

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por
uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros
(*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*)

JAQUELINE PÉROLA DE SOUZA

SÃO CARLOS - SP

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por
uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros
(*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*)

JAQUELINE PÉROLA DE SOUZA
ORIENTADORA: PROFESSORA DR^a. MARIA DA GRAÇA GAMA MELÃO
CO-ORIENTADORA: PROFESSORA DR^a. ANA TERESA LOMBARDI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS - SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S729tc

Souza, Jaqueline Pérola de.

Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros (*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*) / Jaqueline Pérola de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

122 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Ecossistema. 2. Ecotoxicologia. 3. Cadeias alimentares (Ecologia). 4. Cádmio. 5. Produção secundária (Biologia). 6. Zooplâncton. I. Título.

CDD: 574.5247 (20^a)

Jaqueline Pérola de Souza

Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros (*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*)

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 27 de abril de 2012

BANCA EXAMINADORA

Presidente Mauiã da Graça G. Melão
Prof. Dra. Maria da Graça Gama Melão
(Orientadora)

1º Examinador Odete Rocha
Prof. Dra. Odete Rocha
PPGERN/UFSCar

2º Examinador Marisa Narciso Fernandes
Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes
PPGERN/UFSCar

3º Examinador Lúcia Helena de Aguiar Vieira
Prof. Dra. Lúcia Helena de Aguiar Vieira
UNICEP/São Carlos-SP

4º Examinador Renata Fracácio
Prof. Dra. Renata Fracácio
UNESP/Sorocaba-SP

Dedico à minha querida mãe Imaculada, em memória, por todo incentivo, apoio e valores passados com tanto amor e carinho ao longo dos poucos anos que convivemos juntas. A ela eu devo tudo o que aprendi e tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Pelo incentivo financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp, Processo número: 2008/05464-7.

À Professora e Orientadora Maria da Graça, e em especial à Professora e Co-orientadora Ana Teresa, por terem cedido o laboratório, pela ajuda no desenvolvimento do projeto, no esclarecimento de muitas dúvidas, por todos os ensinamentos e contribuições para meu crescimento profissional e pessoal.

À banca avaliadora, Professoras Odete Rocha, Marisa Narciso Fernandes, Renata Fracácio e Lúcia Helena de Aguiar Vieira, por todas as sugestões e correções que certamente contribuíram de maneira significativa para o enriquecimento do meu trabalho.

Agradeço em especial ao meu pai Milton, à minha irmã Joceline, ao meu irmão Davi e a todos os meus familiares por todo apoio, motivação, carinho e compreensão principalmente nos momentos difíceis e de saudade por estar tanto tempo longe das pessoas que amo.

Às amigas companheiras de república Vivi, Érika, Ediane, Aike e Lili pela convivência, paciência e amizade verdadeira durante os anos que passei em São Carlos.

Aos grandes amigos Dani, Bruna, Rê, Priscilinha, Aruana, Francine, Iha, Natália, Renata, Lidiane, Eliane, Diogo e Japa; em especial ao Péricles (Naim) e sua família por toda força e incentivo durante o doutorado principalmente nos dias difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Plâncton, Mathias, Giseli, Imyra, Ricardo, Rodrigo, Yeda, Azize, Lais, Maria Amália, Amália (da Química), Patrícia e Suzelei, pela ajuda, contribuição, discussão e convivência amigável durante os experimentos, seminários e reuniões intermináveis do Lab.

Aos funcionários, os motoristas Luiz e Alcídio, que ajudaram durante a realização das coletas, e à Dona Madalena por toda boa vontade e ajuda sempre de forma carinhosa.

E a todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização dessa etapa fundamental em minha vida. Agradeço a todos que souberam me incentivar com palavras amigas, conselhos, sugestões, críticas e broncas. Certamente tudo o que passei durante esses anos me servirão para sempre como experiência e ajudarão no meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigada a todos!

Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros (*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*)

RESUMO

Os efeitos da contaminação dos ambientes aquáticos por metais são preocupantes do ponto de vista ecotoxicológico. Nesses ambientes os organismos são expostos aos metais na forma dissolvida e também através da ingestão de alimentos contaminados via cadeia trófica. Os organismos fitoplanctônicos estão na base das cadeias alimentares dos ambientes aquáticos e são responsáveis pela produtividade primária. O zooplâncton constitui um elo entre produtores primários e níveis tróficos superiores, como os peixes. A exposição desses organismos aos metais pode ocasionar mudanças na fisiologia, afetar as taxas de produtividade, e, conseqüentemente o equilíbrio e dinâmica das populações e comunidades aquáticas. Este estudo avaliou os efeitos do metal cádmio (Cd) sobre uma cadeia alimentar experimental constituída por uma microalga clorofícea *Scenedesmus quadricauda*, um cladóceros dafinídeo *Simocephalus serrulatus* e o peixe *Hyphessobrycon eques*. Cultivos de *S. quadricauda* em fase exponencial de crescimento foram expostos a $1,6 \times 10^{-9}$; $3,2 \times 10^{-8}$; $6,7 \times 10^{-8}$; $1,6 \times 10^{-7}$ e $1,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de Cd total dissolvido durante 96 h. A concentração de clorofila “a”, taxa de crescimento populacional, morfologia dos cenóbios e biomassa seca foram avaliadas durante a exposição. Depois de contaminadas as algas foram fornecidas como alimento aos cladóceros *S. serrulatus* durante todo seu ciclo de vida em concentrações entre $3,8 \times 10^{-14}$ a $5,9 \times 10^{-12}$ g Cd célula⁻¹. Durante a exposição o tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade da primeira reprodução, intervalo na produção de ovos, tempo de geração, longevidade, taxas de fertilidade, taxas de alimentação, produtividade secundária e recuperação foram avaliados. Em seguida os cladóceros alimentados com algas contaminadas foram utilizados como alimento para o peixe *H. eques* por um período de sete dias. A estrutura histológica das brânquias e fígado e peso fresco dos animais foram avaliados ao final dessa exposição. Em *S. quadricauda*, houve diminuição no conteúdo de clorofila “a” e no crescimento populacional nas maiores concentrações do metal. Nos cladóceros ocorreu aumento do tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade da primípara e tempo de geração; houve diminuição da longevidade, das taxas de fertilidade, taxas de alimentação e

produtividade secundária. A produção secundária foi recuperada após a retirada do alimento contaminado. Os padrões histológicos das brânquias e fígado dos peixes, assim como o peso fresco não foram afetados pela exposição ao Cd via cadeia alimentar considerando o período de exposição e a amplitude de concentração de Cd avaliada. Os resultados obtidos indicam que o alimento pode ser considerado um veículo importante na transferência do Cd do fitoplâncton para o zooplâncton nas cadeias tróficas aquáticas. O Cd tem elevado potencial de toxicidade impactando os produtores e consumidores primários. No entanto, não foi detectado efeitos do Cd no terceiro nível trófico. Esses estudos são importantes para o entendimento do comportamento do metal Cd nos ambientes aquáticos, bem como seu potencial de toxicidade sobre os organismos encontrados nesses ambientes. O entendimento desses aspectos contribui para adequação de estratégias de preservação dos ecossistemas aquáticos em situações de contaminação por Cd.

