

## Artigo Técnico

# Estudo da toxicidade de metais (zinco e cádmio) sobre *Ceriodaphnia dubia*, por multivias de exposição e recuperação biológica de descendentes

*Study of metals toxicity (zinc and cadmium) to Ceriodaphnia dubia, for multi-exposition and biological recovery of offspring*

Marcela Merides Carvalho<sup>1</sup>, Vivian Silva Lira<sup>2</sup>, Cláudia Hitomi Watanabe<sup>3</sup>, Renata Fracácio<sup>4</sup>

## RESUMO

Os metais frequentemente são avaliados em águas doces como soluções dissolvidas, assumindo que o efeito tóxico é causado unicamente por via aquática (respiração e contato). No entanto, estudos abrangendo concomitantemente a toxicidade na água e no alimento, como acontece no meio, são pouco discutidos na literatura. No presente estudo, a toxicidade de zinco e cádmio foi avaliada expondo-se *Ceriodaphnia dubia* simultaneamente ao alimento e ao meio aquoso. A espécie de alga verde *Raphidocelis subcapitata* foi exposta durante 96h a concentrações de Zn (0,18 e 0,27 mg.L<sup>-1</sup>) e Cd (0,001 e 0,0015 mg.L<sup>-1</sup>). Os resultados foram analisados estatisticamente por meio da Análise de Variância (Kruskal-Wallis). As algas foram usadas como fonte de alimento para *C. dubia*, durante exposição crônica (oito dias), nas mesmas concentrações. Posteriormente, os neonatos (geração F1) foram introduzidos em água e alimentação sem contaminantes, para averiguação da capacidade de recuperação biológica. Foram avaliados número de neonatos por indivíduos, morfologia dos neonatos e quantificação dos metais em tecido biológico. Os resultados demonstraram que nas concentrações testadas não houve inibição no crescimento de *R. subcapitata*, enquanto para *C. dubia* evidenciou-se toxicidade crônica pela redução na taxa reprodutiva nas duas gerações, para ambos metais. Concluiu-se que, mesmo em concentrações relativamente baixas, os metais zinco e cádmio podem alterar o padrão reprodutivo dos invertebrados de água doce, comprometendo o ecossistema aquático e sua capacidade de recuperação. Considerando os efeitos tóxicos desses metais e sua interferência no sistema biológico, novos ensaios ecotoxicológicos devem ser realizados para melhor compreensão do comportamento dessas substâncias nos organismos.

**Palavras-chave:** toxicidade, metais; *Raphidocelis subcapitata*; *Ceriodaphnia dubia*; gerações.

## ABSTRACT

Metals are often evaluated in fresh water as dissolved solutions, assuming that the toxic effect is caused only by water (respiration and contact). However, toxicity studies in food and water, in a concomitant way, as occurs in the environment, are less discussed. In this study, zinc and cadmium toxicity was evaluated through the exposure of *Ceriodaphnia dubia* to contaminated food and water. The species of green algae *Raphidocelis subcapitata* was exposed for 96h to concentrations of Zn (0,18 and 0,27 mg.L<sup>-1</sup>) and Cd (0,001 and 0,0015 mg.L<sup>-1</sup>). The results were statistically analyzed by means of Analysis of Variance (Kruskal-Wallis). Algae were used as food source for *C. dubia*, during chronic exposure (eight days) in the same concentrations described. Subsequently, neonates (F1 generation) were introduced in non-contaminated water and food in order to ascertain their biological recovery capacity. The number of newborns by individuals, morphology of newborns, and quantification of metals in biological tissue were evaluated. The results showed that the tested concentrations did not inhibit the growth of *R. subcapitata*, while *C. dubia* had chronic toxicity, with reduction in the reproductive rate in both generations, for both metals. The results allowed the conclusion that, even at relatively low concentrations, the metals zinc and cadmium can alter the reproductive patterns of freshwater invertebrates, compromising the aquatic ecosystem and its resilience. Thus, considering the toxic effects of these metals and their interference in the biological system, new ecotoxicological tests should be performed to allow a better understanding of the behavior of these substances in organisms.

**Keywords:** toxicity, metals; *Raphidocelis subcapitata*; *Ceriodaphnia dubia*; generations.

<sup>1</sup>Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Sorocaba (SP). Pesquisadora no Laboratório Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia da UNESP - Sorocaba (SP), Brasil.

<sup>2</sup>Mestre em Ciências Ambientais pela UNESP. Pesquisadora no Laboratório Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia da UNESP - Sorocaba (SP), Brasil.

<sup>3</sup>Mestre em Ciências Ambientais pela UNESP. Pesquisadora no Laboratório de Química da UNESP - Sorocaba (SP), Brasil.

<sup>4</sup>Doutora pela UFSCar, Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Departamento de Toxicologia Ambiental da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Sorocaba (SP), Brasil.

**Endereço para correspondência:** Marcela Merides Carvalho - Departamento de Toxicologia e Contaminantes Ambientais, Instituto de Ciência e tecnologia de Sorocaba, UNESP - Avenida 3 de Março, 511, Alto da Boa Vista, 18087-180 - Sorocaba (SP), Brasil - E-mail: marcela.merides@hotmail.com

**Recebido:** 10/01/16 - **Aceito:** 05/09/16 - **Reg. ABES:** 158722

## INTRODUÇÃO

O ecossistema aquático tem sido alterado em diferentes escalas nas últimas décadas devido à poluição por resíduos industriais, domésticos e agropecuários. Como resultado, a degradação ambiental e a diminuição da qualidade da água influenciam negativamente a comunidade aquática, que vive exposta a diversas matrizes de contaminantes. Diante disso, devem ser analisados os efeitos tóxicos de poluentes em organismos de diferentes níveis tróficos e em concentrações representativas para o meio. Assim, torna-se possível compreender os impactos desses contaminantes no ecossistema aquático de forma mais ampla, a fim de gerar suporte para tomadas de decisão no que se refere à proteção da vida aquática.

