárias na ordem dos miligramas, funcionam como grupos prostéticos ou cofactores de enzimas.

- Oligoelementos – Si, Ni, Cr, Li, Mb, Se – necessários em quantidades diárias na ordem dos microgramas, necessários para assimilação e fixação de outros nutrientes e para a constituição e manutenção de membranas celulares.

Os metais podem também ser classificados da seguinte forma:

1. elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio;

2. micro-contaminantes ambientais: arsenico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstenio;

3. elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel.

1.3 – TOXICIDADE DOS METAIS EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Os efeitos de compostos químicos nos sistemas biológicos aquáticos são avaliados rotineiramente através de uma série de testes de toxicidade simples, onde grupos de indivíduos de uma única espécie, geralmente com origem numa cultura laboratorial, são expostos a uma série de concentrações de um químico (metal, por exemplo), durante um determinado período de tempo (Kooijman et al, 1996).

Os organismos têm capacidade para controlar a concentração de metais em certos tecidos para minimizar os danos das formas reactivas dos metais não essenciais e para controlar a utilização selectiva dos metais essenciais (Vijver et al, 2004).

A concentração de iões livres está melhor relacionada com a toxicidade, mas a concentração de outros catiões como Ca^{2+} , Mg^{2+} e H^+ também deve ser tomada em conta, dada a competição entre eles. O efeito tóxico é proporcional à concentração do metal ligado ao alvo e se este alvo de ligação do metal está ou não em contacto directo com o ambiente externo (aquático). Estudos recentes demonstraram que a exposição crónica a metais pode modificar os mecanismos de ligação.

Os metais essenciais podem estar sujeitos a regulação quer pela limitação de absorção do metal a nível de concentração corporal total, que por estratégias de acumulação específica do organismo, com excreção activa do excesso e/ou armazenamento sob formas inertes. Para metais não essenciais, a excreção e o armazenamento interno sem eliminação são as principais estratégias. As concentrações no organismo são em geral proporcionais às concentrações externas (Vijver et al, 2004).

Depois de absorvido, um metal pode estar presente num organismo sob diferentes formas:

- 1 – Forma iónica, livre ou complexado;
- 2 – Ligado ao centro activo de proteínas funcionais e peptídeos de baixo peso molecular;
- 3 – Ligado ao centro activo de enzimas;
- 4 – Ligado a aminoácidos de baixo peso molecular;
- 5 – Ligado a metalotioninas ou outras proteínas transportadoras;
- 6 – Armazenados em vesículas do sistema lisossomal;
- 7 – Precipitados em grânulos extracelulares, depósitos minerais, corpos residuais e exoesqueletos;
- 8 – Ligados a constituintes celulares (Vijver et al,2004).

Qualquer destas formas de ligação ou armazenamento é susceptível de provocar disfunções, alterando a função biológica de uma célula, tecido ou mesmo órgão, causando assim o efeito tóxico, por inibição ou alteração da função fisiológica essencial.

A intoxicação por metais ocorre quando iões livres do metal possuem afinidade para locais de ligação no interface organismo-água (locais fisiologicamente activos, que levam a uma resposta biológica directa), ou locais de transporte de metais para a célula, seguida da subsequente resposta biológica indirecta, o que leva à formação de um complexo metal-ligando biótico. A concentração deste complexo determina directamente a magnitude do efeito tóxico, independentemente das características físico-químicas da água do meio de teste (Janssen and Colin, 2002).

A qualidade ambiental padrão de uma água foi definida em termos de concentração total do metal dissolvido. A concentração admissível aumenta com o aumento da dureza da água de 1ug/L de 0 a 50 mg CaCO₃/L até uma concentração de 28 ug/L para uma dureza > 250 mg/L de CaCO₃ (Veen et al, 2002).

O aumento da temperatura aumenta os efeitos tóxicos, não se sabendo se por acumulação de tóxico, se por aumento da susceptibilidade do organismo ao tóxico ou se por uma combinação dos dois factores. A sensibilidade dos organismos a químicos pode ser afectada pelo aumento da temperatura por induzir alterações

fisiológicas, tais como indução de proteínas protectoras térmicas. As diferenças de temperatura ambiental podem afectar a absorção, a eliminação e desintoxicação por alteração das funções metabólicas, locomotoras e actividade alimentar do organismo (Heugens et al, 2003).

A natureza química e física da membrana celular influencia fortemente a determinação da toxicidade a metais de um organismo (Taylor et al, 1994).

Catiões não essenciais como o Pb e o Cd são transportados para o interior da célula pelas proteínas transmembranares transportadoras de iões análogos como o Ca e o Zn. Depois de entrar na célula, os metais podem ficar aprisionados em vacuolos ou grânulos ou ligar-se a metalo-proteínas. Também se podem ligar a tecidos moles com proteínas de alto peso molecular ou ser incorporados em tecidos duros de suporte ou revestimento como conchas, carapaças, ossos, penas, etc. (Heikens et al, 2001).

Nem a concentração total de metais, nem a concentração de metal dissolvido, são bons preditores da biodisponibilidade e toxicidade do metal (Janssen and Colin, 2002).

A concentração química pode ser medida com um instrumento, mas apenas organismos vivos podem medir a toxicidade. O conhecimento da concentração química e da toxicidade sob certas condições pode ajudar na predição de variadas consequências ambientais (Cairns and Mount, 1990).

Organismos adaptados a meios artificiais deficientes em metais essenciais (meios de cultura recomendados) podem tornar-se extremamente sensíveis a elevadas concentrações de metais. Os testes de toxicidade nestas condições podem não reflectir a tolerância natural dos organismos (Muysen and Janssen, 2005).

Protecção fisiológica temporária acontece provavelmente pela capacidade geral de ligação de alguns compostos como proteínas, polissacarídeos e aminoácidos. No entanto, quando a absorção sobe a níveis que pode ser inibido ou excretado, os mecanismos regulatórios podem ser totalmente quebrados (Taylor et al, 1994).

Alguns organismos aquáticos aumentam a sua tolerância aos efeitos tóxicos de alguns metais, capacidade que pode ser adquirida por exposição prévia a

concentrações sub-letais (Taylor et al, 1994), tendo como principal consequência que os valores de CE_{50} em água natural sejam mais elevados que os valores de CE_{50} em água padrão (Bossuyt et al, 2004).

A toxicinética depende do tamanho do corpo do organismo e os efeitos na sobrevivência e na reprodução dependem da quantidade de composto no organismo. A reprodução depende do tamanho do organismo e das reservas energéticas, então, indirectamente, da disponibilidade de alimento. Se o crescimento for afectado, a reprodução também será, retardada. Se a assimilação for afectada, a produção de energia será reduzida e a reprodução e crescimento afectadas (Kooijman and Bedaux, 1996).

Um problema prático na análise de dados de reprodução resultante de testes de toxicidade de rotina, é que variáveis como a taxa de alimentação, crescimento e respiração, não são normalmente medidas, o que pode tornar difícil saber qual o mecanismo que o tóxico a testar utiliza para afectar a reprodução (Kooijman et al, 1996).

Os estagios de desenvolvimento mais precoces de invertebrados são mais sensíveis a tóxicos que os estagios adultos, devido à sua menor capacidade de resistências por falta de maturidade dos mecanismos regulatórios (Bellas et al, 2001).

Privação de alimento leva a redução do número de nascimentos, redução da média do tamanho do organismo e atraso na idade de reprodução. Condições de privação de alimento aumentam a toxicidade, por diminuição de recursos disponíveis para defesa fisiológica a agentes stressantes (Pieters et al, 2005).

A reprodução pode ser directamente afectada pelo tóxico químico, ou indirectamente, por efeito na ingestão, crescimento ou manutenção, porque estes processos estão intimamente ligados entre si (Kooijman et al, 1996).

Os testes laboratoriais de ecotoxicidade são efectuados geralmente em condições de sobrealimentação para obter maior controlo de sobrevivência. Os organismos com deficiências alimentares têm menos recursos disponíveis para defesas contra stressantes, podendo por isso ser mais sensíveis a tóxicos (Pieters et al, 2005).

Os valores das taxas de ingestão mais elevados ($1,04-1,92 \times 10^6$ cel/ind/h) encontraram-se na densidade alimentícia oferecida entre 3 e 5×10^6 cel/ml, enquanto que as taxas de filtração mais altas foram obtidas em concentrações de alimento mais baixas, entre 4 e 64×10^4 cel/ml (Brito et al, 2006).

O alimento não é considerado um grande meio de uptake para *D. magna* e não contribui para a bioacumulação (Pieters et al, 2005).

Metais não essenciais podem substituir elementos essenciais provocando efeitos tóxicos com sintomas idênticos aos da deficiência. As constantes de absorção e de eliminação decrescem com o peso das espécies. Os metais em geral, com excepção do Hg, não ampliam com a subida na cadeia alimentar. Normalmente, concentrações mais baixas coincidem com baixa absorção e alta eliminação (Heikens et al, 2001).

A medida do resíduo corporal crítico (CBR – critical body residue) relaciona toxicidade com bioacumulação e biomagnificação. Pode dar-nos uma ideia da capacidade dos organismos sequestrarem os metais em formas não biologicamente reactivas (Vijver et al, 2004).

Alguns investigadores sugeriram que a tolerância a metais aumentada, em organismos pré-expostos, está relacionada com o aumento da síntese da metalotionina e proteínas relacionadas. Acredita-se que este grupo de metaloproteínas tem um papel de protecção contra o efeito tóxico de alguns elementos, incluindo o Cd, Cu e Zn. A principal função destas proteínas está relacionada com o mecanismo homeostático dos elementos fisiologicamente essenciais como o Cobre (Taylor et al, 1994).

1.3.1 – O cobre e os organismos aquáticos

Crustáceos sem concha, tanto de água doce como de água salgada são capazes de tolerar concentrações de Cobre no seu ambiente envolvente, muito superiores às doses fisiológicas necessárias (Taylor et al, 1994).

A adsorção de Cu da solução pela maior parte dos organismos aquáticos envolve a difusão passiva do metal, provavelmente sob a forma de complexo solúvel, para gradientes de concentração mais baixos, e ligação do metal a constituintes da membrana celular, fluidos corporais e órgãos internos (Taylor et al, 1994).

O cobre pode reagir directamente com a membrana atravessando-a e consequentemente provocando efeitos tóxicos, despoletando uma grande variedade de reacções bioquímicas, ou pode ser inibido (Taylor et al, 1994).

A toxicidade de um metal (Cu) para organismos aquáticos é função das características da água. Toxicidade do cobre para peixes e crustáceos aumenta com a dureza da água e diminui com a concentração em matéria orgânica. A toxicidade do Cu não é determinada apenas pela actividade do ião Cu livre. Outras formas de cobre, como hidróxido de cobre e complexos de cobre com metabolitos de baixo peso molecular também contribuem para a toxicidade deste metal (Janssen and Colin, 2002).

Algumas formas de Cu dissolvido, principalmente as que complexam com a matéria orgânica, não são tão potencialmente tóxicas como as formas inorgânicas (Veen et al, 2002).

1.4 – TESTES DE TOXICIDADE CRÓNICA

A concentração química pode ser medida com um instrumento, mas apenas organismos vivos podem medir a toxicidade. O conhecimento da concentração química e da toxicidade sob certas condições pode ajudar na predição de variadas consequências ambientais (Cairns and Mount, 1990).

No caso de metais, a toxicidade não pode ser predicta apenas pela determinação da sua concentração no meio. As concentrações sub-letais de elementos tóxicos no ambiente aquático quase nunca resultam em mortalidade imediata do organismo, mas provocam efeitos significativos sobre os indivíduos, dando origem a inúmeras alterações fisiológicas (Ferreira, 2003).

Os testes de toxicidade crónica em organismos aquáticos têm como finalidade observar os efeitos tóxicos da exposição prolongada a diferentes concentrações da substância teste. O objectivo destes testes é determinar qual a concentração em que se verifica evidência de efeito tóxico e estimar uma concentração “aceitável”, ou seja, a maior concentração de substância (neste caso metal) à qual não se observam efeitos de importância biológica na sobrevivência, maturação ou reprodução no organismo em estudo – CENO – Concentração de Efeito Não Observável e OEC – Concentração de Efeito Observável, ou seja, a mais baixa concentração que causa efeito significativo sobre a população (Capizzi et al, 1985).

Testes de toxicidade crónica são testes de longa duração que visam o estudo dos efeitos não letais nos organismos aquáticos, a partir da sua exposição prolongada a concentrações subletais de um agente tóxico. Estes testes podem ser avaliados através de análises específicas histológicas, hematológicas, comportamentais, entre outras, usadas para detecção de alterações crónicas tais como: alterações fisiológicas, deformações em tecidos somáticos ou gaméticos, alterações no crescimento, na reprodução, mobilidade, etc.