Palavras-chave: cadeia alimentar; fitoplâncton; metal; peixe; produção secundária; zooplâncton.

Cadmium toxicity in an aquatic food chain formed by a microalga (*Scenedesmus quadricauda*), a cladoceran (*Simocephalus serrulatus*) and a fish (*Hyphessobrycon eques*)

ABSTRACT

The effects of trace metals contamination in aquatic environments are of concern in the ecotoxicological point of view. In these environments the organisms are exposed to metals in the dissolved form and also through ingestion of contaminated food in the food chain. The phytoplanktonic organisms are the basis of food chains and are responsible for primary productivity. Zooplankton is a link between primary producers and higher trophic levels, such as fish. The exposure of these organisms to metals will cause changes in the physiology, affect productivity rates, and the balance and dynamics of aquatic communities. This study evaluated the effects of the metal cadmium (Cd) on an experimental freshwater food chain involving the algae *Scenedesmus quadricauda*, a cladoceran daphnidae, *Simocephalus serrulatus*, and the fish *Hyphessobrycon eques*. Cultures of *S. quadricauda* in exponential phase growth were exposed to 1.6×10^{-9} ; 3.2×10^{-8} ; 6.7×10^{-8} ; 1.6×10^{-7} and 1.3×10^{-6} mol L⁻¹ of total dissolved Cd for 96 h. During exposure chlorophyll "a", population growth, coenobia size, and dry biomass were evaluated. Then the contaminated algae were given as food to the zooplankton *S. serrulatus* during the complete life cycle of the organisms in the concentration range of 3.8×10^{-14} to 5.9×10^{-12} g Cd cell⁻¹. During the exposure the embryonic development time, age at first reproduction, time for egg production, generation time, longevity, fertility rates, feeding rates, secondary production, and recovery of the animals were evaluated. Then the cladocerans reared with Cd contaminated algae were used as food for the fish *H. eques* during a period of seven days. At the end of this exposure, we evaluated the histological structure of gills and liver, and the fresh weight of the animals. In *S. quadricauda*, there were damages on the chlorophyll content, and in the population growth at high concentrations of the metal. In the cladocerans were detected increase of the embryonic development time, age at first reproduction, and generation time, whereas a decrease of the longevity, fertility rates, feeding rates, and secondary production. The rate of secondary production showed recovery after removal the contaminated food. The histological patterns of gills and liver, as well as the fresh weight of the fish were not affected by the Cd exposure tested through the food chain

considering the exposure period and concentrations tested. The results indicated that food can be considered an important vehicle in the Cd transfer from phytoplankton to zooplankton in aquatic food webs. Cd has a high potential for toxicity, impacting the producers and primary consumers. However, no Cd effects to the fish, the third trophic level, were detected. These studies are of great importance for understanding Cd behavior in aquatic environments, as well as its toxicity to the organisms. The understanding of these aspects contributes to adaptation strategies for the conservation of aquatic ecosystems in situations of contamination.

Keywords: fish; food chain; metal; phytoplankton; secondary production; zooplankton.

LISTA DE FIGURAS

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Organismos-teste utilizados nas avaliações ecotoxicológicas do presente estudo. *Scenedesmus quadricauda*, fonte: www.protist.i.hosei.ac.jp (A). *Simocephalus serrulatus*, fonte: www.cfb.unh.edu (B). *Hyphessobrycon eques*, fonte: www.plantedtank.net (C).....5

CAPÍTULO 1. Toxicidade e bioacumulação de cádmio em *Scenedesmus quadricauda*.

Figura 1. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como concentração de clorofila “a” (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total dissolvido (A) e porcentagem de inibição da clorofila “a” (B) em relação ao controle, após 96 h de exposição. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle. LD = $1,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.....38

Figura 2. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como número de células por mililitro (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total dissolvido (A) e porcentagem de inibição do crescimento populacional (B) em relação ao controle após 96 h de exposição. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle. LD = $1,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.....39

Figura 3. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como tamanho do cenóbio (média ± desvio padrão) em relação ao número de célula por cenóbio após 96 h de exposição.....40

Figura 4. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como biomassa seca (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total dissolvido após 96 h de exposição.....41

CAPÍTULO 2. Efeitos da transferência trófica de cádmio e recuperação no cladóceros *Simocephalus serrulatus*.

Figura 1. Carta controle da sensibilidade de *Simocephalus serrulatus* ao NaCl.....53

Figura 2. Curva Comprimento x Peso Seco para as diferentes fases de crescimento do cladóceros (A). Regressão linear e coeficiente de correlação obtidos após a plotagem dos valores de comprimento (mm) e peso seco (mg) dos animais experimentais (B).....58

Figura 3. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como tempo de duração do desenvolvimento embrionário (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....63

- Figura 4.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como idade para primípara (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....63
- Figura 5.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como tempo de geração (ovo a ovo) (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....64
- Figura 6.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como longevidade (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....64
- Figura 7.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como comprimento máximo do corpo (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....65
- Figura 8.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como taxa de filtração (A) e taxa de ingestão (B) (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....67
- Figura 9.** Toxicidade do Cd em *Simocephalus serrulatus* reportada como produção secundária diária investida em crescimento (Pc) (A) e produção secundária total investida em crescimento e reprodução (B) (média ± desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.....68
- Figura 10.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como produção total acumulada em relação ao tempo de exposição em dias.....69
- Figura 11.** Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como taxa de filtração (A) e taxa de ingestão (B) (média ± desvio padrão) nas diferentes concentrações, durante 24 h de exposição ao Cd via alimento, e 24 h ao alimento livre de Cd.....70
- Figura 12.** Produção secundária investida em crescimento em *S. serrulatus* antes e depois da retirada do contaminante. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle do mesmo grupo.....72
- Figura 13.** Produção secundária total investida em crescimento e reprodução (média ± desvio padrão) em *S. serrulatus* antes e depois da retirada do contaminante. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle do mesmo grupo. ** Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao mesmo tratamento do grupo anterior à recuperação.....73

Figura 14. Concentrações de Cd total particulado acumuladas nos cladóceros durante o ciclo de vida em função da exposição ao alimento contaminado.....74

CAPÍTULO 3. Análise histológica de brânquias e fígado de *Hyphessobrycon eques* exposto ao cádmio via cadeia alimentar.