Na literatura, destacam-se com maior frequência testes de toxicidade por via única de exposição, com ênfase para o contato dos organismos-teste com a água contaminada, que ocorre através das paredes do corpo e da respiração (MEYER *et al.*, 2005; ZAGATTO, 2006). Porém, tornam-se necessários estudos mais realistas, que considerem as multivias de exposição, como a dietética, além da aquosa (MEYER *et al.*, 2005; ZAGATTO, 2006).

Segundo Chen e Folt (2000), a concentração de um contaminante no meio aquático nem sempre prediz a concentração na biota, pois o contaminante pode biomagnificar nos níveis tróficos subsequentes, podendo apresentar concentrações superiores às identificadas no meio. Como consequência, ocorre a diminuição da biodiversidade do ecossistema (MISHRA *et al.*, 2008).

Naturalmente, os organismos vivos necessitam de quantidades variadas de alguns elementos químicos para desenvolverem suas atividades metabólicas. Porém, em concentrações inadequadas, tais elementos podem ser altamente tóxicos. Os efeitos biológicos dependem das propriedades físicas e químicas das substâncias, da dose ou concentração ambiental, do tempo de exposição, das vias de contato, do período de desenvolvimento no qual o organismo foi exposto, entre outros fatores (DAMSTRA, 2002).

Nesse sentido, a entrada contínua de metais no ambiente aquático constitui uma potencial ameaça aos ecossistemas naturais, devido à sua ação direta nos organismos. Diferentes efeitos biológicos podem surgir, como anomalias reprodutivas, desenvolvimento desordenado de células e efeito teratogênico, comprometendo as gerações seguintes (ICHME, 1981; BAIRD, 2002; RAND & PETROCELLI, 1985; BILA & DEZOTTI, 2007; SODRÉ *et al.*, 2007).

Assim, além da necessidade de ampliação do conhecimento sobre os efeitos tóxicos de metais, é importante também verificar se a retirada desses compostos favorece a recuperação biológica dos organismos. Em estudo sobre microcrustáceos expostos a concentrações de metais, Mangas-Ramirez, Sarma e Nandini (2004) demonstraram que o conhecimento da capacidade natural de regeneração biológica do organismo fornece informações cruciais para a recuperação da comunidade aquática, uma vez que permite identificar a relação entre o fator de degradação e a resiliência do meio.

Tendo como uma de suas finalidades proteger as comunidades aquáticas, a Resolução CONAMA nº 357/05 estabeleceu padrões de

qualidade de água doce com concentrações dos metais cádmio (Cd) e zinco (Zn) consideradas ambientalmente seguras para corpos d'água (CONAMA, 2005; USEPA, 2000). Apesar disso, dados sobre as concentrações detectadas em ambientes naturais no Brasil indicaram que 50% dos corpos d'água avaliados apresentavam-se em desacordo com os padrões estabelecidos, segundo relatórios de qualidade de águas superficiais da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2012).

Diante do exposto, o estudo ecotoxicológico, em conjunto com análise química, pretende contribuir para a compreensão dos efeitos desses elementos no ecossistema aquático, respondendo às seguintes questões:

1. As concentrações limites dos metais Cd e Zn permitidas pela legislação brasileira para a proteção da vida aquática e aquelas encontradas em ambientes naturais podem causar efeito tóxico para organismos de diferentes níveis tróficos (algas – *Raphidocelis subcapitata* e microcrustáceos – *Ceriodaphnia dubia*) por multivias de exposição, simulando ambiente natural?
2. Gerações provenientes de pais expostos, mesmo em ambientes livres de contaminação, apresentam toxicidade ou são capazes de se recuperar após uma geração?

## METODOLOGIA

### Desenho experimental

#### *Testes de exposição crônica de R. subcapitata aos metais Zn e Cd: avaliação da toxicidade*

Os ensaios foram realizados utilizando-se como organismo-teste a espécie *R. subcapitata* exposta a dois metais, Zn e Cd, separadamente. As primeiras concentrações (0,18 mg.L<sup>-1</sup> de Zn; e 0,001 mg.L<sup>-1</sup> de Cd) foram baseadas na Resolução CONAMA 357/05, e são permitidas para corpos de água enquadrados como classes 1 e 2 – esses dados estão representados nos resultados como LB (legislação brasileira). As segundas (0,27 mg.L<sup>-1</sup> de Zn; e 0,0015 mg.L<sup>-1</sup> de Cd) foram baseadas na concentração média detectada em corpos de água do estado de São Paulo, segundo a CETESB (2012) – esses dados estão representados nos resultados como MA (meio ambiente).

Os ensaios com algas expostas às concentrações de metais acima citadas foram montados em erlenmeyers com capacidade para 250 mL, previamente descontaminados com banho a 10% de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e esterilizados em autoclave a 180°C, seguindo-se a inserção de 100 mL de meio de cultura oligo preparado, segundo a ABNT NBR 12648 (ABNT, 2011).

Na sequência, foram adicionadas as soluções-teste de cada metal separadamente, com auxílio de micropipeta automática, finalizando-se a montagem experimental com a inoculação de células algais correspondentes à quantidade de 5x10<sup>5</sup>. O controle experimental foi realizado apenas com o meio oligo, seguindo-se a mesma condição acima descrita.