A maior parte dos testes toxicológicos medem o ponto final, como por exemplo os testes de sobrevivência, de crescimento ou de reprodução, perante exposição a um agente, durante um determinado período de tempo (Snell and Serra, 2000).

O teste crónico expõe o organismo ao agente potencialmente tóxico durante todo o seu ciclo de vida (juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução).

Os testes sub-letais ou de curta duração realizam-se focando os estagios mais sensíveis da vida do organismo, não cobrindo todo o ciclo de vida do mesmo. Nestes testes, avaliam-se efeitos no crescimento, reprodução e sobrevivência, sendo os resultados reportados em CENO, CEO e EC₅₀ – Concentração Efectiva Média – concentração média de uma substância que se espera que produza um determinado efeito em 50% dos organismos teste sob determinadas condições.

Um dos principais requisitos no desenvolvimento e uso de testes de toxicidade é a necessidade de minimizar a variabilidade entre os diferentes laboratórios. Uma das linhas de aproximação é a redução (idealmente eliminação)

da variabilidade genética, aumentando assim a precisão da estimativa média da resposta da população, diminuindo também a variabilidade entre os testes e consequentemente, aumentando a repetibilidade, a reprodutibilidade e a robustez dos testes (Barata et al, 2000).

No entanto, contrariando este facto, a utilização de populações com pouca diversidade genética pode enviesar os resultados, uma vez que as populações laboratoriais podem apresentar um aumento significativo de tolerância a substâncias tóxicas, dado que as culturas laboratoriais seleccionam indivíduos tolerantes às condições da cultura laboratorial, sendo também, e por isso, possivelmente tolerantes a outros tipos de stress, nomeadamente ao stress químico, recomendando para os testes de toxicidade populações teste provenientes do meio ambiente (Barata et al, 2002).

Quanto maior a variabilidade genética de uma população, menor o stress dessa população perante a exposição a um tóxico. Uma redução na variabilidade genética pode implicar uma perda futura de adaptabilidade, aumentando a probabilidade de extinção da espécie, uma vez que a selecção de genótipos resistentes, que serão menos adaptáveis que os genótipos não resistentes, em condições de não exposição. No entanto, clones de teste laboratorial derivados de diferentes populações podem mostrar diferentes padrões de resposta, incluindo diferenças de tolerância de clone para clone para exposição sub-letal a altos e baixos níveis de tóxicos e diferentes níveis de concordância entre respostas letais e sub-letais (Barata et al, 2002).

Os testes crónicos a metais pesados, devido a diferenças na variabilidade genética, devem convergir com a diminuição dos níveis de toxicidade, e dos metais essenciais para os não essenciais (Barata et al, 2002).

É de salientar a importância da realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos como forma de alerta para um possível problema ambiental (Ferreira, 2003).

1.4.1 – Parâmetros analisados nos testes de toxicidade crónica

Para avaliação da toxicidade crónica podem ser estudados diferentes parâmetros, todos eles relacionados com factores que reflectem alterações fisiológicas relacionadas com as consequências de exposição a um tóxico.

Sobrevivência – Tempo de vida do organismo sob determinado conjunto de condições de desenvolvimento. Acompanhamento da sobrevivência dos organismos até ao fim do teste.

Crescimento – Variação de uma dimensão do indivíduo, geralmente comprimento total ou peso, em função da idade. Medição do parâmetro no final do teste.

Maturidade – Idade do organismo aquando do primeiro parto.

Reprodução – Número de ninhadas produzidas, número total de neonatos gerados, média do número de neonatos por ninhada (Capizz et al, 1985).

Outros investigadores propõem a substituição destes parâmetros por outros, que defendem corresponder a uma melhor mimetização do comportamento do organismo em ambiente natural. Chamaram a estes primeiros parâmetros, parâmetros baseados na história de vida do organismo, e aos propostos, parâmetros baseados na história de vida do organismo e nos recursos disponíveis (Tabela I).

Tabela I: Equivalência entre os parâmetros propostos nos dois modelos (história de vida e história de vida e recursos disponíveis)

Modelo de história de vida clássico	Modelo de história de vida baseado em recursos
Sobrevivência – tempo de vida	Ovos e tamanho da bolsa incubadora
Crescimento	Taxa de crescimento
Maturidade	Tamanho do organismo aquando do primeiro parto

adaptado de (Congdon, J. D., et al, 2001)

A utilidade dos estudos ecotoxicológicos encontra-se na capacidade destes de prever as respostas de uma população à exposição a determinados contaminantes.

Muitos e diferentes testes podem ser efectuados para avaliar a toxicidade em organismos aquáticos e a escolha destes está dependente dos objectivos a que se destina o estudo (tabela II).

Tabela II: Níveis de organização biológica e medições a efectuar.

Nível	Medida	Função afectada
Comunidade	Estrutura/ função	Diversidade
População	Mortalidade/diversidade genética/ doença/abundancia/taxas de recuperação	Alterações populacionais
Organismo	Metabolismo/desenvolvimento/fecundidade/ comportamento/longevidade/susceptibilidade	Reprodução
Celular	Metabolismo/imunossupressão/fertilização/ tumores	Homeostase e mortalidade individual
Subcelular	Função neural/estabilidade lisossomal/ organelos/necrose/genotoxicidade	Homeostase e mortalidade individual
Molécular	Actividade enzimática/alterações energéticas/ razão RNA:DNA	Disfunção metabólica e mortalidade individual

adaptado de (Hynea, R. V. and Maherb, W. A., 2003)

1.5 – ANÁLISE DE RESULTADOS DE TESTES DE TOXICIDADE

Um dos aspectos importantes em toxicologia e ecotoxicologia é a relação entre a concentração de um composto químico à qual se expõe um organismo e o consequente efeito nocivo que produz. Esta relação, conhecida como relação dose-resposta, constitui a base para a avaliação do perigo e do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente. Os gráficos destas relações mostram em geral padrões não rectilíneos de tipo sigmoide (figura 1).

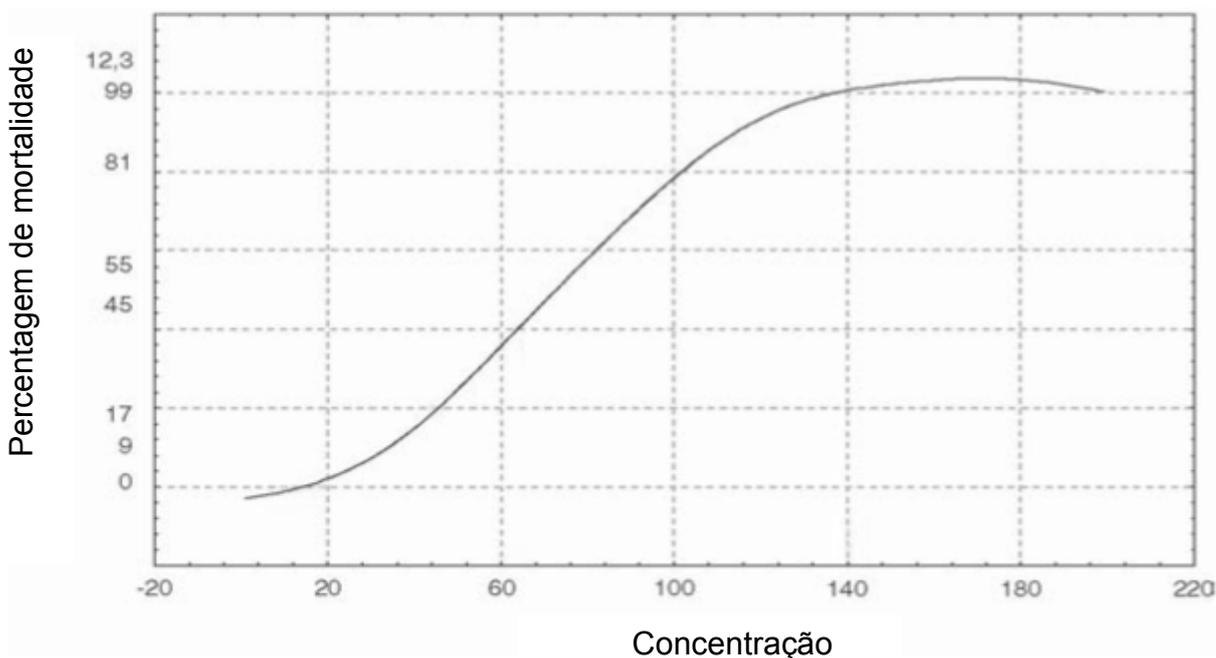


Figura 1: Relação Dose-resposta

Existem muitas maneiras de determinar a toxicidade, e ainda que os efeitos bioquímicos, fisiológicos, reprodutivos e de comportamento sejam de grande utilidade, o indicador mais utilizado é a morte do organismo teste. A maioria dos ensaios de toxicidade administram uma aproximação da dose (ou concentração no alimento, ar ou água) que produz uma resposta tóxica a um nível de 50%. Por exemplo, a dose letal média é a dose ou concentração que mata 50% da população (CL_{50}). Outro indicador que tem ganho grande popularidade é a dose ou concentração mais alta à qual não se observa nenhum efeito (CENO).

É importante destacar que, no que respeita à análise das relações entre a concentração de um tóxico e a resposta ou efeito do mesmo na matéria viva, existem outras aproximações à análise das ditas relações nas quais, basicamente, só se pretende determinar a concentração à qual não se observa um efeito nocivo do tóxico sobre o organismo exposto, ou a concentração mais baixa à qual se observa um efeito tóxico.

1.5.1- Ensaios de toxicidade

Um ensaio de toxicidade típica envolve um agente ou estímulo (por exemplo, um pesticida, um metal pesado ou uma amostra ambiental como contaminantes químicos), que se aplica a um organismo ou grupo de organismos, sobre o que se avalia uma certa resposta pré-seleccionada. O tamanho do estímulo ou dose pode ser medido como um peso, um volume ou uma concentração.

A resposta dos organismos é valorizada mediante a quantificação final de alguma característica (peso do corpo, ritmo cardíaco,...), a sua alteração (aumento do peso corporal, diminuição da pressão sanguínea,...) ou pela ocorrência ou não de um determinado fenómeno (morte, inibição do crescimento, uma contracção muscular,...).

Partindo da base de que a magnitude ou a frequência da resposta dependerá da dose aplicada, os ensaios de toxicidade devem desenhar-se utilizando diferentes doses. A informação obtida deste tipo de ensaios permite a quantificação da relação entre as duas variáveis (dose e resposta), caracterizando toxicológica ou ecotoxicologicamente o composto. Normalmente, os testes de toxicidade realizam-se para comparar ou estimar a potencia de um agente em relação a um padrão ou controlo.

É importante realçar que a resposta a uma dose em particular será afectada de maior ou menor maneira, por factores não controlados durante o teste.

1.6 – ALGUNS ESTUDOS DE TOXICIDADE CRÓNICA RECENTEMENTE REALIZADOS

Vários autores se têm debruçado sobre o problema da toxicidade crónica em organismos aquáticos, tendo realizado diversos estudos a diferentes tóxicos utilizando diferentes organismos teste, como descrito de seguida.

Para avaliação da toxicidade do Hg, Cu, Cd e Cr em estagios de desenvolvimento iniciais de *Ciona intestinalis* e para testar a aplicação destes testes na avaliação da qualidade de água salgada, foram usados como organismo teste gâmetas, embriões e larvas de *Ciona intestinalis*, concluindo-se que os embriões de ascídeos podem ser considerados critérios de avaliação da qualidade de água do mar. O Hg é 3 vezes mais tóxico que o Cu, 30 vezes mais tóxico que o Cd e 1000 vezes mais tóxico que o Cr para estes organismos (Bellas et al, 2001).

Com o objectivo de avaliação do efeito da adaptação e da tolerância ao zinco após várias gerações em *Daphnia magna* e as suas implicações em testes de qualidade de água, foram usados como organismo teste *Daphnia magna*, clone K6, tendo-se concluído que a concentração óptima de Zn no meio de cultura deve variar entre 300 e 450 µg/L. A deficiência em zinco resulta numa baixa tolerância ao Zn, um alto coeficiente de variação no tamanho dos neonatos e num aumento da sensibilidade ao pH. Meios de cultura contendo muito pouco ou nenhum Zn, não servem de base para obtenção de dados para avaliação ecotoxicológica (Muysen and Janssen, 2001).

Para avaliação do efeito da concentração dos iões Ca, Mg, Na, K e H existentes no meio, na toxicidade do cobre, usaram-se com organismo teste *Daphnia magna*, clone K6 (<24 h de idade), verificando-se altas actividades de Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ aumentam a resistência à toxicidade do cobre, o que não acontece com K⁺, o que sugere competição entre estes iões. O aumento da concentração de H⁺ pelo contrário, aumenta a toxicidade do Cu²⁺, sugerindo alta toxicidade de CuOH⁺ (Janssen and Colin, 2002).