Figura 1. Fotomicrografia das brânquias de *Hyphessobrycon eques*. Controle (A). Visão panorâmica do filamento branquial (F), lamelas (L) e seio venoso central (SVC). Controle (B). Células cloreto. Histopatologias encontradas em brânquias dos peixes expostos ao cádmio via alimento na concentração $1,26 \times 10^{-6}$ g Cd dia⁻¹ (B, C e D). Hipertrofia do epitélio lamelar (C e D). Células cloreto (E). Células mucosas (F). Escala: 20µm. Coloração: Azul de toluidina.....97

Figura 2. Fotomicrografia de fígado de *Hyphessobrycon eques*. Controle (A); a seta indica vacuolização citoplasmática. Histopatologias encontradas no fígado dos peixes expostos ao cádmio via alimento na concentração $1,26 \times 10^{-6}$ g Cd dia⁻¹ (B, C e D). Hipertrofia celular (B). Seta preta: vacuolização citoplasmática; Seta vermelha: degeneração nuclear (C). Deformação da parede nuclear (D). Escala: 20µm. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica.....99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. Toxicidade e bioacumulação de cádmio em *Scenedesmus quadricauda*.

Tabela 1. Concentrações (médias \pm desvio padrão) de Cd total dissolvido (inicial) e Cd total particulado (final) em *S. quadricauda* após 96 h exposição.....36

Tabela 2. Concentração de clorofila “a” (média \pm desvio padrão) durante as 96 h de exposição ao Cd.....37

CAPÍTULO 2. Efeitos da transferência trófica de cádmio e recuperação no cladócero *Simocephalus serrulatus*.

Tabela 1. Número médio de ovos, ninhadas e ovos/ninhada produzidos por *S. serrulatus* exposto ao cádmio via alimento.....65

Tabela 2. Número médio de ovos, ninhadas e ovos/ninhada produzidos por *S. serrulatus* exposto ao cádmio via alimento antes e depois da retirada do contaminante.....71

Tabela 3. Concentrações de Cd total particulado acumuladas nos cladóceros durante o ciclo de vida devido à exposição ao alimento contaminado.....74

CAPÍTULO 3. Análise histológica de brânquias e fígado de *Hyphessobrycon eques* exposto ao cádmio via cadeia alimentar.

Tabela 1. Concentrações de Cd acumuladas nos organismos experimentais e utilizadas como alimento para o peixe *Hyphessobrycon eques*.....93

Tabela 2. Alterações histopatológicas em fígado e brânquia e respectivos estágios baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões.....95

Tabela 3. Frequências de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Hyphessobrycon eques* submetidas ao cádmio via alimento.....98

Tabela 4. Frequências de alterações histopatológicas encontradas nos fígados de *Hyphessobrycon eques* expostos ao cádmio.....100

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Organismos-teste.....	3
1.2. Teste ecotoxicológicos	6
1.3. Metais nos ambientes aquáticos.....	7
1.3.1 Cádmio.....	9
1.4. Fitoplâncton.....	11
1.5. Zooplâncton.....	14
1.6. Peixe.....	19
1.7. Recuperação.....	22
2. OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 1. Toxicidade e bioacumulação de cádmio em <i>Scenedesmus quadricauda</i>.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1. Cultivos da alga <i>Scenedesmus quadricauda</i>	30
2.2. Exposição ao cádmio	31
2.3. Análise do metal.....	32
2.4. Concentração de clorofila “a”	33
2.5. Crescimento populacional e número de células por cenóbio	33
2.6. Biomassa seca	34
2.7. Análise estatística.....	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Análise do metal.....	35
3.2. Concentração de clorofila “a”	36
3.3. Crescimento populacional e número de células por cenóbio	37
3.4. Biomassa seca	40
4. DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

CAPÍTULO 2. Efeitos da transferência trófica de cádmio e recuperação no cladócero

<i>Simocephalus serrulatus</i>	48
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1. Cultivos de <i>Simocephalus serrulatus</i> e <i>Scenedesmus quadricauda</i>	51
2.2. Controle da sensibilidade para <i>Simocephalus serrulatus</i>	53
2.3. Exposição da alga ao cádmio.....	53
2.4. Exposição do cladócero ao cádmio.....	54
2.4.1. Ciclo de vida.....	54
2.4.2. Taxa de alimentação (Filtração e Ingestão).....	55
2.4.3. Produção secundária.....	56
2.4.4. Experimentos de recuperação.....	59
2.5. Análise do metal.....	60
2.6. Análise estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	62
3.1. Ciclo de vida.....	62
3.2. Taxa de alimentação (Filtração e Ingestão).....	66
3.3. Produção secundária.....	66
3.4. Experimentos de recuperação.....	69
3.5. Análise do metal.....	73
4. DISCUSSÃO.....	75
4.1. Ciclo de vida.....	75
4.2. Taxa de alimentação (Filtração e Ingestão).....	76
4.3. Produção Secundária.....	77
4.4. Experimentos de recuperação.....	78
4.5. Análise do metal.....	79
5. CONCLUSÕES.....	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

CAPÍTULO 3. Análise histológica de brânquias e fígado de *Hyphessobrycon eques* exposto ao cádmio via cadeia alimentar.....

1. INTRODUÇÃO.....	89
--------------------	----

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	91
2.1. Peixe <i>Hyphessobrycon eques</i>	91
2.2. Exposição do peixe ao cádmio.....	91
2.3. Avaliação histológica.....	93
2.4. Análise estatística.....	95
3. RESULTADOS.....	96
4. DISCUSSÃO.....	101
5. CONCLUSÕES.....	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

APRESENTAÇÃO

Este estudo está inserido na área de ecotoxicologia aquática e enfoca a exposição de organismos de uma cadeia alimentar experimental ao metal cádmio (Cd). Na pesquisa, procurou-se avaliar os possíveis efeitos tóxicos do metal sobre a alga clorofícea, *Scenedesmus quadricauda*, o cladóceros dafinídeo, *Simocephalus serrulatus* e o peixe da família Characidae, *Hyphessobrycon eques*, conhecido como *mato-grosso*. O trabalho aborda também aspectos da transferência trófica do cádmio na cadeia alimentar com três níveis tróficos, bem como efeitos da exposição através do alimento contaminado.