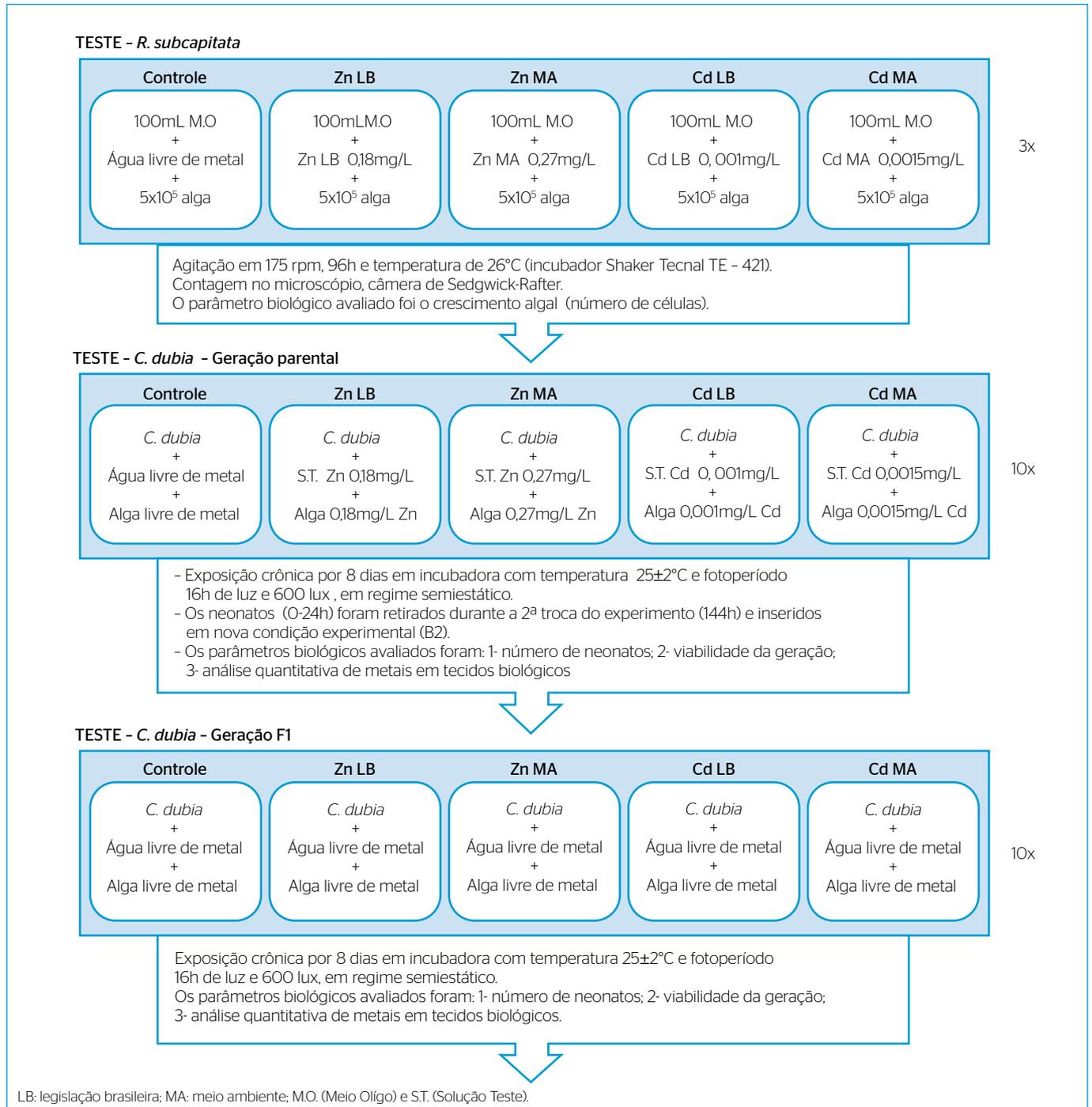
Todo o experimento foi realizado em triplicata e repetido em dois momentos distintos para averiguação da reprodutibilidade dos dados (Testes I e II). Os ensaios foram mantidos em incubadora Shaker (Tecnal TE – 421) com controle automático de agitação em 175 rpm e temperatura de  $26\pm 1^\circ\text{C}$ , durante 96h, seguindo-se as recomendações da ABNT NBR 12648 (ABNT, 2011).

Após esse período, as algas foram imediatamente preservadas em lugol e o número de células foi contado em microscópio óptico por

meio de câmara de Sedgwick-Rafter, seguindo-se as recomendações da CETESB (L5.303/2012).

Os valores brutos do número de células dos tratamentos foram comparados ao mesmo parâmetro obtido no controle por meio da análise estatística de Kruskal-Wallis para averiguar a diferença significativa no crescimento celular e consequente toxicidade nos tratamentos.

O resumo do experimento pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1 - Desenho experimental dos ensaios ecotoxicológicos.**

### **Testes de toxicidade crônica com *C. dubia* exposta a Zn e Cd por multivias de exposição: água e alimentos previamente contaminados - geração Parental**

Os ensaios crônicos com *C. dubia* foram realizados com as mesmas concentrações dos metais citados no item A. Para tanto, neonatos com idade entre 6 e 24h de vida foram selecionados. Utilizaram-se 10 réplicas, contendo 1 organismo-teste em cada, para os ensaios com Zn (0,18 mg.L<sup>-1</sup> – LB; e 0,27 mg.L<sup>-1</sup> – MA), com Cd (0,001 mg.L<sup>-1</sup> – LB; e 0,0015 mg.L<sup>-1</sup> – MA) e de controle (apenas água de cultivo, livre de contaminantes). As soluções teste foram preparadas a partir da água de cultivo, constituída de água mineral Klarina, com características químicas sem os metais Zn e Cd em sua composição.