Com a finalidade de avaliar os efeitos do pH (5.3 – 8.7), da dureza da água ([CaCO₃] de 25 a 500 mg/L), concentração de carbono orgânico (1.6 – 18.4 mg/L) e

a sua fonte, na toxicidade crónica do cobre sobre *Daphnia magna*, foram usados como organismo teste *Daphnia magna* e testado o efeito do carbono orgânico colhido águas naturais da Bélgica e na Holanda, separado por osmose inversa, tendo-se verificado que um aumento do pH e do carbono orgânico dissolvido provoca um aumento linear da toxicidade do cobre sobre o organismo, sendo a concentração de carbono orgânico dissolvido o factor mais importante. A dureza da água parece não ter influência no aumento da toxicidade ao cobre (Shamphelaere and Janssen, 2004).

Com o objectivo de demonstrar o efeito protector do sódio em relação à toxicidade do cobre, foram testadas várias populações de cladoceros colhidas de seis águas superficiais não contaminadas tendo-se verificado que todas as espécies, excepto uma, mostraram melhor resistência aos efeitos tóxicos do cobre na presença de sódio a concentrações relativamente elevadas (>4mM), o que sugere que o mecanismo de toxicidade do cobre não será apenas a competição entre Na e Cu (Schamphelaere et al, 2007).

Para a caracterização da sensibilidade de *Daphnia magna* com a idade, à toxicidade a cobre, zinco, selénio e arsénico testaram-se diferentes populações de *Daphnia magna* de diferentes idades a diferentes concentrações de tóxicos, tendo-se verificado que nas populações mais jovens, a mortalidade aumenta e a reprodução diminui. Nas populações adultas, o comportamento é inverso. O pico de sensibilidade em relação ao Cu e ao Zn é aos 4 dias de idade, enquanto que em relação ao Se e ao As, é aos 3 dias (Hoang and Klaine, 2007).

1.7 – PROBLEMA E QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO

Dado o sem número de tóxicos que poluem os nossos recursos aquíferos, de que modo é que estes afectam os organismos cujo habitat está poluído?

Em determinadas concentrações, todos os metais são tóxicos, estando já determinadas as doses letais para quase todos os metais pesados e para a maioria dos organismos aquáticos. No entanto, coloca-se a questão, de saber como o desenvolvimento dos organismos é afectado, quando expostos a doses sub-letais

destes metais, nomeadamente através da inibição de processos fisiológicos essenciais, e.g. ingestão.

Uma outra questão, será tentar saber de que modo reage um organismo a concentrações crescentes de um metal pesado que, em baixas concentrações, é essencial para o organismo.

Determinar as taxas de ingestão após exposição a diferentes condições de stress químico por exposição a cobre, utilizando o cladócero *Daphnia magna* como organismo-teste.

1.7.1 Objetivos Específicos

Aplicação de uma metodologia de avaliação de toxicidade crónica, baseada na determinação da taxa de ingestão após exposição a tóxicos, usando como organismo-teste o cladócero *Daphnia magna*.

Verificar, as possíveis alterações nas taxas de ingestão do organismo teste após exposição aos tóxicos, mais especificamente, após exposição a diferentes e crescentes concentrações de cobre.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - ORGANISMO TESTE

A aplicação dos princípios de ecotoxicologia requer a seleção de um organismo-teste. O organismo-teste é seleccionado seguindo alguns critérios. Dentre eles cita-se a disponibilidade e abundância do organismo-teste no ambiente, a facilidade de cultura em laboratório e conhecimento da biologia da espécie. São espécies indicadoras, preferencialmente, espécies sensíveis e locais (Boherer, 1995).

Dentre as espécies que atendem a tais critérios, que é amplamente utilizada internacionalmente e cuja metodologia de cultura e teste é normalizada em vários países, cita-se o microcrustáceo *Daphnia magna* Straus.

Este organismo foi seleccionado como organismo-teste para esta pesquisa por ser amplamente conhecido, facilmente cultivado e mantido em laboratório e por ter reprodução frequente, o que garante o suprimento para testes constantes.

A biologia de *Daphnia magna* já foi amplamente estudada. Segundo Ruppert e Barnes (1996), é classificada taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera, família Daphnidae. Dentre os microcrustáceos, *Daphnia magna* é habitualmente chamada de pulga d'água, e como parte do zooplâncton, ocupa uma importante posição nas cadeias alimentares aquáticas.

Espécies pertencentes ao zooplâncton são consideradas uma comunidade importante nos ecossistemas aquáticos pelo seu importante papel na cadeia trófica. Representam uma via de passagem extremamente importante de matéria e de energia dos produtores primários para os consumidores do topo da cadeia. A maioria das espécies pertencentes à ordem Cladocera é filtradora obrigatória possuindo estruturas especializadas para a respiração e colheita de alimentos (Santos, 2004).

Alguns dos factores ambientais mais importantes que controlam o crescimento e a reprodução dos cladóceros são a temperatura, a quantidade e a qualidade do alimento e a qualidade e características da água (Santos, 2004).

A nutrição ocorre pela captura das partículas em suspensão através da atracção das cargas opostas das partículas e a superfície de um filtro. Este filtro é composto por cerdas finas dos apêndices do tronco que aprisiona partículas da corrente hídrica, transferindo-as para o sulco alimentar meio-ventral, e posteriormente para a boca. A excreção é realizada por glândulas.

O padrão reprodutivo dos cladóceros é cíclico e depende de factores abióticos. A partenogênese é comum à classe, sendo os machos desconhecidos em algumas espécies. Os ovos diplóides partenogenéticos são produzidos em cachos e incubados numa câmara incubatória dorsal localizada por baixo da carapaça. O desenvolvimento é directo e os jovens são libertados da câmara incubadora por meio de uma flexão ventral do pós-abdomen da fêmea.

Além do seu significado ecológico, as vantagens de usar cladoceros como espécies teste em ensaios de toxicidade, incluem o seu curto ciclo de vida, a facilidade com que se cultivam no laboratório e os pouco espaço e quantidade de água necessários, além da sua grande sensibilidade a um grande número de tóxicos (Bossuyt et al, 2005).

Dentro do grupo de cladóceros, as espécies do género *Daphnia* são as mais utilizadas como organismos teste ou de referência em ensaios de toxicidade. A ampla distribuição geográfica, o importante papel que cumprem no interior da comunidade zooplancónica, a facilidade de cultura em laboratório, a reprodução por partenogênese (a qual assegura uma uniformidade de respostas), e o curto ciclo de vida com a produção de um alto número de crias, fizeram deste grupo o ideal para a avaliação de toxicidade, a nível universal.

O género *Daphnia* encontra-se dentro da ordem Cladóceras da classe Crustacea, e espécies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Daphnia similis*, são utilizadas extensivamente em ensaios de toxicidade, pelo existe uma extensa informação sobre as técnicas de cultura, os requisitos de temperatura, luz e nutrientes, assim como a sua resposta a muitos tóxicos (Díaz et al, 2005).

Daphnia magna (Cladóceras, Crustacea) é um microcrustáceo planctónico, de 5 a 6 mm de comprimento, que actua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, alimentado-se por filtração de material orgânico particulado em suspensão.

Os organismos deste género são vulgarmente conhecidos como pulga d'água e têm larga distribuição no hemisfério norte.



Figura 2: *Daphnia magna*

As fêmeas partenogénicas de *D. magna* podem obter-se directamente de empresas fornecedoras de materiais biológicos, que certificam a espécie. Também podem ser obtidas de outras fontes como laboratórios especializados onde se efectuam ensaios de toxicidade com este cladóceros ou por meio da sua colheita em campo; nestes casos a espécie deverá ser taxonómicamente identificada (Díaz et al, 2005).

2.2 - METODOLOGIA DE CULTURA

Os organismos-teste foram cultivados em água reconstituída (meio ASTM com dureza elevada), com pH variando de 7,0 a 8,0 e dureza variando de 175 a 225 mg.L⁻¹ CaCO₃ (tabela III).

Tabela III: Composição do meio ASTM para cultura de *D. magna*

Reagentes		Preparar soluções de 100ml
1	Hidrogeno-carbonato de sódio (NaHCO ₃)	1.92g
2	Sulfato de Magnésio heptahidratado-MgSO ₄ .7H ₂ O	2.457g
3	Cloreto de Potássio (KCl)	0.08g
Reagente		Preparar solução de 1000ml
4	Sulfato de Cálcio dihidratado (CaSO ₄ .2H ₂ O)	1.6g

Para cada 1000ml, juntar:
 10ml das soluções 1 , 2 e 3 do meio ASTM
 75ml da solução 4 do meio ASTM
 Completar o volume com água desionizada
 Autoclavar 15 minutos a 121°C

Os organismos foram mantidos em lotes de até 25 adultos por 800 mililitros, em recipiente de 1.000 mL, com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 h de luz) e temperatura de 18°C a 22°C (Figura 3).



Figura 3: Culturas de *Daphnia magna*

A água reconstituída da cultura foi renovada três vezes por semana, evitando-se diferença de temperatura maior que 2°C. No manuseio do organismo utilizou-se pipeta de Pasteur descartável de diâmetro adequado ao tamanho do mesmo, com borda arredondada.

Como alimento utilizou-se a alga verde *Chlorella vulgaris*, fornecendo a quantia de aproximadamente 7µg/mL por organismo adulto, diariamente, ou com intervalo de no máximo dois dias consecutivos.

Para cultura da alga, manteve-se uma cultura-stock que serviu como inóculo. Foi mantida de 4°C a 10°C, em meio líquido, por no máximo um mês, para obtenção de células viáveis para sementeira.

As culturas de algas foram mantidas entre 20°C e 30°C, sob iluminação constante (Figura 4), em meio de cultura EG:JM (tabelas IV e V). As soluções stock para preparação dos meios de cultura foram mantidas no máximo seis meses.

Tabela IV: Composição do meio JM para cultura de *C. vulgaris*

Reagente		Preparar soluções de 100ml
1	Nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2.0000g
2	Fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4)	1.2400g
3	Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5.0000g
4	Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	1.5900g
5	EDTAFeNa EDTANa2	0.2250g
6	Ácido bórico (H_3BO_3) Cloreto de manganês tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Molibdato de amônia tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.2480g
7	Vitaminas Cyanocobalamin Thiamine HCl Biotin	0.0040g
8	Nitrato de sódio (NaNO_3)	8.000g
9	Hidrogenofostafo de sódio doze hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.6000g

Tabela V: Composição do meio EG para cultura de *C. vulgaris*

Reagentes		Preparar solução de 100ml
1	Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0.100g
Adicionar directamente ao meio de cultura/ L		
A	Sodium acetate trihydrate	1.0g
B	“Lab-Lemco” powder (Oxoid L29)	1.0g
C	Tryptone (Oxoid L42)	2.0g
D	Yeast extract (Oxoid L21)	2.0g

Para cada 1000ml, juntar:

1ml de cada solução do meio JM (1 a 9)

10.0ml da solução de Cloreto de Cálcio (CaCl₂), meio EG

As massas dos reagentes (A a D) especificadas na tabela do meio EG

Completar o volume com água desionizada

Autoclavar 15 minutos a 121°C



Figura 4: Culturas de *Chlorella vulgaris*

Após atingir o crescimento adequado, as culturas eram centrifugadas para retirar o excesso do meio de cultura. O sobrenadante era descartado e a alga ressuspendida com a água reconstituída utilizada para a cultura de *Daphnia magna* (meio ASTM). Este procedimento evita a introdução de nutrientes presentes no meio de cultura da alga, que podem ser tóxicos aos organismos-teste.

Para calcular a concentração de algas adequada, foi efectuada uma medição indirecta através dos valores de densidade óptica obtida da cultura mãe, do seu peso seco, e das densidades ópticas e peso seco de diferentes diluições desta. O peso seco foi obtido após liofilização das culturas e suas diluições. Foi construído o gráfico peso seco vs absorvância (figuras 5, 6 e 7), o que nos permitiu construir uma tabela relacionando absorvância da cultura de algas com o volume desta a adicionar para obter a concentração de alimento pretendida.