O aumento da concentração dos poluentes nos ambientes aquáticos é motivo de interesse nos estudos de ecotoxicologia devido à necessidade do entendimento do destino, efeitos e dinâmica dos diversos contaminantes nas cadeias alimentares. Os ecossistemas aquáticos são alvo de uma diversidade de elementos e compostos que, dependendo da concentração e do tempo de exposição, podem causar prejuízos aos organismos e às suas interações nesses ambientes.

Entre os diversos compostos encontrados nos corpos d'água, os metais requerem significativa preocupação, pois além de se acumularem nos tecidos dos organismos vivos, eles podem ser transferidos nas cadeias alimentares e eventualmente atingir os seres humanos. Grande parte dos estudos encontrados na literatura relata os efeitos da toxicidade por metais através da exposição na água. A transferência trófica do fitoplâncton para o zooplâncton, ou seja, através do alimento, assim como a capacidade de biomagnificação desses elementos, são estudos recentes e cada vez mais importantes na área de ecotoxicologia. Nesse sentido, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na transferência trófica dos metais é de grande importância para o entendimento do equilíbrio, dinâmica e preservação da vida nos ecossistemas aquáticos.

As determinações dos efeitos de metais sobre as algas permitem compreender como esses organismos se comportam diante da exposição, se ocorre ou não acumulação nos tecidos e ainda prever quais os possíveis danos para suas populações e, conseqüentemente, a organismos de níveis tróficos superiores. A diminuição da qualidade do alimento tem influencia direta sobre a história de vida de consumidores primários e pode resultar em mudanças no desenvolvimento da população, tais como crescimento, reprodução e sobrevivência, os quais são parâmetros dependentes da entrada de energia proveniente da alimentação. Dessa forma, a presença de metal através da dieta, mesmo em baixas concentrações, pode afetar aspectos importantes do ciclo de vida em organismos

zooplancônicos e ainda eventualmente acumular-se na cadeia alimentar e alcançar níveis tróficos superiores.

Os possíveis efeitos tóxicos causados pela transferência de metais nos ecossistemas aquáticos são ecologicamente relevantes. As algas estão na base das cadeias alimentares, e os organismos zooplancônicos constituem um elo entre produtores primários e níveis tróficos superiores. Esses organismos estão sujeitos a diferentes níveis de estresse durante seu ciclo de vida. Caso esses estressores estejam presentes em baixas concentrações e por um período longo de tempo, eles poderão alterar a fisiologia dos organismos, influenciar as taxas de produtividade e a estrutura das populações e comunidades.

Estudos recentes na área de ecotoxicologia procuram explorar o potencial do alimento como importante veículo de agentes tóxicos e causador de impacto nas cadeias alimentares. Além disso, a biomagnificação de elementos como o cádmio entre organismos aquáticos ainda é vista com cuidado pelos ecotoxicologistas. Por isso, a preservação do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos depende do melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na transferência trófica desse e de outros elementos, assim como uma visão detalhada dos principais efeitos observados sobre os organismos envolvidos.

Para melhor organização, esta tese foi dividida em três capítulos seguida das Considerações Finais:

Capítulo 1: Toxicidade e bioacumulação de cádmio em *Scenedesmus quadricauda*.

Capítulo 2: Efeitos da transferência trófica de cádmio e recuperação no cladócero *Simocephalus serrulatus*.

Capítulo 3: Análise histológica de brânquias e fígado de *Hyphessobrycon eques* exposto ao cádmio via cadeia alimentar.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Organismos-teste

Nos estudos de ecotoxicologia, a escolha dos organismos-teste é essencial para uma boa caracterização dos efeitos, assim como para a confiabilidade e comparação entre os resultados obtidos para diferentes grupos de organismos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). As espécies utilizadas nas avaliações devem apresentar sensibilidade ao contaminante, elevada disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade em um nível trófico, importância ambiental, ampla distribuição, facilidade de cultivo e adaptação às condições de laboratório (COSTA et al., 2008).

A utilização de espécies nativas nas avaliações ecotoxicológicas também é recomendada, uma vez que os organismos fornecem informações ecológicas relevantes e compatíveis com as condições ambientais locais, refletindo as características dos principais grupos de organismos encontrados (RODGHER et al., 2008; FREITAS e ROCHA, 2011).

Clorofíceas do gênero *Scenedesmus* são de ocorrência cosmopolita e podem ser encontradas em ambientes oligo-, meso- ou eutróficos. A espécie *Scenedesmus quadricauda* (Figura 1A) (Chlorococcales) forma pequenas colônias chamadas de cenóbios, cuja característica peculiar é apresentar número de células geneticamente definido. No entanto, dependendo da condição fisiológica da alga, esse número de células por cenóbio pode variar, sendo encontrados cenóbios de *S. quadricauda* com duas, quatro, oito, dezesseis ou mesmo trinta e duas células. Formas unicelulares também são encontradas (GAVIS et al., 1979). Esta característica é chamada de “*plasticidade fenotípica*”, ou seja, a capacidade de um genótipo produzir dois ou mais fenótipos em resposta à mudanças ambientais, tais como variações na disponibilidade de nutrientes, presença de poluentes derivados de esgoto, estresse por petróleo, temperatura, forrageamento, ou ainda pelo estresse por metal, como sugerido em algumas investigações no campo e no laboratório (PEÑA-CASTRO et al., 2004; LOMBARDI et al., 2007).

O gênero supracitado é indicado para estudos de ecotoxicologia (AWASTHI e RAÍ, 2005; ZBIGNIEW e WOJCIECH 2006; GORBI et al., 2007; LOMBARDI et al., 2007; PERALES-VELA et al., 2007) por apresentar sensibilidade a elementos e compostos potencialmente tóxicos e, facilidade de adaptação e de manutenção dos cultivos em laboratório (ABNT, 2005a; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). As células de *Scenedesmus quadricauda* possuem tamanho entre 4 e 50 µm. As culturas manifestam maior crescimento

quando mantidas em temperatura entre 22 a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro (ABNT, 2005a).