Os experimentos permaneceram em incubadoras com controle de temperatura (25±2°C) e fotoperíodo (16h de luz e 600 lux), durante 8 dias, em regime semiestático (troca total das soluções experimentais a cada 3 dias), com monitoramento dos parâmetros pH, dureza e oxigênio a cada troca, seguindo-se as recomendações da US EPA método 1002.0 (USEPA, 2002).

Nesse experimento, os itens alimentares foram as algas da espécie *R. subcapitata* previamente contaminadas em separado pelos metais Zn e Cd (cada metal em duas concentrações distintas, conforme descrito anteriormente) e algas livres de contaminantes, ministradas para o grupo controle. O alimento *R. subcapitata* foi doado diariamente à *C. dubia* em testes em quantidade equivalente a 10<sup>5</sup> células/organismo além de 0,02 mL por indivíduo de alimento composto ministrado 2 vezes por semana, seguindo recomendações da norma US EPA método 1002.0 (USEPA, 2002).

Os parâmetros biológicos avaliados foram:

1. número de neonatos;
2. viabilidade da geração Parental em relação ao controle;
3. análise quantitativa de metais em tecidos biológicos.

### **Viabilidade reprodutiva da geração F1, provenientes de pais expostos após permanência em meio livre de contaminação**

Os neonatos (F1) provenientes de pais expostos foram retirados durante a segunda troca do experimento (144h) e introduzidos em soluções livres de contaminação (água de cultivo). A alimentação ministrada foi alga livre de metal para averiguar a capacidade biológica de recuperação reprodutiva na ausência de contaminante, conforme descrito anteriormente para a condição controle. Os experimentos foram mantidos nas condições ambientais idênticas às descritas acima.

Os parâmetros biológicos avaliados foram:

1. número de neonatos;
2. viabilidade da geração F1 proveniente de adultos expostos por contato com água e alimento previamente contaminado com cada metal;
3. análise quantitativa de metais em tecidos biológicos.

O resumo do desenho experimental pode ser observado na Figura 1.

### **Digestão ácida**

Para a quantificação dos metais em tecidos de *C. dubia*, utilizou-se o método da digestão ácida descrito por Soares (2011). Para realizar a digestão dos organismos-teste, foram utilizados dez organismos *C. dubia* previamente lavados com ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA), utilizado para retirar o metal adsorvido. Em seguida, foram levados à estufa de secagem por 20 min. No momento da digestão, cada organismo foi dissolvido utilizando-se uma mistura de 150 µL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65% (v/v) e 50 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% (v/v) por organismo, ambos reagentes em grau PA (Pureza Analítica). A mistura permaneceu em repouso durante aproximadamente 12h, em seguida adicionaram-se de 3000 µL de água ultrapura em cada tubo de ensaio. O preparado final foi homogeneizado e levado para as determinações dos elementos metálicos. As análises das concentrações de Zn foram feitas em Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado/ICP – OES (series 720 da Agilent), seguindo o método de APHA 3111 e as do Cd em Espectrofotômetro de Absorção Atômica – Forno de Grafite/EEA - FG (Varian – 240Z), seguindo o método da EPA 29, no Laboratório de Química Ambiental da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Sorocaba, São Paulo.

### **Tratamento dos dados**

A avaliação do potencial de toxicidade crônica dos testes foi realizada pela comparação entre o controle e os tratamentos contaminados, utilizando o teste de Kruskal-Wallis – parâmetros reprodutivos (AYRES et al., 2007), no software Biostat 5.3.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

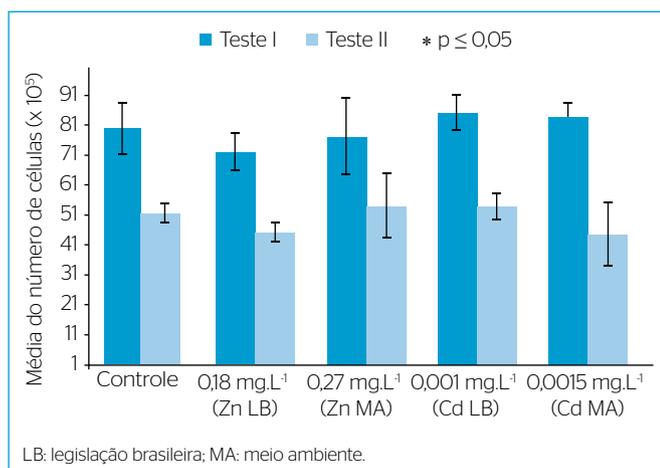
Os testes de toxicidade com a alga *R. subcapitata* exposta a concentrações de Zn e Cd não apresentaram inibição no crescimento de células para as concentrações testadas, em relação ao número de células obtidas na condição controle (p≤0,05), conforme Figura 2. Para garantir a reprodutibilidade dos dados, os testes foram realizados duas vezes nas mesmas condições, mas em períodos diferentes, sendo os dados apresentados com valores médios entre I e II de cada concentração. Considerando-se os dados brutos, foi observada uma redução no número de células de cada tratamento do metal Zn em relação ao grupo controle. A redução média foi de 11% Zn LB e 3,5% Zn MA (Figura 2), o que não foi suficiente para atestar a toxicidade desse metal nas concentrações estudadas.