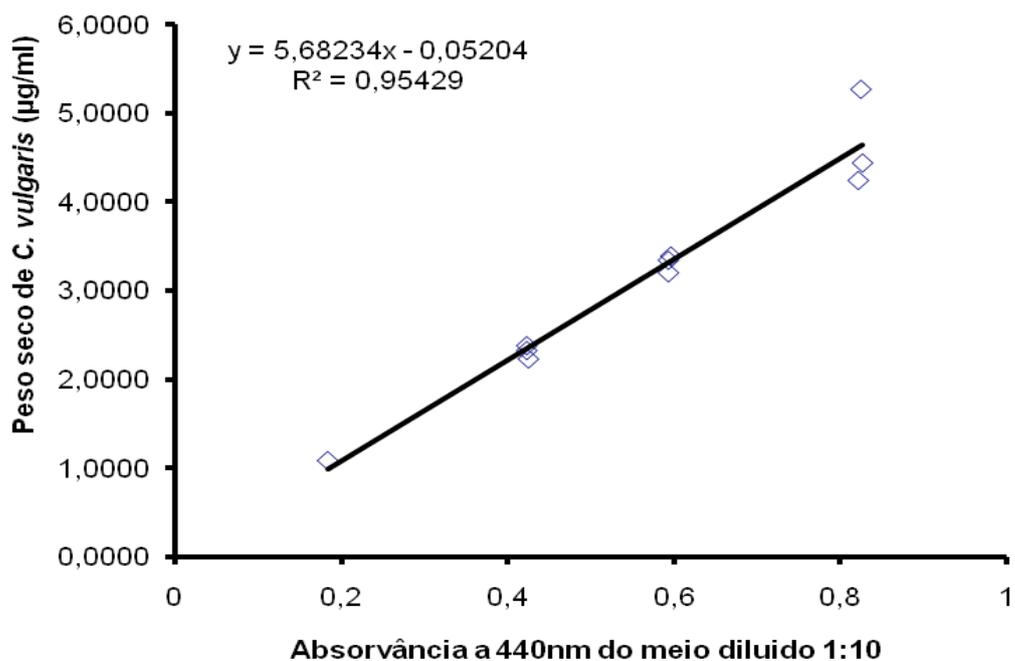


Figura 5: Peso seco em *C. vulgaris* em função da absorvância determinado em diluições 1/10 da *Chlorella vulgaris*

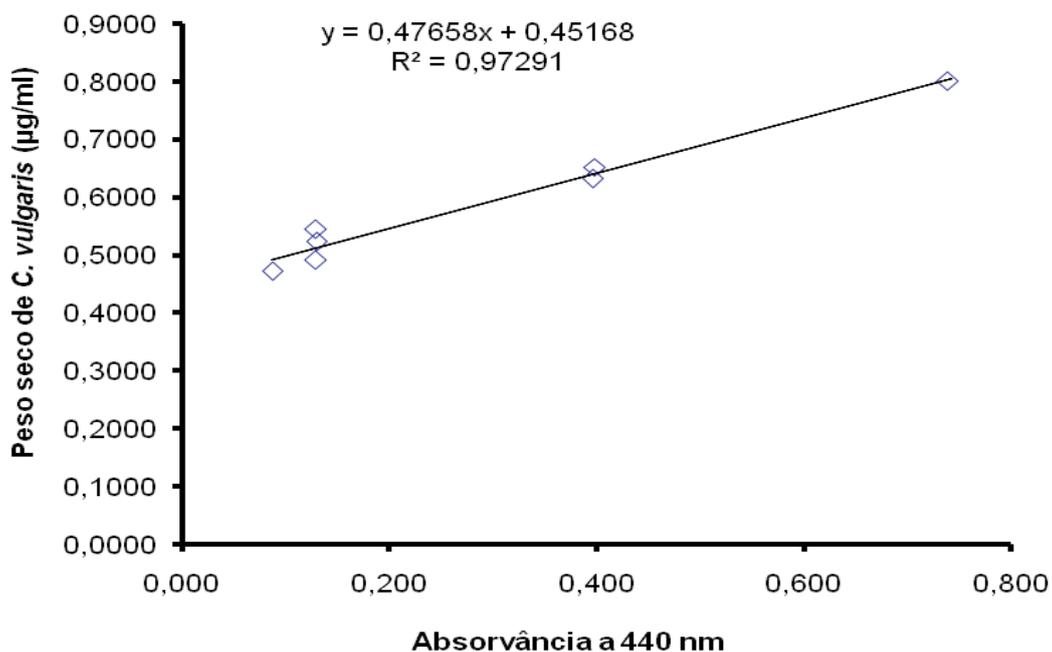


Figura 6: Peso seco em *C. vulgaris* em função da absorvância determinado em soluções não diluídas de *Chlorella vulgaris*

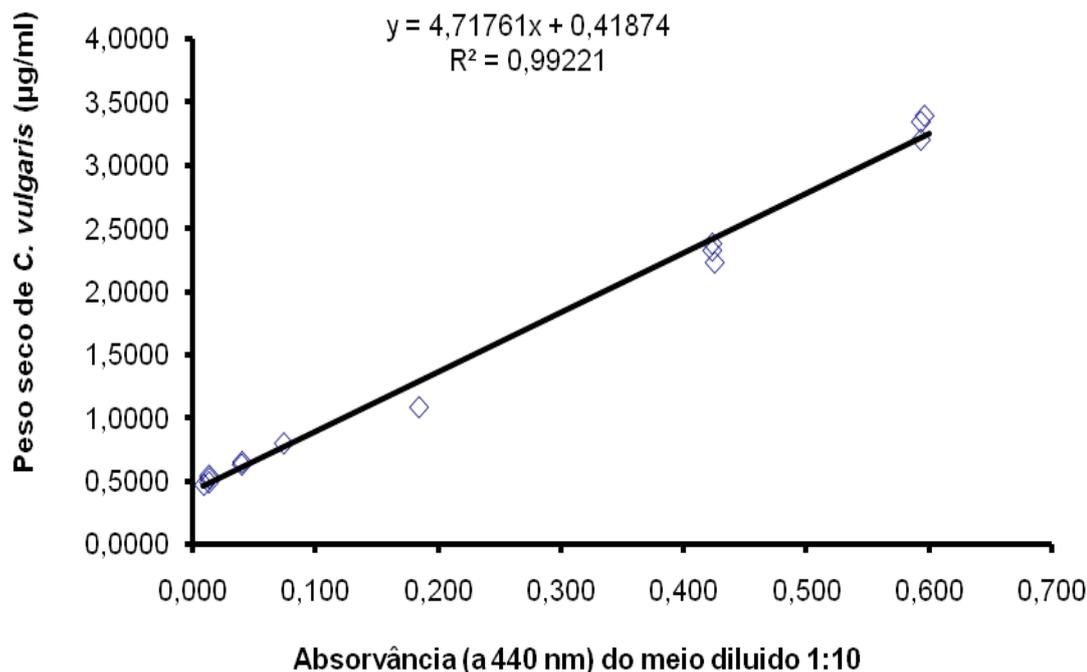


Figura 7: Peso seco de *C. vulgaris* em função da absorvância determinado com todas as soluções de *Chlorella vulgaris* (diluídas e não diluídas).

2.3 - METODOLOGIA DE TESTE

2.3.1 - Princípio do método

Os métodos de testes de toxicidade aquática podem ser categorizados de acordo com o tempo de exposição, situação de teste, efeitos a serem avaliados e organismos a serem testados (Rand, 1995).

Em geral, o princípio do método de avaliação de toxicidade ambiental consiste na exposição de organismos-teste a várias diluições da amostra a ser testada, por um período determinado de tempo.

Neste contexto, levando em consideração o tempo de exposição, os testes de toxicidade aquática podem ser classificados, segundo Rand (1995) e Knie e Lopes (2004) em testes de toxicidade aguda, testes crônicos e testes de curta duração ou sub-letais.

Os testes de toxicidade aguda são usados para determinar a toxicidade relativa de uma amostra sobre um organismo aquático seleccionado, exposto a várias concentrações desta amostra, num curto período de tempo. Os efeitos avaliados são mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, no caso de invertebrados; e crescimento, no caso de algas. O resultado é expresso em Concentração Efectiva Média - CE_{50} , ou seja, a concentração na qual 50% da população exposta sobrevive a diferentes concentrações de tóxico. O objectivo deste teste é determinar a concentração do tóxico que produz um efeito prejudicial na população exposta durante um curto período de tempo sob condições controladas (Rand, 1995).

Os testes crónicos permitem avaliar os possíveis efeitos adversos de uma amostra sob condições de longo tempo de exposição a concentrações sub-letais (Rand, 1995). O teste crónico expõe o organismo-teste ao agente potencialmente tóxico durante todo seu ciclo de vida, incluindo estágios sensíveis como juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução. Avaliam-se efeitos como desenvolvimento e reprodução. O resultado é expresso em Concentração de Efeito Não Observado - CENO, sendo esta a mais alta concentração do agente testado que não provoca efeito quando comparada com o controle; e em Concentração de Efeito Observado - CEO, a mais baixa concentração que causa efeito significativo sobre a população quando comparada com o controlo.

Os testes de curta duração ou sub-letais são desenvolvidos focando os estágios mais sensíveis da vida do organismo, mas não cobrem todo o ciclo de vida do mesmo. Avaliam-se efeitos no crescimento, reprodução e sobrevivência, sendo os resultados reportados em CE_{50} , CENO e CEO (Rand, 1995).

2.4 - PARÂMETROS ANALISADOS DURANTE O TESTE

Visando avaliar as amostras testadas, foi determinada a taxa de ingestão (quantidade de alimento consumido pelo organismo) dos organismos testes quando expostos a diferentes concentrações de tóxico, neste caso, o cobre.

Assim, pode-se calcular a concentração de efeito não observado – CENO e a concentração de efeito observado - CEO. A CENO é definida como a maior concentração da amostra que não causa efeito estatisticamente significativo aos organismos quando comparado com o controle, nas condições de ensaio; e a CEO é definida como a menor concentração da amostra que causa efeito estatisticamente significativo nos organismos quando comparado com o controle, nas condições de ensaio. A CENO e a CEO são expressas em percentagem.

2.5 – PROCEDIMENTO DO TESTE

O organismo-teste foi exposto a diferentes soluções-teste (diferentes concentrações de Cu), sendo transferido de forma a evitar a alteração da concentração final da mesma. Para tal utilizou-se uma pipeta de Pasteur descartável, cortada na extremidade inferior, a fim de não causar dano ou stress aos indivíduos. Teve-se o cuidado de libertar o organismo próximo da superfície da solução para evitar a entrada de ar sob a sua carapaça e consequente flutuação.

Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultura, com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas de luz) e temperatura de 18°C a 22°C. Os organismos-teste receberam diariamente alimentação, sendo fornecido como alimento a alga *Chlorella vulgaris*, em concentrações próximas a 7µg/mL por organismo adulto.

Os organismos foram isolados em recipientes de 100 mL com aproximadamente 50 mL de ASTM com uma concentração de Cu idêntica à que irá ser utilizada no teste, para ambientação durante 24 horas, respeitando o período de foto exposição de 16 horas.

Os testes foram realizados a diferentes concentrações de Cu, durante quatro horas. Os organismos foram transferidos para recipientes de 100 mL com 50 mL de

meio ASTM, alga *Chlorella vulgaris* a uma concentração de 7 µg/mL por organismo adulto e concentração de cobre variando entre 0 e 400 µg de Cu/mL (figuras 8 e 9). Foi mantido um frasco controlo ao qual não se adicionou cobre. Foram medidas as absorvâncias das diferentes soluções antes da adição dos organismos (5 por recipiente). Cada recipiente teste foi mantido 4 horas no escuro (para evitar foto alteração das algas do alimento) e medidas as absorvâncias finais. A partir das diferenças de absorvância inicial e final, foram calculadas as taxas de ingestão e verificadas as suas variações em função da concentração de cobre.

Os testes foram efectuados em triplicado.