As respostas ecotoxicológicas geralmente avaliadas correspondem ao conteúdo de clorofila “a” (YU et al., 2007), taxa de crescimento populacional (BAUMANN et al., 2009), biomassa seca (PERALES-VELA et al., 2007), tamanho dos cenóbios (PEÑA-CASTRO et al., 2004; LOMBARDI et al., 2007), efeitos sobre os fotossistemas (ZHOU et al., 2006), conteúdo de proteínas (HUANG et al., 2009) e alterações na atividade enzimática (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006). A espécie *S. quadricauda* foi escolhida como organismo-teste para este estudo por ser amplamente encontrada em diversos corpos d’água do Brasil.

O cladóceros dafinídeo *Simocephalus serrulatus* (KOCH, 1841), utilizado nesta pesquisa, é encontrado nas regiões sul e sudeste do Brasil (BARBOSA e MATSUMURA-TUNDISI, 1984). É uma espécie nativa de fácil manejo em laboratório, ciclo de vida curto, taxa de reprodução elevada e considerável sensibilidade a elementos tóxicos. Espécies do gênero *Simocephalus* que ocorrem em clima tropical já foram utilizadas em outros estudos de ecotoxicologia (HOOK e FISHER, 2000; BOSSUYTE e JANSEN, 2005; MUYSSSEN et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2005; MARTINEZ-JERÓNIMO et al., 2008). Além disso, os dafinídeos são comumente usados em avaliações ecotoxicológicas (ABNT, 2005b).

O comprimento de *S. serrulatus* varia entre 1,8 e 2,3 mm (BARBOSA e MATSUMURA-TUNDISI, 1984), são encontrados em águas com elevada concentração de matéria orgânica e costumam se alimentar de algas clorofíceas. Em laboratório, são de fácil adaptação às condições de cultivo, preferem pouca renovação da cultura e altas quantidades de alimento. A temperatura favorável ao cultivo varia entre 22 e 25 °C (observação pessoal). Durante as avaliações crônicas realizadas com os cladóceros, alguns parâmetros do ciclo de vida dos organismos podem ser avaliados. Entre esses parâmetros, o tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade para a primeira reprodução, tempo de geração, sobrevivência e taxas de fertilidade são frequentemente observados (KNOPS et al., 2001; De SCHAMPHELAERE et al., 2007; GOULET et al., 2007; SOFYAN et al., 2007; RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008). A produtividade secundária dos organismos também pode ser medida (GUSSO-CHOUERI et al., 2011). A produção secundária de uma espécie em um dado período de tempo pode ser definida como a soma total dos incrementos investidos em crescimento de todos os indivíduos existentes no início do período investigado e mantido até o final. O incremento investido em crescimento é definido como a quantidade de energia ou substâncias orgânicas incluídas na espécie em questão (WINBERG, 1971). Para este estudo, foi escolhida uma espécie nativa, *Simocephalus serrulatus* (Figura 1B), a fim de que as

repostas obtidas possam ser aplicadas para outras espécies zooplancônicas que ocorrem no Brasil.

O gênero de peixe *Hyphessobrycon* possui aproximadamente 65 espécies e faz parte dos chamados “*tetras americanos*”. São amplamente utilizados no comércio de peixes ornamentais, destacando-se pela diversidade de formas, cores brilhantes, comportamento pacífico e pelo seu tamanho, geralmente pequeno (BERRA, 2001).

A espécie *Hyphessobrycon eques* (Figura 1C) conhecida como “*mato-grosso*”, é gregária; os indivíduos vivem em grandes cardumes e nunca isolados. Esse peixe ocorre desde a bacia do Amazonas até o Paraná e na região do pantanal mato-grossense. São encontrados frequentemente em águas estagnadas e alimentam-se de invertebrados bentônicos ou zooplancônicos e de plantas. Esta espécie costuma habitar a parte inferior da coluna d’água, vindo à superfície apenas para buscar alimento (MATHEUS, 2006). Seu modo reprodutivo é ovíparo (WEITZMAN e PALMER, 1997). Em ambientes com vegetação, sua coloração é avermelhada, variando entre o rosa-pálido e o vermelho escuro (MATHEUS, *op cit.*). Quando colocada junto com outras espécies, costuma ser territorialista (WEITZMAN e PALMER, 1997).

A faixa de temperatura adequada para a essa espécie de peixe varia entre 16 e 33 °C e o pH entre 4,5 e 8,0, podendo ser bem resistentes a tais variáveis.. A espécie foi escolhida para este estudo, uma vez que vem sendo utilizada em pesquisas recentes de ecotoxicologia (SOTERO-SANTOS et al., 2007; CRUZ et al., 2008; CARRASCHI et al., 2011;) e tem mostrado boas respostas em relação à sensibilidade aos agentes tóxicos e suscetibilidade à toxicidade.

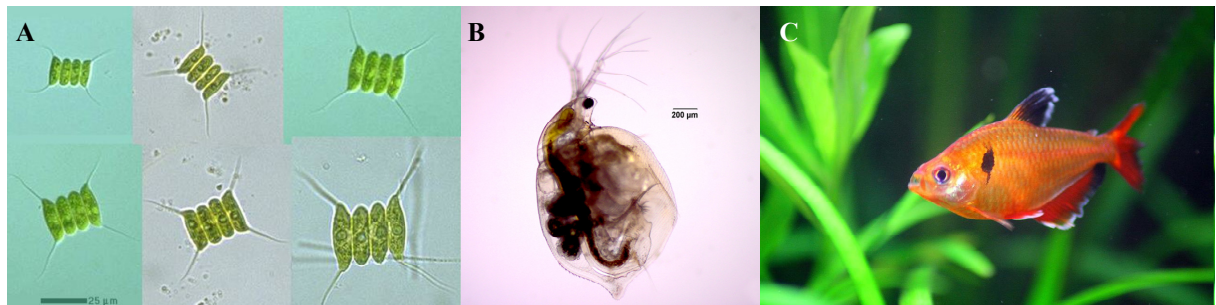


Figura 1. Organismos-teste utilizados nas avaliações ecotoxicológicas do presente estudo. *Scenedesmus quadricauda*, fonte: www.protist.i.hosei.ac.jp (A). *Simocephalus serrulatus*, fonte: www.cfb.unh.edu (B). *Hyphessobrycon eques*, fonte: www.plantedtank.net (C).

1.2. Testes ecotoxicológicos

A toxicologia tem como objeto fundamental estudar a intoxicação sob todos os aspectos. Por intoxicação entende-se a manifestação de efeitos adversos que revelam um estado patológico causado pela interação de um toxicante com um organismo. Os agentes tóxicos são, portanto, compostos ou elementos capazes de quebrar o equilíbrio orgânico e provocar alterações na homeostase do organismo (LARINI, 1993).