Em relação à exposição às concentrações de Cd, observou-se um tênue aumento no número de células correspondentes a 4,5% Cd LB, enquanto o Cd MA apresentou redução média de 4% Cd (Figura 2).

Segundo Britto (2011), a alga *R. subcapitata* cresceu exponencialmente na ausência de metais durante bioensaio de três dias. Na presença de baixa concentração de Cd correspondente a 17 µg.L<sup>-1</sup>, assim

como na presença de Zn a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ , também não provocou efeito significativo sobre o crescimento da alga. Para estas concentrações de metais, os números de células ao fim de 72h foram semelhantes aos do controle. No entanto, as concentrações de Zn e Cd testadas por Britto (2011) foram muito menores se comparadas às concentrações utilizadas na presente pesquisa; portanto, nota-se que não foi possível evidenciar efeito tóxico em tais concentrações, demonstrando tolerância ao metal em concentrações extremamente baixas e/ou sugerindo novos ensaios com concentrações maiores.

As concentrações utilizadas por Britto (2011) são extremamente baixas, não apresentando qualquer efeito na média de crescimento algal; também os dados do presente estudo apontam que a alga *R. subcapitata* apresenta tolerância à exposição de Zn e Cd em baixas concentrações. Estudos mostram que algumas espécies podem amenizar ou impedir o efeito tóxico quando o metal está no interior da célula, devido ao mecanismo natural de detoxificação de compostos metálicos. Tal mecanismo é regulado pelas proteínas metalotioneínas (MTs), que atuam na regulação de metais essenciais como Zn e na detoxificação de metais tóxicos como Cd. Essas proteínas já foram identificadas em espécies de algas como a *C. vulgaris*, sendo induzidas na presença de Zn e/ou Cd. No entanto, quando a concentração do metal ultrapassa os limites naturais do sistema metabólico, a capacidade da alga de responder a esses metais é inibida, de modo que tem início o processo de toxicidade e bioacumulação (DAMSTRA, 2002; RAND & PETROCELLI, 2004). A taxa de crescimento das algas *R. subcapitata* também já foi avaliada durante bioensaios de 96h de exposição a concentrações variadas de Cd ( $0,06$ ;  $0,15$ ;  $0,29$ ;  $0,68$  e  $1,29 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cromo – Cr ( $1,82$ ;  $3,57$ ;  $7,36$ ;  $14,9$  e  $27,4 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Ao término do ensaio, observou-se que o Cd era mais tóxico que Cr. Assim, o Cd deve ser considerado e mais investigado, devido ao seu potencial de ação negativo (RODGHER *et al.*, 2012).

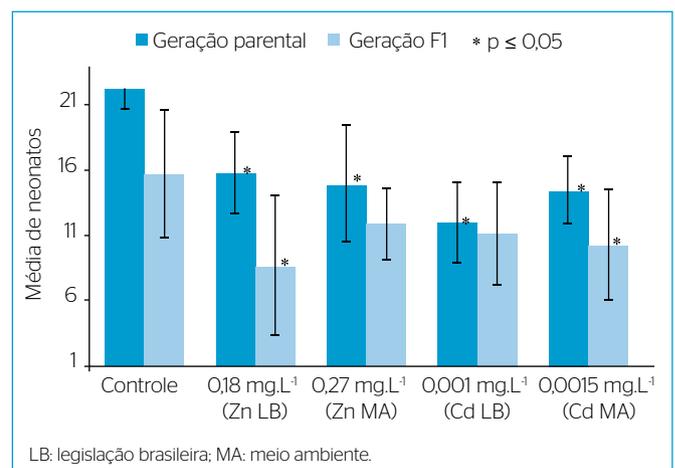


**Figura 2** - Resultados dos testes de toxicidade crônica (média da contagem do número de células) de *R. subcapitata* expostas às concentrações de metais.

Considerando-se os dados obtidos na presente pesquisa, podemos notar que as concentrações testadas de Zn e Cd para alga *R. subcapitata* não ultrapassaram a capacidade de suporte do mecanismo de detoxificação do organismo-teste, uma vez que não foi detectado efeito tóxico nas mesmas ( $p \leq 0,05$ ). Considerando que o Zn é um micronutriente essencial para os seres vivos, o limite de aceite desde metal torna-se superior ao de outros metais; portanto, quando Zn entra em contato com os organismos através dos corpos hídricos em concentrações pequenas, como as testadas, o efeito não observado nesse nível trófico pode biomagnificar para outros níveis e transcender o limite natural de outros organismos, por isso não deve se excluir a possibilidade de toxicidade proveniente da inserção de tal metal no ambiente (DAMSTRA, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2004). No entanto, a alga ocupa a base da cadeia trófica, servindo de alimento para outros organismos. Sendo assim, o efeito não observado neste primeiro nível pode refletir em outros níveis, de acordo com diversos estudos (TAYLOR; BAIRD; SOARES, 1998; HOOK & FISHER, 2001; GUAN & WANG, 2004; DE SCHAMPHELAERE *et al.*, 2004; EVENS; SCHAMPHELAERE; JANSSEN, 2009).

Durante o teste de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia*, houve a exposição simultânea dos organismos às soluções-teste de metais e alimento natural previamente contaminado com os metais Zn e Cd nas concentrações descritas anteriormente (Figura 1). Para os parâmetros reprodutivos, houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) em todos os grupos da geração parental, conforme a Figura 3. Comparando-se a média de neonatos do grupo controle com os neonatos dos demais tratamentos, foi verificada uma redução de: 32% para Zn LB; 32% para o Zn MA; 45% para o Cd LB; e 36% para o Cd MA.