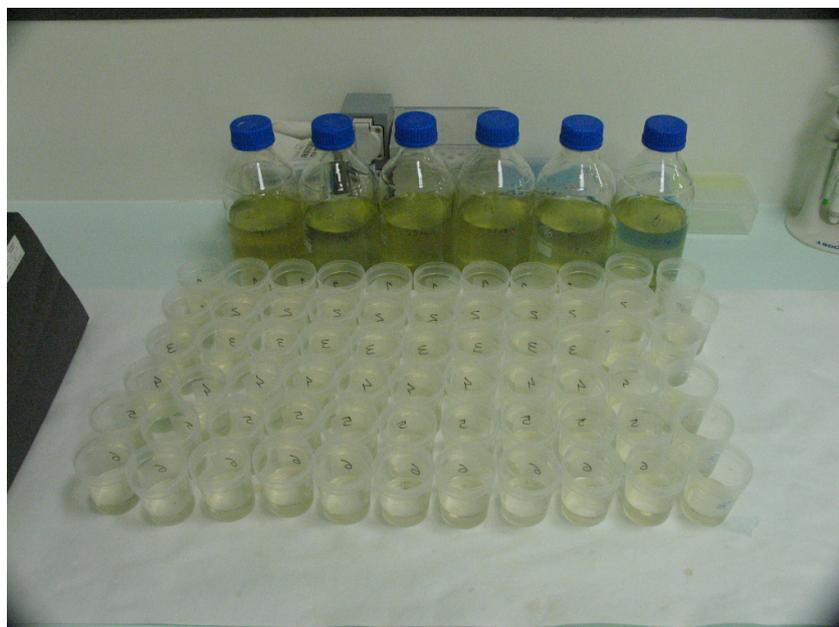


Figura 8: Testes de toxicidade crónica com *Daphnia magna*

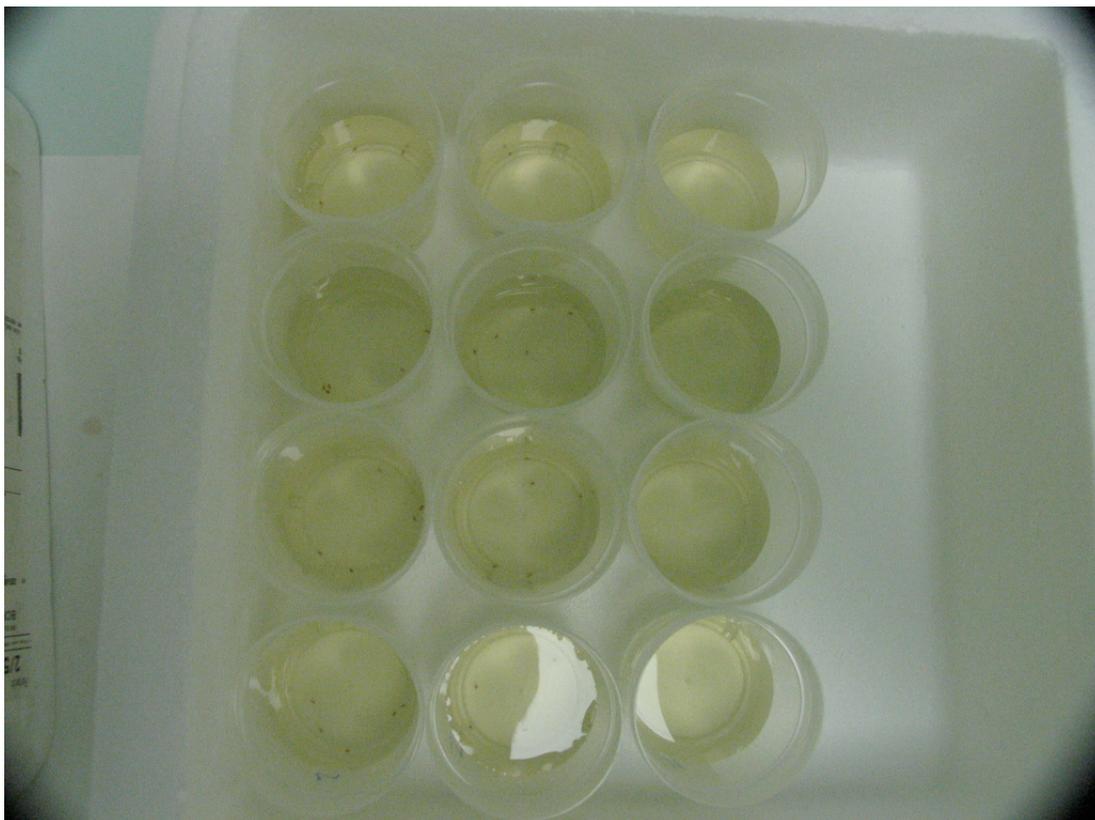


Figura 9: Testes de toxicidade crónica com *Daphnia magna*

2.6 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Na maioria dos testes de toxicidade, usa-se um planeamento experimental aleatório, com unidades experimentais homogêneas e condições ambientais controladas. Nalguns casos, é necessário recorrer à análise de covariância ou ANOVA para controlar a heterogeneidade das unidades experimentais.

Para a análise estatística, deve ser especificada a resposta (ponto final), quer esta seja em termos de uma frequência de contagem, uma taxa de mortalidade, uma taxa de inibição, etc.

Nos testes de toxicidade utilizam-se, em geral, dois desenhos básicos:

1. Estabelecimento de uma relação dose-resposta.
2. Testes para avaliar a diferença entre organismos tratados ou expostos a diferentes doses, contra um controlo negativo (dose 0).

2.7 – Determinação do CE₅₀

O CE₅₀ define-se, no âmbito deste trabalho, como a concentração de tóxico que reduz a taxa de ingestão em 50%. Este valor é calculado assumindo que um tóxico presente em solução com carga positiva, tem maior probabilidade de ser adsorvido por partículas carregadas negativamente. O modelo assume uma relação inversa, com decaimento do tipo sigmodal, entre a taxa de ingestão máxima (associada ao controlo) e a concentração da substância teste (Allen et al, 1995):

$$F = F_{\max} \frac{CE_{50}^i}{CE_{50}^i + [Cu]^i}$$

F = Ingestão esperada

F_{max} = Ingestão máxima esperada

CE₅₀ = Concentração de cobre que provoca uma inibição de 50% na taxa de ingestão

O cálculo dos parâmetros desta equação foi efectuado através do módulo SOLVER do programa Microsoft Excel[®].

2.7.1 - Estabelecimento de uma relação dose-resposta

Neste tipo de estudo, o que se pretende obter são as estimativas dos parâmetros que descrevem a relação entre as variáveis e, de seguida, usar o modelo com as estimativas dos parâmetros encontrados, para determinar os valores da concentração do tóxico que provocam um certo grau de efeito sobre os organismos expostos. Esta concentração é conhecida como concentração letal, efectiva ou inibitória mediana (CE₅₀ / CI₅₀), que representa a concentração de tóxico que produz a uma inibição de 50% na resposta esperada dos organismos expostos. Dado que a concentração é uma variável contínua, a análise estatística baseia-se na determinação de uma relação dose-resposta através de métodos de regressão não linear.

2.7.2 - Ensaio para avaliar a diferença entre organismos expostos a diferentes doses contra um controlo negativo (dose 0)

Este tipo de análise realiza-se para determinar a concentração mais alta a que não se observa efeito (CENO) ou a concentração mais baixa a que se observa efeito (CEO) e implica testes de hipóteses. O método clássico para este tipo de análises é a ANOVA, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunnett. Para este tipo de análise é necessário que se verifiquem os pressupostos de uma ANOVA (variâncias homogêneas, independência dos erros, distribuição normal dos resíduos, entre os mais importantes), que o número de replicados por tratamento seja superior a três e que todos os tratamentos tenham o mesmo número de réplicas.

É importante destacar que não se verificando os pressupostos da ANOVA será necessário proceder à transformação da variável dependente (resposta) até obter uma que verifique os ditos pressupostos ou aplicar métodos não paramétricos.

3 – RESULTADOS

Foram efectuados quatro ensaios, agrupados dois a dois em função das concentrações de cobre testadas, encontrando-se os resultados obtidos resumidos nas figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

Resultados referentes aos dois testes efectuados a concentrações de Cu entre 0 e 400 µg Cu/L (Figuras 10, 11 e 12; Tabela VI):

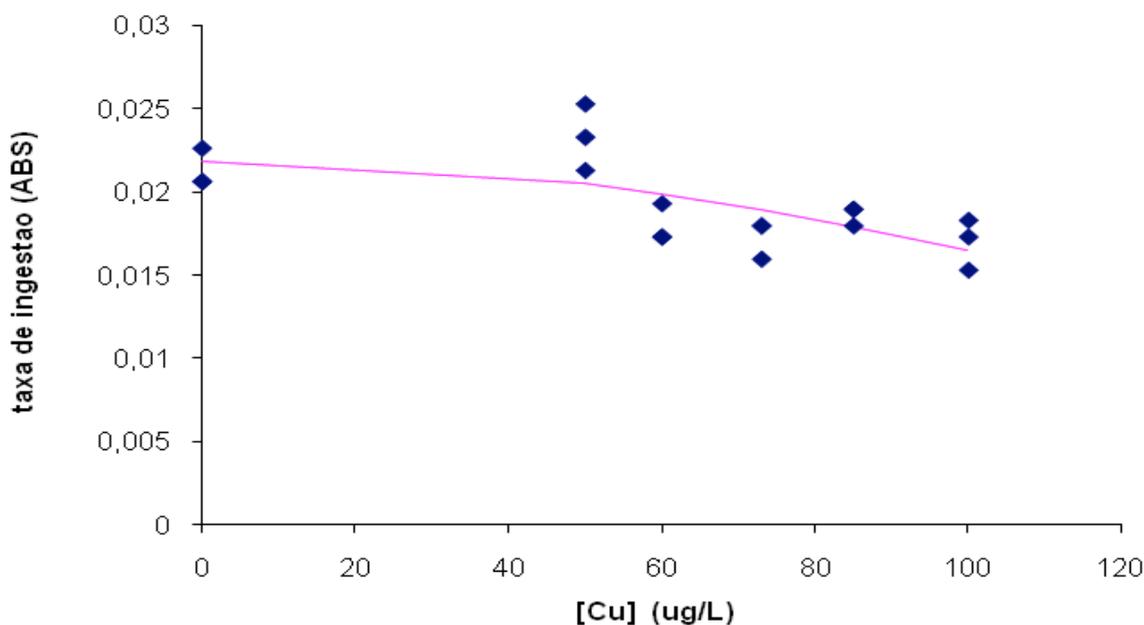


Figura 10: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu (µg/L) observado no teste 1: 0 a 100 µg Cu/L.

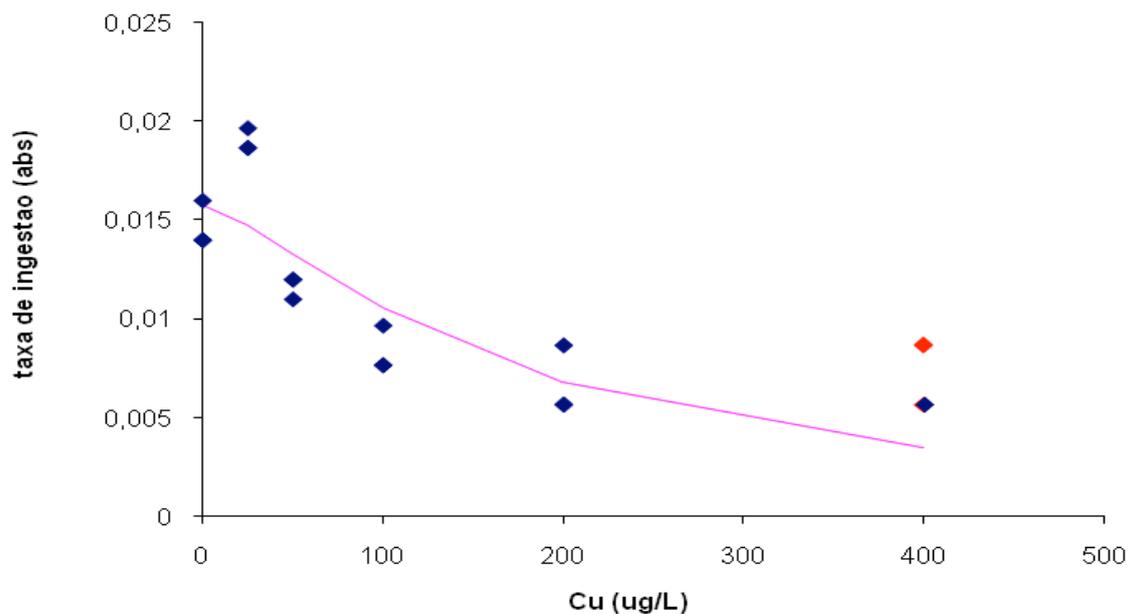


Figura 11: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) observada no teste 2: 0 a 400 μg Cu/L.

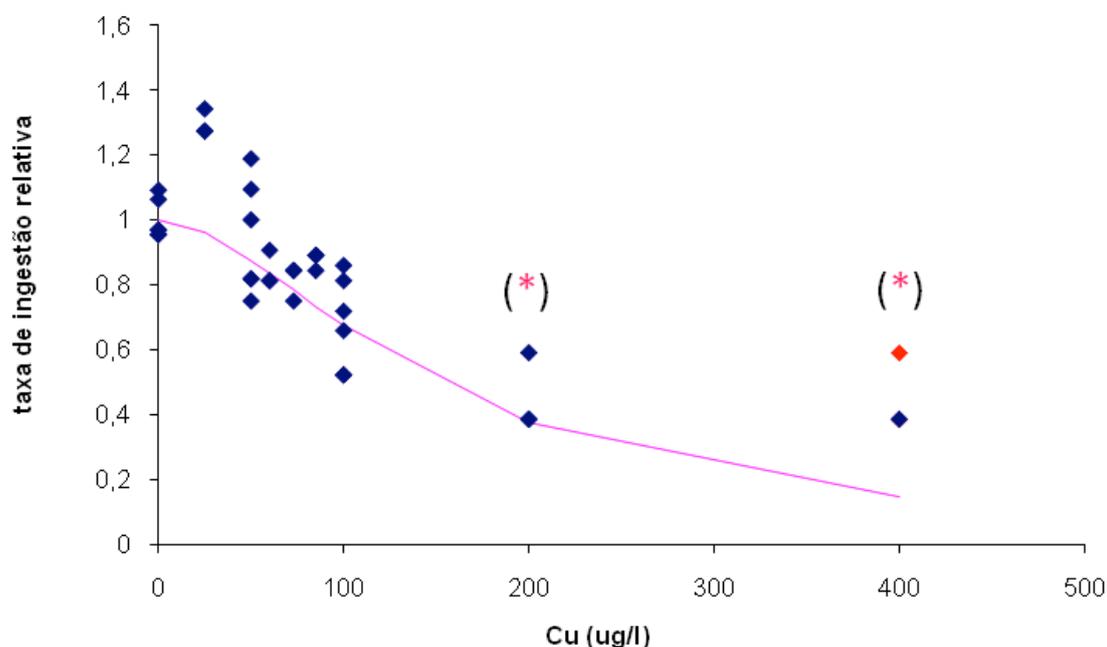


Figura 12: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) agrupando os resultados dos testes 1 e 2

(*) – valor médio estatisticamente inferior ao controlo (teste de Dunnet).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas, entre taxas de ingestão, para as diversas concentrações de cobre (Anova de uma via: $F_{8,27} = 5,35$; $p < 0,001$). O teste de Dunnet mostrou que as concentrações de cobre de 200 e 400 correspondem a taxas de ingestão significativamente inferiores à do controlo ($p < 0,05$). Com base nestes resultados os valores da CENO e da CEO são de 100 $\mu\text{g Cu/L}$ e 200 $\mu\text{g Cu/L}$, respectivamente.