Desse modo, a toxicidade é uma propriedade potencial que compostos e elementos possuem, em maior ou menor grau, de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo. Esta maior ou menor gravidade de ação dependerá de fatores relacionados com a concentração, biodisponibilidade, espécie e meio ambiente (LARINI, 1993).

A preocupação com os ambientes aquáticos começou na década de 1930 a partir dos primeiros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos. O objetivo era estabelecer uma relação de causa e efeito de compostos e elementos em relação à qualidade da água. Na década de 1940 foi recomendado o uso de peixes para avaliar a toxicidade desses compostos e elementos. Porém, um pouco mais tarde, estudos revelaram que havia espécies de peixes resistentes a certos compostos químicos. Assim, surgiu a necessidade da utilização de espécies mais sensíveis e representativas do ecossistema aquático (RAND, 1995).

A escolha dos critérios e padrões que permitiriam as disposições desses agentes em níveis compatíveis à preservação dos recursos hídricos passou a ser o foco principal das pesquisas na área. Assim, houve grande desenvolvimento de sistemas para a condução dos testes de toxicidade, agudo e crônico, utilizando ovos e larvas de peixes na avaliação da toxicidade de compostos e elementos químicos (RAND, 1995).

Em seguida, iniciaram-se os ensaios de toxicidade de curta duração com as fases mais sensíveis de alguns organismos, a fim de aumentar a eficiência e minimizar os custos. Métodos utilizando microcrustáceos e peixes de águas continentais e marinhas foram normalizados e estão sendo usados mundialmente, fazendo parte das exigências legais dos órgãos ambientais em vários países (MACEK, 1980).

Os estudos ecotoxicológicos podem ser divididos em três etapas, cada qual com abordagens distintas. Primeiramente é importante o conhecimento das emissões e entradas de poluentes no ambiente, distribuição e destino nos diferentes compartimentos. Em segundo lugar, o conhecimento da entrada e destino nas cadeias biológicas e suas formas de transferência como alimento via cadeia trófica. E finalmente um estudo qualitativo e

quantitativo dos efeitos tóxicos dos poluentes ao ecossistema com conseqüências para o homem (THUHAUT, 1977).

De acordo com Zagatto e Bertolotti (2006) os ensaios de ecotoxicidade podem ser afetados por fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos estão relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos. Organismos jovens são mais sensíveis às substâncias tóxicas que os adultos. Por essa razão, recomenda-se o uso de organismos em estágios iniciais de vida. Além disso, todos os organismos utilizados em um determinado ensaio devem ter aproximadamente a mesma idade e devem ser provenientes de uma mesma cultura. Os fatores abióticos que podem interferir nos resultados são: pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e dureza da água, os quais devem ser monitorados durante a execução dos experimentos.

Durante avaliações de toxicidade crônica geralmente são considerados os efeitos sobre os parâmetros reprodutivos, comportamentais e ainda a sobrevivência diante da exposição a um agente tóxico. Esses critérios permitem diagnosticar os riscos para a população exposta e ainda propor estratégias de recuperação e preservação dos organismos ameaçados (RAND, 1995).

1.3. Metais nos ambientes aquáticos

A concentração de metais nos ambientes aquáticos naturais aumentou de forma significativa nos últimos anos (PESTANA et al., 2007; RODGHER et al., 2009). Atividades antrópicas como processos de drenagem da mineração, efluentes domésticos, industriais e agrícolas são os principais responsáveis pela entrada desses elementos nos ecossistemas aquáticos (ZHOU et al., 2006; COSTA et al., 2008). A entrada antropogênica de metais nos ambientes naturais excede significativamente as fontes naturais e pode apresentar importante impacto sobre os organismos que vivem na água (RODGHER et al., 2009).

A água, por sua vez, é um recurso natural indispensável à sociedade e ao ambiente; sua qualidade, que pode ser expressa por características de natureza física, química e biológica, possui grande importância nas pesquisas científicas (ROSINI et al., 2006; YU e FLEEGER, 2006; WANG et al., 2009). Dessa forma, existe um crescente interesse por estudos relacionados à concentração, transporte, acumulação e destino dos poluentes em corpos hídricos (PESTANA et al., 2007; SOFYAN et al 2007; RODGHER et al. 2009, RAINBOW e SMITH, 2010; XIE et al., 2010).

Devido à importância dos corpos hídricos, estudos têm sido direcionados para regulamentação e proteção desses ecossistemas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Geralmente, as concentrações dos metais nos ambientes aquáticos são definidas pela legislação a partir da concentração total no ambiente. No entanto, pesquisas científicas argumentam que informações sobre biodisponibilidade, interação com o sedimento, material particulado e dissolvido, e características físico-químicas, frequentemente são deixadas de lado, apesar da importância desses aspectos no entendimento do impacto ecotoxicológico e da dinâmica dos metais para a biota aquática (BUFFLE e TERCIER-WAEBER, 2005; COSTA et al., 2008). Em alguns países, os padrões de qualidade da água são baseados na concentração solúvel do metal e não na sua concentração total (U.S. EPA, 1996). No Brasil, de acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), a concentração solúvel é estabelecida apenas para os metais cobre e ferro na coluna d'água como base para o padrão de qualidade da água. Já para outros metais, tais como o arsênio, cádmio, chumbo e zinco, os padrões ainda são baseados na concentração total do elemento.

No ambiente aquático, quando na forma dissolvida, o metal pode ter uma variedade de formas químicas dependendo da natureza e características do ambiente. As interações dos metais na água incluem espécies associadas com material dissolvido, com partículas em suspensão, precipitação e acúmulo no sedimento, oxidações e reduções químicas, complexação com ligantes orgânicos e inorgânicos, absorção e/ou adsorção por microrganismos dentro da cadeia trófica (TWISS et al., 2001).

A utilização do sistema de modelagem de equilíbrio químico, o software MINEQL⁺, permite uma estimativa da especiação dos metais nos ambientes aquáticos e, particularmente em meio de cultura definido, onde consegue-se melhor representação da realidade química. Esse modelo leva em consideração os componentes químicos do meio de cultivo, pH, temperatura e força iônica. Através dessa ferramenta foi possível calcular a quantidade de íons metálicos na forma livre no meio de cultivo e que, portanto, estarão disponíveis para serem absorvidos ou adsorvidos, e ainda propor hipóteses mais seguras sobre como os metais interagem com os organismos aquáticos (MINEQL⁺ 4.62.3).