Taylor, Baird e Soares (1998) realizaram um estudo de toxicidade semelhante ao da presente pesquisa, no qual expuseram dois organismos aquáticos *Chlorella vulgaris* a um gradiente de concentrações de Cd entre 0,1 e 1.000  $\text{mg.L}^{-1}$  para avaliar os efeitos da exposição alimentar com *Daphnia magna*. Os autores concluíram que a ingestão das algas contaminadas levou à redução do crescimento e da reprodução de *D. magna*. Na presente pesquisa, com as



**Figura 3** - Resultados de reprodução dos testes de toxicidade crônica na exposição e alimentação das *C. dubia* com concentrações de metais e geração F1.

multivias de exposição (incluindo a alimentar) simulando uma situação real, também pode se observar o efeito deletério do Cd sobre a reprodução de *C. dubia*. De Schampelaere et al. (2004) fizeram uma crítica sobre a pouca atenção que tem sido dirigida para a toxicidade de metais dietéticos para invertebrados de água doce. Em vista disso, apresentaram um estudo sobre a toxicidade crônica de Zn na dieta para *D. magna*, e obtiveram como resultado uma redução significativa de 40% do total de reprodução nas concentrações de 28 e 61 mg.L<sup>-1</sup>. Sofyan, Price e Birge (2007) também observaram efeitos significativos sobre a sobrevivência, taxa de alimentação e reprodução de *C. dubia* após exposição crônica de água e alimento contaminados com várias concentrações de Cd (0,5; 10; 20; 40 e 80 µg.L<sup>-1</sup>), o que corrobora com os dados da presente pesquisa, apresentando efeito não inibitório em cladóceros em concentrações consideradas baixas.

A exposição de *D. magna* a 0,5, 1, 2, 4, 10 µg.L<sup>-1</sup> de Cd por meio da abordagem integrada via alimento e contato direto com água contaminada foi avaliada por Barata et al. (2002). Os autores demonstraram que a acumulação de Cd no organismo-teste foi duas vezes maior por exposição à água do que por ingestão de algas contaminadas. Também observaram que os efeitos deletérios na taxa de reprodução foram mais evidentes na exposição apenas de água, se comparados aos efeitos da exposição simultânea de água e alimento. Na presente pesquisa, a exposição simultânea ao alimento e à água contaminada também revelou a toxicidade considerando-se os aspectos reprodutivos.

Rodgher e Espíndola (2008) verificaram a diminuição da sobrevivência e do número de neonatos pela exposição de *C. dubia* quando alimentadas com alga *P. subcapitata* (atual *R. subcapitata*), expostas na fase de crescimento exponencial à níveis de Cd dissolvidos em concentrações de 0,63, 1,51, 2,93, 6,85, 12,60 x 10<sup>-7</sup>. Em outro estudo experimental, Rodgher e Espíndola (2007) observaram efeitos tóxicos significativos para sobrevivência e reprodução de *C. dubia*, quando exposta e alimentada com alga contaminada por Cr em concentrações de 8,73; 18,22 e 34,04 mg.L<sup>-1</sup>. Apesar de no presente estudo não ser possível afirmar que a alimentação desencadeou a toxicidade, o que possivelmente contribuiu para os efeitos deletérios observados, tais dados corroboram com a presente pesquisa, na qual os organismos foram expostos em situações semelhantes, mesmo sendo com metais diferentes, de modo que pôde-se observar efeitos reprodutivos nos organismos expostos.

De acordo com os trabalhos encontrados na literatura, fica evidente que o alimento deve ser considerado uma fonte importante de contaminação de Cd, Zn e outros metais. Por isso, uma análise aprofundada dos efeitos tóxicos sobre organismos zooplânctônicos após exposição crônica ao alimento contaminado deve ser feita, pois tais informações auxiliam na predição dos riscos que esse tipo de exposição pode ter sobre o equilíbrio desse ecossistema, garantindo a segurança de outros organismos e de seus descendentes.

Outro aspecto importante sobre a toxicidade dos metais para organismos aquáticos está relacionado à existência ou não de recuperação depois de interrompida a exposição dos organismos a esses tóxicos. De acordo com Mangas-Ramirez, Sarma e Nandini (2004), cladóceros

expostos a concentrações de metais podem apresentar recuperação quando o ambiente torna-se favorável. No entanto, poucos trabalhos possuem esse enfoque.

Na presente pesquisa, considerando-se o teste da geração F1 (neonatos provenientes de pais expostos aos metais por via aquosa e alimentar simultaneamente), os neonatos foram introduzidos em meio livre de contaminante, e alimentados com alga pura não contaminada. Foi possível observar que os neonatos não se desenvolveram como no grupo controle e a exposição da geração parental interferiu na taxa de reprodução da geração F1, uma vez que se registrou a redução no número de neonatos, em relação ao número de neonatos obtido na condição controle, em 47, 27, 27 e 33%, quando a geração F1 foi proveniente de pais expostos aos Zn LB, Zn MA, Cd LB e Cd MA, respectivamente (Figura 3).

Essa redução no número de neonatos da geração F1 mostra que a atuação do Zn e Cd pode comprometer as gerações seguintes, pois seus descendentes, mesmo livres de contaminantes, não apresentaram recuperação biológica entre as gerações.