Resultados referentes aos dois testes efectuados a concentrações de Cu entre 0 e 300 $\mu\text{g Cu/L}$ (Figuras 13, 14 e 15; Tabela VI)

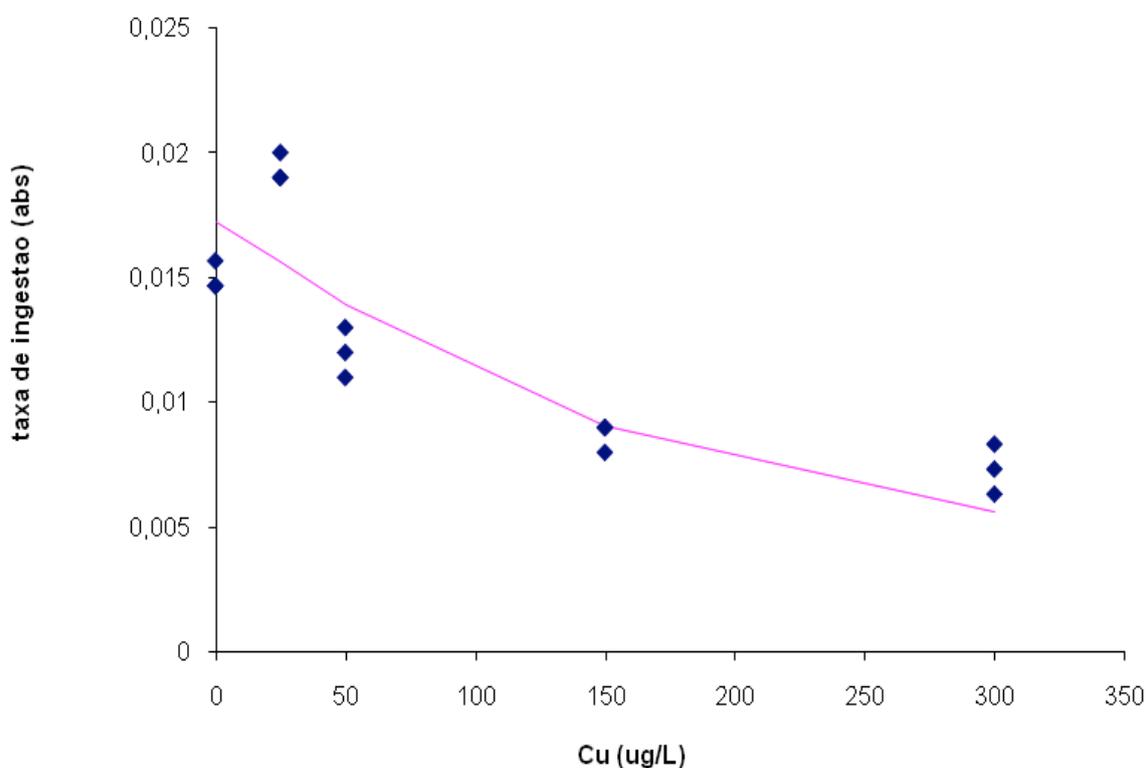


Figura 13: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu ($\mu\text{g/L}$) observada no teste 3: 0 a 300 $\mu\text{g Cu/L}$

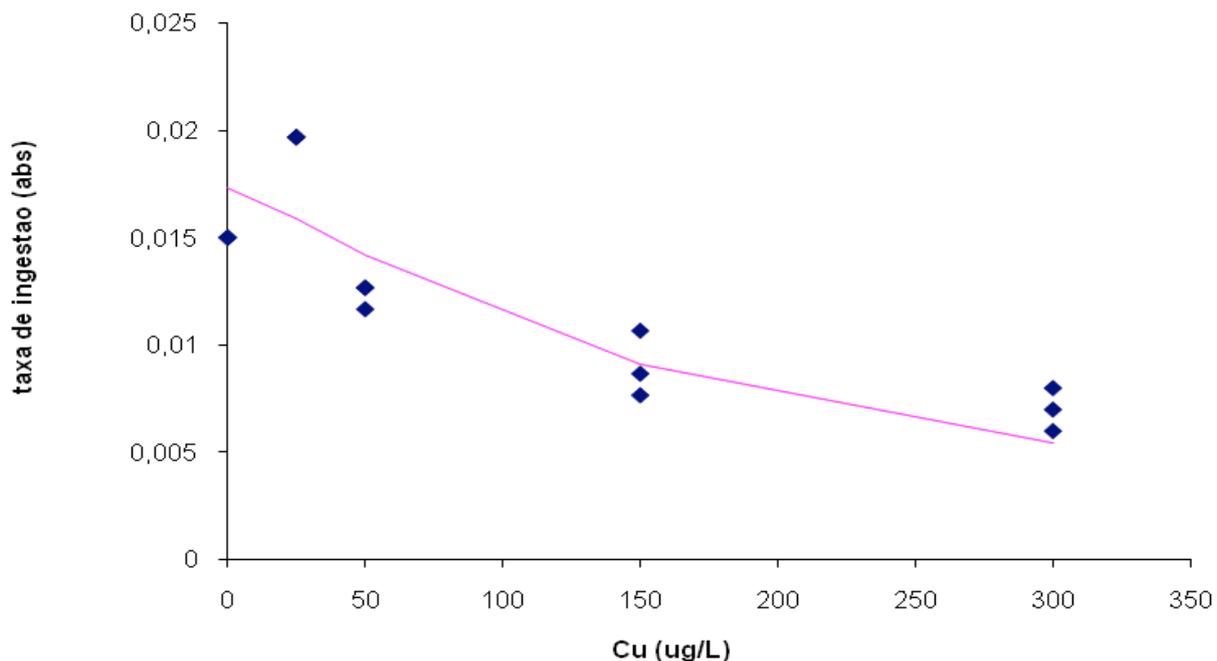


Figura 14: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu (µg/L) observada no teste 4: 0 a 300 µg Cu/L.

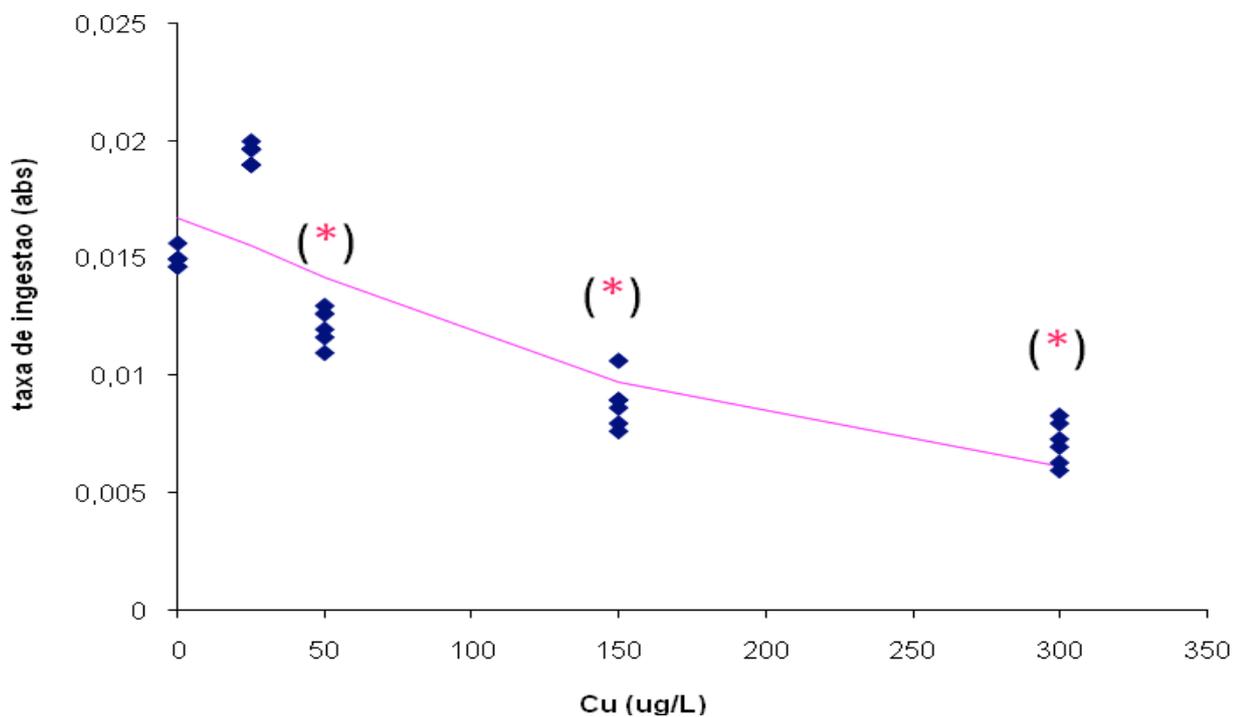


Figura 15: Relação entre ingestão (ABS) e concentração de Cu (µg/L) agrupando os resultados dos testes 3 e 4.

(*) – valor médio estatisticamente inferior ao controlo (teste de Dunnet).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre taxas de ingestão para as diversas concentrações de cobre (ANOVA de uma via: $F_{4,25} = 260,48$; $p < 0,001$). O teste de Dunnett mostrou que as concentrações de cobre de 50, 150 e 300 $\mu\text{g Cu/L}$ correspondem a taxas de ingestão significativamente inferiores à do controlo ($p < 0,05$). Com base nestes resultados os valores da CENO e da CEO são de 25 $\mu\text{g Cu/L}$ e 50 $\mu\text{g Cu/L}$, respectivamente.

Uma vez que não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os tamanhos dos indivíduos utilizados nos testes anteriores ($t_{0,05(2),64} = -0,846$; $p = 0,400$) podemos estabelecer uma CENO = 25 $\mu\text{g Cu/L}$ e uma CEO = 50 $\mu\text{g Cu/L}$ com base em todas as observações efectuadas.

Tabela VI: Resumo dos valores de CE_{50} encontrados experimentalmente

	CE_{50} ($\mu\text{g Cu/L}$)	i	Comprimento do corpo (mm)
TESTE 1	163,5	2,32	1.38-1.59 (CV=5,0%)
TESTE 2	163,5	1,42	1.04-1.44 (CV=10,7%)
TESTE 1 + TESTE 2	149,6	1,80	1.04-1.59 (CV=10,7%)
TESTE 3	163,5	1,21	1.34-1.40 (CV=1,5%)
TESTE 4	163,5	1,28	1.36-1.41 (CV=1,4%)
TESTE 3 + TESTE 4	195,4	1,26	1.34-1.41 (CV=1,4%)

Os resultados dos testes 3 e 4 são mais consistentes pois os indivíduos utilizados nos testes correspondem à mesma classe de tamanho, apresentando ainda um coeficiente de variação muito reduzido (Tabela VI). A utilização de indivíduos do mesmo tamanho é essencial pois a sensibilidade dos organismos varia com a idade (tamanho) , observando-se, geralmente, uma maior sensibilidade nos indivíduos mais pequenos.

4 - DISCUSSÃO

Em relação ao desenvolvimento da metodologia de teste crónico com *Daphnia magna*, considera-se que um bom resultado depende da adequação dos parâmetros de validade do teste às particularidades de cada cultura.

O teste apresenta, além de todas as vantagens do uso de testes de toxicidade, a vantagem de ser um teste de fácil manipulação em função do tamanho de *Daphnia magna*, com baixo custo e que fornece resultados objectivos, mensuráveis e passíveis de serem comparados. Entretanto, pode-se apontar como desvantagem a necessidade de espaços consideráveis para realização do teste. Um único teste é composto por três sequências de contentores de 100 mL.