Quando um metal entra no ambiente aquático, o seu potencial de toxicidade para biota será determinado por uma combinação da especiação do elemento e pelo estado fisiológico dos organismos expostos. As interações entre metal e fitoplâncton podem ocorrer a partir da presença do metal no ambiente externo, circundando a célula, de reações com a membrana biológica, ou ainda pelo fracionamento do metal dentro do organismo. (TWISS et al., 2001). A biodisponibilidade é explicada pela concentração do metal que é efetivamente

usada pelo organismo e irá agir sobre receptores e sítios fisiológicos específicos e fundamentais ao metabolismo do organismo, podendo causar toxicidade (BATLEY et al., 2004). No caso dos elementos não essenciais, como cádmio, cromo, mercúrio, chumbo, etc., alguns organismos não são capazes de regulá-los, e, portanto, os mesmos podem acumular-se nas células, causando efeitos tóxicos (DALLINGER e RAINBOW, 1993; REINFELDER et al., 1998). Mesmo sendo capazes de regulação, há um limite para tal, que excedido poderá ocasionar qualquer toxicidade (RAINBOW, 2002).

De acordo com Batley et al. (2004), a toxicidade e biodisponibilidade dos metais estão relacionadas à sua forma química no meio. Agentes complexantes são capazes de decrescer a atividade do íon metálico livre, e diminuir seu efeito tóxico. No entanto, há exceções, como por exemplo, os complexos de metais com moléculas lipofílicas, que devido à sua rápida penetração através de membranas celulares e habilidade em transportar o metal, podem ser mais tóxicos que o íon de metal livre.

Tendo sido acumulado nas células dos organismos fitoplanctônicos, o destino do metal é a entrada na cadeia alimentar. Os invertebrados zooplanctônicos poderão absorver elevadas concentrações de metal a partir de sua dieta (YU e WANG, 2004). Nestes casos, os alvos podem ser as mitocôndrias que possuem enzimas e proteínas com funções respiratórias, as quais, ao se ligarem ao metal, perdem sua eficiência na conversão de energia e paralisam a fosforilação oxidativa ocasionando danos à célula. Os efeitos tóxicos começam a aparecer dependendo da concentração do metal acumulado e do tempo de exposição. Os organismos podem apresentar alterações sobre parâmetros do ciclo de vida, prejuízos na capacidade de assimilação do alimento, podendo comprometer aspectos reprodutivos e de sobrevivência (BARATA et al., 2002; SOFYAN et al., 2007; RODGHER et al., 2009).

1.3.1 Cádmio

Entre os metais passíveis de exercer efeitos tóxicos encontra-se o cádmio (Cd). Este elemento é visto como um poluente prioritário para o monitoramento ambiental e está incluído na lista de elementos considerados potencialmente perigosos ao planeta (ZHOU et al., 2006). O Cd é um metal cinza claro, com brilho metálico e maleável, cuja superfície escurece em contato com o ar devido à formação de uma camada de óxido. Este elemento químico não teve sua essencialidade comprovada para organismos vivos e possui potencial tóxico (TERRY e STONE, 2002; ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006). Embora seja conhecido que esse metal foi utilizado como nutriente substituindo o Zn em algumas diatomáceas

marinhas (PRINCE e MOREL, 1990). O Cd é um metal frequentemente estudado (BARATA et al., 2002; DEKKER et al., 2002; WANG e KE, 2002; YU e FLEEGER, 2006; PESTANA et al., 2007; SOFYAN et al., 2007; WANG et al., 2009; RAINBOW e SMITH, 2010; XIE et al., 2010; RAINBOW et al., 2011) e, quando presente nos ambientes aquáticos, pode acumular-se no sedimento ou tornar-se disponível para os organismos aderido à partículas suspensas (HOFFMAN et al., 1995).

O cádmio pode ser proveniente de fontes naturais, tais como rochas, incêndios em florestas e vulcões. No entanto, a principal fonte de Cd decorre de atividades antropogênicas como a queima de carvão mineral, recobrimento de aço e ferro, estabilizador para PVC, pigmentos para tinta, plástico e vidro, fabricação de baterias níquel-cádmio e ligas metálicas, resíduos industriais e domésticos, processos de mineração e refino de metais (HOFFMAN et al., 1995; TERRY e STONE, 2002; RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006). As baterias recarregáveis de níquel-cádmio são usadas nos mais diversos segmentos da sociedade, servindo como suporte no armazenamento de energia elétrica, nas sinalizações de vias férreas, de trânsito e de muitas unidades industriais de monitoramento e controle de processo. Atualmente, as baterias portáteis têm sido utilizadas, principalmente, em aparelhos telefônicos e de rádio transmissão representando cerca de 80% da produção de Cd (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006).

A contaminação das águas ocorre pela disposição inadequada dos resíduos e ainda por possível derrame de resíduos e efluentes contaminados (BAIRD, 2002; CHASIN e CARDOSO, 2003). Em ambientes dulcícolas, o Cd apresenta-se em sua maior parte na forma iônica livre (Cd^{2+}), portanto disponível para ser absorvido e/ou adsorvido pelo fitoplâncton. Hidróxido de cádmio e complexos de carbonato de cádmio também podem ocorrer. Em águas com alto teor de matéria orgânica, mais da metade encontra-se sob a forma de complexos orgânicos. Compostos de Cd como sulfito, carbonato e óxido são praticamente insolúveis em água, porém na presença de ácidos, luz ou oxigênio, podem ser transformados em sais solúveis (CHASIN e CARDOSO, 2003). Em um estudo sobre a especiação do Cd no reservatório de água doce em Barra Bonita (SP – Brasil), Gouvêa et al. (2005) observaram que no ambiente natural o Cd tem baixa capacidade de complexação com MOD (Matéria Orgânica Dissolvida) em comparação a outros metais como o cobre (Cu); neste estudo a complexação do Cd ocorreu com materiais de alta massa molecular, normalmente excretados por cianofíceas como *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides*.

No Brasil, de acordo com a resolução CONAMA (2005), o intervalo de concentração de Cd total permitido varia entre 0,001 e 0,01 mg L^{-1} ($8,9 \times 10^{-9}$ e $8,9 \times 10^{-8}$ mol L^{-1}

¹) em águas de classe I, II e III. Essas águas são destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; proteção de comunidades aquáticas, recreação de contato primário e secundário, aquicultura, pesca, irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras e dessedentação de animais. Nos Estados Unidos a concentração permitida de Cd em águas destinadas ao consumo humano é de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ ($4,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) (U.S. EPA, 1996).