Já as análises químicas das amostras de tecido biológico digerido para quantificação de metais incorporados no organismo demonstraram que, em todas as amostras, os valores dos metais Zn e Cd encontraram-se bem abaixo das concentrações iniciais a que os organismos foram expostos. Sendo assim, de acordo com os dados dos testes de toxicidade com organismo *Ceriodaphnia dubia*, não houve valores que acusassem bioconcentração dos elementos metálicos pelo método, conforme Tabela 1.

Segundo Castro et al. (2008), a concentração de contaminantes é o processo pelo qual uma substância química é absorvida do ambiente aquático para os tecidos biológicos. Essa exposição ao contaminante pode ser por meio das áreas dérmicas e respiratórias do organismo e, segundo a autora, a dieta alimentar não é inclusa. Já Sofyan et al. (2008) apresentam dados indicando que o Cd foi acumulado tanto por meio da exposição à água contaminada quanto por meio da dieta de *C. dubia*, afetando a alimentação e produção de neonatos. Além disso, foi observada transferência de Cd na cadeia trófica entre os produtores primários (*R. subcapitata*) e consumidores primários (*C. dubia*), indicando a importância de estudos sobre multivias de exposições como as fontes de

**Tabela 1 - Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn com o organismo-teste *C. dubia*.**

	Concentração de metais em tecido biológico (µg.L <sup>-1</sup> )			
	[ ] Teste	1º Teste	2º Teste	Média
Zn LB	180	28,980	23,450	26,220 ± 1,400
Zn MA	270	23,260	33,360	28,310 ± 4,870
Cd LB	1	0,028	0,041	0,031 ± 0,010
Cd MA	1,5	0,041	0,028	0,028 ± 0,010
Zn LB F1	-	25,780	22,460	24,120 ± 4,110
Zn MA F1	-	27,910	25,500	26,700 ± 3,100
Cd LB F1	-	0,370	0,096	0,230 ± 0,010
Cd MAF1	-	0,391	0,582	0,485 ± 0,001

Dados de bioconcentração dos parentais e geração F1.

captação e toxicidade do metal. No entanto, para avaliação de bioconcentração, fatores como concentração e tempo de exposição são relevantes – neste caso, as concentrações utilizadas foram consideradas extremamente baixas, sendo alguns valores encontrados abaixo do limite de detecção dos aparelhos. Desse modo, para tal avaliação sugere-se que novas concentrações sejam testadas, assim como o tempo de exposição.

Contudo, pesquisas relacionadas à bioconcentração são frequentemente relatadas com peixes por possuírem maior massa corporal para realização do processo de digestão ácida. Mesmo assim, segundo Silva (2013) as concentrações de elementos metálicos em algumas metodologias podem ser oriundas de falhas na execução do preparo da amostra, por fatores distintos. Diante de tal observação, faz-se necessário destacar as dificuldades envolvidas em trabalhos dessa natureza com organismos tão pequenos, pela complexidade do manuseio dos organismos e pela limitação analítica existente em relação à pouca massa disponível.

Apesar de os níveis de concentração de metais estarem bem abaixo dos limites quantificáveis pela espécie, outro aspecto importante sobre metais utilizados seria saber se as concentrações propostas não foram depreciadas, sendo necessário quantificar os níveis de MTs no organismo, pois são induzidas pela presença de tais espécies químicas estudadas (KALAY & ERDEM, 2003).

Diante dos resultados do presente estudo, nota-se que tanto Zn quanto Cd causam toxicidade crônica para a espécie *C. dubia*. Além disso, mesmo que no tecido biológico não tenha constado bioconcentração dos metais, estes podem comprometer os microinvertebrados aquáticos e seus descendentes.

## CONCLUSÕES

Nas concentrações testadas de Zn e Cd não houve inibição no crescimento de *R. subcapitata*. Portanto as concentrações não causaram toxicidade. No entanto, para a espécie *C. dubia*, em ambas as concentrações

testadas de Zn e Cd, houve indicação de toxicidade crônica na geração parental, considerando-se o número de neonatos por indivíduo. Sendo assim, a toxicidade foi evidenciada na geração F1 de *C. dubia*, em condição livre de contaminantes, proveniente de fêmeas expostas, indicando efeitos tóxicos das concentrações testadas para ambos os metais, nas gerações subsequentes.

Os organismos da geração F1, após oito dias de exposição em água e alimentos sem contaminantes, não demonstraram capacidade de recuperação biológica. As análises químicas demonstraram que não houve bioconcentração dos elementos metálicos Zn e Cd em *C. dubia* para as concentrações testadas.

Os efeitos de metais nos organismos aquáticos são evidentes em todos os níveis. No entanto, utilizar concentrações próximas da encontrada no ecossistema aquático torna a pesquisa mais realista, considerando que os organismos estão inseridos dentro dessas concentrações constantemente. Por isso, devem ser realizadas outras análises com esse perfil, expondo mais de uma geração. A existência de recuperação de organismos expostos a metais é pouco conhecida pela literatura, sendo este um dos primeiros trabalhos entre gerações, no qual a geração seguinte é mantida em condição diferente, livre de contaminantes. Portanto, sugere-se que novos ensaios sejam feitos para embasar melhor a discussão desses dados e ampliar o conhecimento sobre as possibilidades de recuperação biológica.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP); Laboratório Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia da UNESP – Sorocaba (SP); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processo nº 2012/14583-5) e a todos os colaboradores deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2011) NBR 12.648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.target.com.br/produtos/normas-tecnicas/39365/nbr12648-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-cronica-metodo-de-ensaio-com-algas-chlorophyceae>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. (2007) *Bioestat 5.0*: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: IDSM.
- BAIRD, C. (2002) *Química ambiental*. 2 ed. Porto Alegre: Bookman. 622 p.
- BARATA, C.; MARKICH, S.J.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M. (2002) The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, v. 61, n. 3-4, p. 143-154.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. (2007) Desreguladores endócrinos no ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 651-666.
- BRITTO, N.R.B. (2011) Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Engenharia Ambiental) – Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Portugal.
- CAMPBELL, C.; BORGLIN, E.; STRINGFELLOW, W.T.; GREEN, B.; GRAYSON, A. *Review of Bioassays for monitoring Fate and Transport of Estrogenic Endocrine Disrupting Compounds in Water*. Lawrence Berkeley National Laboratory, 2004. Disponível em: <http://escholarship.org/uc/item/8jq8047f>. Acesso em: 22 set. 2014.
- CASTRO, C. R. (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830.