Com relação aos parâmetros avaliados, utilizar as taxas de ingestão como parâmetro de efeito crónico é uma ferramenta pouco citada na literatura, sendo no entanto um dos objectivos para este estudo. Verificou-se que muitas vezes a diferença entre as diferentes concentrações de tóxico não é significativa acabando por não contribuir para a determinação das CENO e CEO.

As taxas de ingestão do organismo teste *Daphnia magna* diminuem com o aumento da concentração de cobre no meio, o que significa que a toxicidade de cobre aumenta com o aumento da sua concentração o que é consistente com os resultados obtidos por Shampelaere e Janssen, 2004, que reportaram $CE_{50} = 138,0-145,0 \mu\text{g Cu /L}$, em função da dureza do meio, analisando o parâmetro reprodução, para uma dureza ($250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$) idêntica à do meio utilizado neste estudo ($175 \text{ a } 225 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$), que referem também o aumento da tolerância ao tóxico cobre, com o aumento da dureza do meio.

Os valores encontrados estão também de acordo com os resultados obtidos por Shampelaere et al. (2007), onde reporta $CE_{50} = 139 \mu\text{g Cu /L}$, para avaliação da toxicidade do cobre para o organismo teste *Daphnia magna*. Outros autores (Bossuyt et al, 2004, 2005) referem valores de $CE_{50} = 30-56 \mu\text{g Cu /L}$, avaliando a toxicidade aguda valores, estes que são bastantes inferiores aos acima referidos e dos encontrados neste trabalho. Hang e Kleine (2007), encontraram uma dose letal (testes de toxicidade aguda) de Cu superior a $80 \mu\text{g /L}$ ($CL_{50} = 90 \mu\text{g Cu /L}$), para organismos de idade idêntica aos utilizados nos testes, resultados estes que

contradizem os valores encontrados e os referidos pela maior parte dos trabalhos mencionados, dado a dose letal não poder ser inferior ao CE_{50} para toxicidade crónica, em especial quando estes valores foram interpolados.

Estudos futuros deverão debruçar-se sobre variáveis como a idade/tamanho dos indivíduos utilizados e as características químicas do meio.

5 - CONCLUSÕES

Em relação à avaliação da toxicidade crónica verificou-se que, apesar de os organismos terem sobrevivido às doses de tóxicos testadas, houve um decréscimo nas taxas de ingestão a partir da concentração de 50 µg Cu/L, notando-se um decréscimo ainda mais acentuado a partir dos 100 µg Cu/L. Os testes efectuados na ausência de Cu não apresentam toxicidade crónica ao organismo-teste *Daphnia magna* nas condições testadas.

Os testes de ingestão com *Daphnia magna* na presença de cobre permitiram-nos calcular os seguintes parâmetros de toxicidade: CE₅₀=163,5 µg Cu/L, CENO = 25 µg Cu/L e CEO = 50 µg Cu/L.

6 - BIBLIOGRAFIA

Andersen, T. H., et al (2006). Acute and Chronic Effects of Pulse Exposure of *Daphnia magna* to Dimethoate and Pirimicarb. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol.25, Nº 5, 1187-1195.

Díaz, B. et al (2005). *Bioensayo de toxicidad aguda con Daphnia magna*. Cidade do México: Universidad Autónoma Metropolitana y el Instituto Nacional de Ecología.

Eugens, E. H. W., et al (2006). Population Growth of *Daphnia magna* under Multiple Stress Conditions: Joint Effects of Temperature, Food and Cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 25, Nº 5, 1399-1407.

Poyton, H. C., et al (2007). *Daphnia magna* Ecotoxicogenomics Provides Mechanistic Insights into Metal Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* , 41, 1044-1050.

Aires, A. R. L., et al (2006). *Utilização de Biomarcadores como Ferramenta de Monitoramento e Avaliação Ambiental: o caso de Recursos Hídricos*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

Allen, Y., et al (1995). A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 14, nº9, pp. 1625-1630.

Amini, A., et al (2007). A Novel Logic-Based Approach for Quantitative Toxicology Prediction. *J. Chem. Inf. Model* , 47, 998-1006.

Ashauer, R., et al (2007). New Ecotoxicological Model to Simulate Survival of Aquatic Invertebrates after Exposure to Flutuacting and Sequential Pulses of Pesticides. *Environ. Sci. Technol.* , 41, 1480-1486.

Baird, R. A. M. and Donald J (2002). Application of Postexposure Feeding Depression Bioassays With *Daphnia magna* for Assesment of Toxic Effluents in Rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.21, nº7, 1462-1468.

Barata, C., et al (2002). Among- and Within-Population Variability in Tolerance to Cadmium Stress in Natural Populations of *Daphnia magna*: Implications for

Ecological Risk Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.21, nº5, 1058-1064.

Barata, C., et al (2002). Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* , Vol. 230: 183–194.

Barata,C., et al (2000). Do Genotype Responses Always Converge From Lethal to Nonlethal Toxicant Exposure Levels? Hypothesis Tested Using Clones of *Daphnia magna* straus. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.19, nº9, 2314-2322.

Beatrici, A. C., et al (2006). Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* Submetidas a Diferentes Cultivos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, n. 2, 2006, 123-126 , v. 1, n. 2, 123-126.

Behechti, A., et al (1998). Acute Aquatic Toxicities of Four Musk Xylene Derivates on *Daphnia magna*. *Water Resources* , vol. 32, nº5: 1704-1707.

Bellas, J., et al (2001). Toxicity of Hg, Cu, Cd and Cr on Early Developmental Stages of *Ciona intestinalis* (Cordata Ascidia) With Potential Application in Marine Water Quality Assessment. *Water Resources* , vol. 35, nº12: 2905-2912.

Boherer, M. B (1995). *Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica*. São Paulo: UFSCar.

Bossuyt, B. T. A., et al (2005). Relevance of Generic and Site-Specific Species Sensitivity Distributions in the Current Risk Assessment Procedures for Copper and Zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 24, Nº 2, 470-478.

Bossuyt, B. T. A., et al (2004). Using the Biotic Ligand Model for Predicting the Acute Sensivity of Cladoceran Dominated Communities to Copper in Natural Surface Waters. *Environ. Sci. Technol* , 38, 5030-5037.

Brito, D. et al (2006). Taxa de filtração e ingestão de *Simocephalus vetulus* (Crustacea: Cladocera) alimentado com *Selenastrum Capricornutum* e *Chlorella vulgaris*. *INCI* , 753-757.

Burdett, A. S., et al (2001). Laboratory and Field Studies on the Effect of Molinate, Clomazone and Thiobencarb on Nontarget Aquatic Invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol. 20, nº10, 2229-2236.

Cairns J. and Mount, D. I (1990). Aquatic Toxicology. *Environmental Science Technology* , vol. 24, nº2:154-161.

Capizzi, T., et al (1985). Statistical Considerations in the Evaluation of Chronic Aquatic Toxicity Studies. *Environmental Science Technology* , vol.19, nº1:35-43.

Coeurdassie, M., et al (2005). Assessment of Whole Effluent Toxicity on Aquatic Snails: Bioaccumulation of Cr, Zn and Fe, and Individual Effects in Bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 24, Nº 1, 198-204.

Congdon, J. D., et al (2001). Resource Allocation-Based Life Histories: A Conceptual Basis for Studies of Ecological Toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 20, No. 8, pp. 1698–1703.

D'Abramo, L. R (1980). Ingestion rate decrease as the stimulus for sexuality in populations of *Moina macrocopa*. *Limnol. Oceanogr.* , 25(3),422-429.

DeMott, W. R (1982). Feeding selectivities and relative ingestion rates of *Daphnia* and *Bosmina*. *Limnol. Oceanogr.*, 27(3), 1982, 518-527.

Fernandez-Alba, A. R., et al (2002). Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. *Water Research* , 36, 4255-4262.

Ferreira, C. M (2003). Testes de Toxicidade Aquática para Monitoramento Ambiental. *Biológico*, (pp. 17-18). São Paulo.

Gestel, C. A. M., et al (2001). These of Acute and Chronic Bioassays to Determine the Ecological Risk and Bioremediation Efficiency of Oil-Polluted Soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.20, nº7, 1438-1449.

Giddings, J. M., et al (2000). Acute Toxicity of 4-amino Musk Xylene to *Daphnia Magna* in Laboratory Water and Natural Water. *Water Resources* , vol. 34, nº14: 3686-3689.

Hamoutene, D., et al (2000). Development of a New Biochemical Assay for Assessing Toxicity in Invertebrate and Fish Sperm. *Water Resources* , vol. 34, nº16: 4049-4053.

Han, Y., et al (2007). Evaluating Aquatic Toxicity by Visual Inspection of Thallus Color in the Green Macroalga *Ulva*: Testing a Novel Bioassay. *Environ. Sci. Technol.* , 41, 3667-3671.

Heijerick, D. G., et al (2002). Predicting Acute Zinc Toxicity for *Daphnia magna* as a Function of Key Water Chemistry Characteristics: Development and Validation of a Biotic Ligand Model. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol. 21, nº6, 1309-1315.

Heikens, A., et al (2001). The Power of Size. 2. Rate Constants and Equilibrium Ratios for Accumulation of Inorganic Substances Related to Species Weight. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vpl. 20, nº7, 1421-1437.

Hernandez, L., et al (2003). The effect of food on the respiration rates of *Daphnia magna* using a flow through system. *Scientia Marina* , 67 (3): 361-365.

Heugens, E. H. W., et al (2003). Temperature-Dependent Effects of Cadmium on *Daphnia magna*: Accumulation versus Sensitivity. *Environ. Sci. Technol.* , 37, 2145-2151.

Hoang, T. C. and Klaine, S. J (2007). Influence of Organism Age on Metal Toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 26, Nº 6, 1198-1204.

Hynea, R. V. and Maherb, W. A (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 54, 366–374.

Janssen, K. A. C. S., and Colin R (2002). A Biotic Ligand Model Predicting Acute Copper Toxicity for *Daphnia magna*: The Effects of Calcium, Magnesium, Sodium, Potassium and pH. *Environ. Sci. Technol.* , 36, 48-54.

Jui-Ho, L., et al (2005). A Novel Algal Toxicity Technique for Assessing the Toxicity of Both Metallic and Organic Toxicants. *Watwr Research* , 39, 1869-1877.

Kenaga, E. E (1978). Test Organisms and Methods Useful for Early Assessment of Acute Toxicity of Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* , 12, 1322-1329.

Klaper, S. B. L., et al (2006). *Daphnia magna* Mortality when Exposed to Titanium Dioxide and Fullerene (C60) Nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 25, No. 4, pp. 1132–1137.

Kooijman, S. A. L. M., Bedaux, J. J. M (1996). Analysis of Toxicity Tests on *Daphnia* Survival and Reproduction. *Water Resources* , vol. 30, nº7: 1711-1723.

Kooijman, S. A. L. M., et al (1996). No-Effect Concentrations in Algal Growth Inhibition Tests. *Water Resources* , vol. 30, nº7: 1625-1632.

McDonald, B. G. and Chapman, P. M (2002). PAH phototoxicity—an ecologically irrelevant phenomenon? *Marine Pollution Bulletin* 44 (2002) 1321–1326 , 44, 1321–1326.

Muysen, B. T. A. and Janssen, C. R (2001). Multigeneration Zinc Acclimation and Tolerance in *Daphnia Magna*: Implications for Water-Quality Guidelines and Ecological Risk Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.20, nº9, 2053-2060.

Muysen, B. T. A., and Janssen, C. R (2005). Importance of Acclimation to Environmentally Relevant Zinc Concentrations on the Sensitivity of *Daphnia magna* Toward Zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 24, Nº 4, 895-901.

Nakanishi, Y. T., et al (2001). Model Selection and Parametrization of the Concentration-Response Functions for Population-Level Effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.20, nº8, 1857-1865.

Nogueira, A. J. A., et al (2004). Testing physiologically-based resource allocation rules in laboratory experiments with *Daphnia magna* Straus. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* , 40 (4), 257-267.

Perry, A. R. R., et al (2002). Using a Biology-Based Model (DEBTOX) To Analyse Bioassays in Ecotoxicology: Opportunities and Recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 21, No. 2, pp. 459–465.

Pieters, B. J., et al (2005). Influence of Food Limitation on the Effects of Fenvaterate Pulse Exposure on the Life History and Population Growth Rate of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 24, Nº 9, 2254-2259.

Prestidge, R. A (1979). Ingestion and assimilation efficiency of *Aeshna brevistyla* and *Hemicordulia australiae* larvae. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research* , 13(1): 193-199.

RAND, G. M (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis.

Rassoulzadegan, M., Akyurtlakli, N (2002). An Investigation on the Toxic Effects of Malathion (Organophosphate Insecticide) on the *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea, Cladocera). *Turk J Zool* , 26, 349-355.

Reeve, M. R (1963). The Filter-Feeding of *Artemia*. *J. Exp. Biol.* , 40, 195-205.

Rohrlack, T., et al (1999). Role of Microcystins in Poisoning and Food Ingestion Inhibition of *Daphnia galeata* Caused by the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* , 737–739.

Santos, M. A (2004). *Influencia de substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por Cerio Daphnia silvestrii Daday (Crustacea, Cladocera)*. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos.

Schamphelaere, K. A. C., et al (2007). Variability of the Protective Effect of Sodium on the Acute Toxicity of Copper to Freshwater Cladocerans. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol. 26, nº3, 535-542.

Shamphelaere, K. A. C. and Janssen, C. R (2004). Effects os Dissolved Organic Carbon Concentration and Source, pH and Water Hardness on Chronic Toxicity of Copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* , Vol. 23, nº 5, 1115-1122.

Simpson, S. L. and King, C. K (2005). Exposure-pathway Models Explain Causality in Whole-Sediment Toxicity Tests. *Environmental Science and Technology* , 39, 837-843.

Snell, T. W. and Serra, M (2000). Using Probability of Extinction to Evaluate the Ecological Significance of Toxicant Effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, nº9: 2357-2363.

Taylor, R. M., et al (1994). Comparative Sub-Lethal and Lethal acute Toxicity of Cooper to The Freshwater Crayfish, *Cambarus robustus* (Cambaridae, Decapoda, Crustacea) from an Acidic Metal-Contaminated Lake and a Circumneutral Uncontaminated Stream. *Water Resources* , vol. 29, nº2: 401-408.

Troedsson, C., et al (2007). Molecular quantification of differential ingestion and particle trapping rates by the appendicularian *Oikopleura dioica* as a function of prey size and shape. *Limnol. Oceanogr.*, 52(1), 2007, 416–427 , 52(1), 416–427.

Tusseau-Vuillemin, M., et al (2004). Performance of Diffusion Gradient in Thin Films to Evaluate the Toxic Fraction of Copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol. 23, nº 9, 2154-2161.

Veen, E., et al (2002). Speciation of Copper in Sewage Effluents and its Toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* , vol.21, nº2, 275-280.

Vijver, M. G., et al (2004). Internal Metal Sequestration and its Ecotoxicological Relevance: A Review. *Environ. Sci. Technol.* , 38, 4705-4712.

Zou, E (2005). Impacts of Xenobiotics on Crustacean Molting: The Invisible Endocrine Disruption. *Integr. Comp. Biol.* , 45:33–38.

7 – ANEXOS

Tabelas de resultados dos testes realizados

Resultados obtidos de densidade óptica para determinação de volume de cultura de alga a usar como alimento.

Volumes	8	8	8	8	15	15	15	15	15	15	15	15
Ref.	0,8	0,6	0,4	0,2	0,6	0,3	0,15	0,075	0,04	0,02	0,01	0,05
Abs.	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
Leitura 1	0,824	0,593	0,423	0,188	0,594	2,721	1,454	0,743	0,396	0,218	0,13	0,086
Leitura 2	0,821	0,596	0,423	0,184	0,6	2,722	1,454	0,739	0,397	0,218	0,129	0,088
Leitura 3	0,826	0,593	0,425	0,184	0,597	2,721	1,455	0,741	0,398	0,219	0,129	0,087
Abs média	0,8236667	0,594	0,4236667	0,1853333	0,597	2,721333	1,454333	0,741	0,397	0,218333	0,129333	0,087
σ	0,0025166	0,001732	0,001155	0,002309	0,003	0,000577	0,000577	0,002	0,001	0,000577	0,000577	0,001
	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
TARA	0,8236667	0,594	0,4236667	0,1853333	0,597	2,721333	1,454333	0,741	0,397	0,218333	0,129333	0,087
Peso 1	5,7845	5,8856	5,8834	5,8554	5,8856	5,8252	5,77	5,8853	5,789	5,7674	5,8015	5,9148
Peso 2	5,8419	5,85	5,8449	5,8563	5,85	5,8777	5,7945	5,8798	5,862	5,8955	5,9578	5,9231
Peso 3	5,8966	5,8296	5,9188	5,8264	5,8296	5,981	5,8291	5,8794	5,8744	5,763	5,8034	5,8315
	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
PESO HÚM.	0,8236667	0,594	0,4236667	0,1853333	0,597	2,721333	1,454333	0,741	0,397	0,218333	0,129333	0,087
Peso 1	14,9051	13,9307	14,0152	13,8481	13,9307	20,5264	20,5909	20,8278	20,7362	20,6754	20,9066	20,7854
Peso 2	13,8981	13,8877	13,8406	13,8079	13,8877	20,5157	20,3428	20,8095	20,7759	20,8102	20,6963	20,7607
Peso 3	13,9439	13,9485	13,8667	13,8054	13,9485	20,6775	20,5392	20,7488	20,7471	20,6442	20,7215	20,7032
	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
PESO SECO	0,8236667	0,594	0,4236667	0,1853333	0,597	2,721333	1,454333	0,741	0,397	0,218333	0,129333	0,087
Peso 1	5,8248	5,9112	5,9023	5,8606	5,9112	5,8545	5,7882	5,9403	5,7985	5,9037	5,8093	5,9671
Peso 2	5,8767	5,8772	5,8636	5,865	5,8772	5,9076	5,8128	5,8918	5,8454	5,7858	5,966	5,885
Peso 3	5,9329	5,8563	5,9367	5,8334	5,8563	6,0115	5,8422	5,8496	5,8842	5,7612	5,8108	5,8386
	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8	C.9	C.10	C.11	C.12
PS (mg/ml)	0,8236667	0,594	0,4236667	0,1853333	0,597	2,721333	1,454333	0,741	0,397	0,218333	0,129333	0,087
Peso 1	0,0052694	0,003202	0,002381	0,000651	0,001708	0,001949	0,001219	0,003672	0,000633	0,009072	0,000523	0,003493
Peso 2	0,0042429	0,003392	0,002326	0,001087	0,001809	0,001988	0,001211	0,000801	-0,00111	-0,00735	0,000545	-0,00254
Peso 3	0,0044403	0,003344	0,002231	0,000874	0,001783	0,002044	0,000875	-0,00198	0,000653	-0,00012	0,000492	0,000472
Média (µg/ml)	4,6508798	3,312421	2,312662	0,870619	1,766624	1,993431	1,101939	0,830237	0,05936	0,534385	0,519989	0,474529
	Abs (1/10)	Abs (1/10)	Abs (1/10)	Abs (1/10)								

Resultados do teste 1 - densidade óptica para os testes de toxicidade crônica a concentrações de cobre entre 50 a 100 µL Cu/L

TESTE: 50 a 100 µL Cu/L

Solução 1 CTRL 0 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,123	0,121	0,101	0,022667	1,44
2	0,128	0,125	0,103	0,020667	1,44
3	0,128	0,125	0,103	0,020667	1,56
Média	0,126333	0,123667	0,102333	0,021333	1,48
Solução 2: 50 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,126	0,124	0,103	0,025333	1,49
2	0,133	0,132	0,107	0,021333	1,44
3	0,13	0,129	0,105	0,023333	1,45
Média	0,129667	0,128333	0,105	0,023333	1,46
Solução 3: 60 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,128	0,127	0,11	0,019333	1,38
2	0,131	0,131	0,112	0,017333	1,42
3	0,131	0,13	0,112	0,017333	1,42
Média	0,13	0,129333	0,111333	0,018	1,406667
Solução 4: 73 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,125	0,123	0,106	0,018	1,4
2	0,127	0,125	0,108	0,016	1,39
3	0,125	0,124	0,106	0,018	1,39
Média	0,125667	0,124	0,106667	0,017333	1,393333
Solução 5: 85 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,133	0,133	0,113	0,018	1,38
2	0,131	0,13	0,112	0,019	1,41
3	0,131	0,13	0,112	0,019	1,43
Média	0,044	0,044	0,131667	0,131667	0,131
Solução 6: 100 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,133	0,13	0,115	0,018333	1,56
2	0,136	0,135	0,118	0,015333	1,6
3	0,136	0,135	0,116	0,017333	1,59
Média	0,135	0,133333	0,116333	0,017	1,583333

Resultados do teste 2 - densidade óptica para os testes de toxicidade crônica a concentrações de cobre entre 25 a 400 µL Cu/L

TESTE: 25 a 400 µL Cu/L

Solução 1 CTRL 0 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,113	0,113	0,097	0,016	1,39
2	0,114	0,113	0,099	0,014	1,42
3	0,114	0,113	0,099	0,014	1,42
Média	0,113667	0,113	0,098333	0,014667	1,41
Solução 2: 25 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,116	0,115	0,096	0,019667	1,39
2	0,118	0,116	0,097	0,018667	1,44
3	0,118	0,116	0,097	0,018667	1,43
Média	0,117333	0,115667	0,096667	0,019	1,42
Solução 3: 50 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,111	0,11	0,099	0,011	1,27
2	0,11	0,11	0,098	0,012	1,33
3	0,11	0,11	0,098	0,012	1,33
Média	0,110333	0,11	0,098333	0,011667	1,31
Solução 4: 100 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,12	0,119	0,112	0,007667	1,04
2	0,12	0,12	0,112	0,007667	1,09
3	0,12	0,12	0,11	0,009667	1,09
Média	0,12	0,119667	0,111333	0,008333	1,073333
Solução 5: 200 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,117	0,117	0,109	0,008667	1,2
2	0,119	0,118	0,112	0,005667	1,18
3	0,119	0,118	0,112	0,005667	1,18
Média	0,118333	0,117667	0,111	0,006667	1,186667
Solução 6: 100 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,121	0,12	0,113	0,008667	1,13
2	0,123	0,122	0,116	0,005667	1,2
3	0,123	0,123	0,116	0,005667	1,17
Média	0,122333	0,121667	0,115	0,006667	1,166667

Resultados do teste 3 - densidade óptica para os testes de toxicidade crônica a concentrações de cobre entre 25 a 300 µL Cu/L

TESTE: 25 a 300 µL Cu/L					
Solução 1 CTRL 0 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,114	0,114	0,098	0,015667	1,39
2	0,115	0,114	0,099	0,014667	1,4
3	0,113	0,113	0,099	0,014667	1,4
Média	0,114	0,113667	0,098667	0,015	1,396667
Solução 2: 25 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,117	0,116	0,097	0,019	1,39
2	0,118	0,116	0,096	0,02	1,39
3	0,118	0,116	0,097	0,019	1,4
Média	0,117667	0,116	0,096667	0,019333	1,393333
Solução 3: 50 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,11	0,11	0,098	0,012	1,37
2	0,111	0,11	0,097	0,013	1,35
3	0,11	0,11	0,099	0,011	1,4
Média	0,110333	0,11	0,098	0,012	1,373333
Solução 4: 150 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,12	0,119	0,112	0,009	1,34
2	0,12	0,122	0,112	0,009	1,39
3	0,12	0,122	0,113	0,008	1,39
Média	0,12	0,121	0,112333	0,008667	1,373333
Solução 5: 300 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,119	0,119	0,111	0,007333	1,34
2	0,118	0,118	0,11	0,008333	1,38
3	0,119	0,118	0,112	0,006333	1,38
Média	0,118667	0,118333	0,111	0,007333	1,366667

Resultados do teste 4 - densidade óptica para os testes de toxicidade crônica a concentrações de cobre entre 25 a 300 µL Cu/L

TESTE: 25 a 300 µL Cu/L

Solução 1 CTRL 0 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,115	0,114	0,099	0,015	1,39
2	0,115	0,114	0,099	0,015	1,37
3	0,114	0,114	0,099	0,015	1,41
Média	0,114667	0,114	0,099	0,015	1,39
Solução 2: 25 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,117	0,115	0,096	0,019667	1,39
2	0,118	0,116	0,096	0,019667	1,4
3	0,118	0,116	0,096	0,019667	1,4
Média	0,117667	0,115667	0,096	0,019667	1,396667
Solução 3: 50 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,11	0,11	0,098	0,012667	1,37
2	0,111	0,111	0,098	0,012667	1,37
3	0,112	0,111	0,099	0,011667	1,4
Média	0,111	0,110667	0,098333	0,012333	1,38
Solução 4: 100 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,121	0,12	0,112	0,008667	1,34
2	0,122	0,121	0,11	0,010667	1,37
3	0,122	0,121	0,113	0,007667	1,37
Média	0,121667	0,120667	0,111667	0,009	1,36
Solução 5: 200 µg Cu/L					
Ensaio	Absorvância 440 nm				Tamanho (mm)
	A0	A1	B	Δabs.	
1	0,119	0,118	0,111	0,007	1,36
2	0,118	0,118	0,11	0,008	1,39
3	0,119	0,118	0,112	0,006	1,38
Média	0,118667	0,118	0,111	0,007	1,376667