- CHEN, C.Y. & FOLT, C.L. (2000) Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. *Environmental Science & Technology*, v. 34, n. 18, p. 3878-3884.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CESTESB. (2012) *Relatório de qualidade das águas superficiais do Estado de SP*. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água edrediz ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União.
- DAMSTRA, T. (2002) Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, v. 40, n. 4, p. 457-465. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216998>. Acesso em: 17 out. 2014.
- DE SCHAMPHELAERE, K.A.; FORREZ, I.; DIERCKENS, K.; SORGELOOS, P.; JANSSEN, C.R. (2004) Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, v. 81, n. 4, p. 409-418.
- ENVIRONMENTAL AGENCY PROTECTION - EPA. Test Method 29: Determination of Metals Emissions from Stationary Sources - Test Methods in water. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-06/documents/m-29.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2016.
- EVENS, R.; SCHAMPHELAERE, K.A.; JANSSEN, C.R. (2009) The effects of dietary nickel exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, v. 94, n. 2, p. 138-144.
- GUAN, R. & WANG, W.X. (2004) Dietary assimilation and elimination of Cd, Se and Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 23, n. 11, p. 2689-2698.
- HOOKE, S.E. & FISHER, N.S. (2001) Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. *Marine Biology*, v. 138, n. 6, p. 1131-1140.
- ICHME - International Conference on the heavy metals in the environment. Heavy metals in the environment - proceedings. Third International Conference on the Heavy Metals in the Environment, Amsterdam, 1981.
- KALAY, M. & ERDEM, C. (2003) Effect of cadmium accumulation on total protein levels in *Tilapia nilotica*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 27, n. 6, p. 1367-1374.
- MANGAS-RAMÍREZ, E.; SARMA, S.; NANDINI, S. (2004) Recovery patterns of *Moina macrocopa* exposed previously to different concentrations of cadmium and methyl parathion: life-table demography and population growth studies. *Hydrobiologia*, v. 526, n. 1, p. 255-265.
- MEYER, J.S.; ADAMS, W.J.; BRIX, K.V.; LUOMA, S.N.; MOUNT, D.R.; STUBBLEFIELD, W.A.; WOOD, C.M. (2005) Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. In: *Pelston Workshop on Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms, 27... Proceedings...* British Columbia: ACG. p. 303.
- MISHRA, V.K.; UPADHYAY, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. (2008) Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 141, n. 1-3, p. 49-58.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application*. Washington, USA: Hemisphere Publishing. 666 p.
- RODGHER, S. & ESPÍNDOLA, E.L.G. (2008) The influence of algal densities on the toxicity of chromium for *Ceriodaphnia dubia* Richard (Cladocera, Crustacea). *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 2, p. 341-348.
- RODGHER, S. & ESPÍNDOLA, E.L.G. (2008) Effects of interaction between algal densities and cadmium concentration on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, n. 3, p. 765-773.
- RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; SIMÕES, F.C.F.; TONIETTO, A.E. (2012) Cadmium and chromium toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 1, p. 161-169.
- SILVA, M.A. (2013) *Ensaio de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu e (Cd + Cu) em Tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Engenharia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- SOARES, W.A.A. (2011) *Estudo da Distribuição de Metais em Água, Sedimento e Organismos Aquáticos e Rios E Reservatórios Pertencentes à Rede De Monitoramento da Qualidade Dos Sedimentos do Estado SP, Brasil*. Disponível em: [http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Walace%20Anderson%20Almeida%20Soares\\_M.pdf](http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Walace%20Anderson%20Almeida%20Soares_M.pdf). Acesso em: 06 nov. 2015.
- SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. (2007) *Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais*. Caderno Temático. Campinas: IQ-UNICAMP. Vol. 6.
- SOFYAN, A.; PRICE, D.J.; BIRGE, W.J. (2007) Effects of aqueous, dietary and combined exposure of cadmium to *Ceriodaphnia dubia*. *Science of the Total Environment*, v. 385, n. 1-3, p.108-116.
- TAYLOR, G.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M. (1998) Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 17, n. 3, p. 412-419.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. (2000) *National recommended water quality criteria*. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/9100H5VG.PDF?Dockey=9100H5VG.PDF>. Acesso em: 19 fev. 2014.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA (2002). *Método 10020: Daphnid, Ceriodaphnia dubia, Survival and Reproduction Test; Chronic Toxicity*. Disponível em: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method\\_1002\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1002_2002.pdf). Acesso em: 10 mai. 2016.
- ZAGATTO, P. (2006) Validação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, Pedro A.; Bertoletti, Eduardo (Eds) *Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações*. 2 ed. Sao Carlos: Rima. p.251-267.