De acordo com o relatório da CETESB (2009), a concentração de Cd nos ambientes não poluídos geralmente é inferior a $0,001 \text{ mg L}^{-1}$, no entanto, o nível de Cd dissolvido em sistemas hídricos pode exceder $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ em áreas próximas às atividades de extração de minérios. A emissão de Cd no meio ambiente vem aumentando em uma ordem de magnitude em relação à emissão por fontes naturais. A água potável apresenta baixas concentrações deste metal, geralmente entre 1×10^{-5} e $1 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$. Em ambientes estuarinos de baixo e médio impacto antrópico os valores de Cd dissolvido podem variar entre 6×10^{-6} e $2,4 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$ (MALUF, 2009).

O metal Cd foi escolhido para esta pesquisa devido ao aumento da sua concentração nos ambientes aquáticos, decorrente da sua ampla utilização na indústria, agricultura, mineração e resíduos domésticos. É um metal com elevado potencial de toxicidade, e, ainda, alguns autores questionam a possibilidade de essencialidade para este metal (PRINCE e MOREL, 1990). A compreensão do comportamento do cádmio nos corpos hídricos, bem como dos principais mecanismos de interação com os organismos vivos presentes nesses ambientes são importantes para a caracterização das principais relações de equilíbrio trófico dos ecossistemas. Considerando que existem numerosas possibilidades de reações químicas entre os metais e os componentes dos ambientes aquáticos, o bom entendimento dessas reações contribui efetivamente para a proteção dos ecossistemas aquáticos naturais ou artificiais.

1.4. Fitoplâncton

A interação entre um metal e células do fitoplâncton pode ocorrer de diversas maneiras, a partir da formação de complexos solúveis em lipídios devido à rápida difusão através da membrana plasmática (TWISS et al., 2001; BATLEY et al., 2004), interação com a ficosfera ou mucilagem no entorno da célula algal (Lombardi et al., 2002), interação com proteínas de membranas (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006). A membrana plasmática, de dupla camada lipídica, consite na maior barreira entre o interior do fitoplâncton e seu meio

externo, podendo atuar como proteção para a célula em relação aos elementos tóxicos. Na maioria dos casos, os íons metálicos e seus complexos têm baixa solubilidade em lipídios e, conseqüentemente, baixa taxa de difusão através das membranas celulares. A absorção é catalisada em duas fases, consistindo primeiro na ligação química a um sítio de absorção específico da membrana, seguido pela transferência e liberação do complexo no interior da célula (MOREL e HERING, 1993). Mecanicamente, os sítios de absorção específica e o processo de transporte possuem um limite como mostrado em estudos de exposição através da água (TWISS et al., 2001).

Nos ambientes aquáticos, o Cd pode ser absorvido ou adsorvido por espécies fitoplanctônicas. A superfície das algas contém numerosos grupos funcionais com alta afinidade por íons metálicos e uma carga negativa, devido aos ácidos carboxílicos e grupos fosfatados (TWISS et al., 2001). As interações entre microalgas e íons metálicos ocorrem devido às relações complexas nos vários compartimentos algais. Essas interações envolvem adsorção passiva do metal na superfície da alga e absorção ativa (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006). Embora pouco seja conhecido sobre o modo de ação do Cd, devido à sua alta afinidade por grupos sulfidríla, este metal é considerado um bloqueador de grupos funcionais essenciais nas biomoléculas, o que resulta na inibição de vários processos metabólicos nas células (GORBI et al., 2007). A toxicidade pode também estar relacionada ao estresse oxidativo, induzido nas algas tanto pelo aumento da concentração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) ou pela redução da capacidade oxidante da célula. Em produtores primários, esses efeitos podem resultar na inibição da produção de clorofila, da fotossíntese e da divisão celular, reduzindo o crescimento populacional (BAUMANN et al., 2009).

Quando o metal está no interior da célula, antes de sofrer a toxicidade, algumas espécies de algas são capazes de utilizar mecanismos para tentar amenizar ou impedir o efeito tóxico. As proteínas do tipo fitoquelatinas são reconhecidamente induzidas na presença de metais, e apresentam papel importante na detoxificação desses elementos nas algas (TSUJI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2006). A presença de proteínas do tipo metalotioneínas induzidas pela presença de Cd e/ou Zn foi detectada em *Chlorella vulgaris* (HUANG et al., 2009). No entanto, quando a concentração de metal ultrapassa a capacidade da alga em detoxificá-lo, inicia-se o processo de toxicidade, que pode se fazer notar através de falhas metabólicas (GUANZON et al., 1994; AWASTHI e RAÍ 2005; ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006), transporte de elétrons, efeitos sobre os fotossistemas e conseqüente redução da capacidade fotossintética (ZHOU et al., 2006; LOMBARDI e MALDONADO, 2011),

estresse oxidativo (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006), além de prejuízos sobre sistemas enzimáticos que controlam a bioquímica e funções fisiológicas, dentre outros.

As conseqüências globais para a alga, como resposta aos distúrbios ocasionados pela toxicidade do metal nas células são alterações nas taxas de crescimento populacional, redução da biomassa algal, e alteração de biomoléculas, mudanças fenotípicas, taxas respiratórias, tamanho da célula, alterações sobre a estrutura e morfologia da célula, (FARGASOVÁ et al., 1999; PEÑA-CASTRO et al., 2004; ZHOU et al., 2006; LOMBARDI et al., 2007; PERALES-VELA et al., 2007; YU et al., 2007; BAUMANN et al., 2009, HUANG et al., 2009; LOMBARDI e MALDONADO, 2011).

Muitos trabalhos na literatura relatam esses efeitos pela presença de metais, entre eles o cádmio. Leborans e Novillo (1996) observaram que os níveis de clorofila em *Olisthodiscus luteus* diminuíram 86,7% em relação ao controle seguindo exposição ao Cd ($4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) durante 180 horas. Além disso, concentrações mais elevadas de Cd reduziram o tamanho da célula e causaram diminuição na taxa de crescimento. No entanto, Nassiri et al. (1997) não encontraram inibição do crescimento em *Tetraselmis suecica* com concentrações inferiores a $8,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de Cd, mas $1,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ provocou 10% de inibição do crescimento após quatro dias, e 50% de inibição do crescimento foi obtido em $8,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de Cd, respectivamente. Carr et al. (1998) detectaram inibição do crescimento da alga unicelular *Chlorella vulgaris* por $1,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cd após 48 horas de exposição. O fotossistema da alga foi danificado e redução dos pigmentos fotossintéticos obtida. Prasad et al. (1998) mostraram que $9,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de Cd reduziu linearmente a concentração de clorofila “a” em *Chlamydomonas reinhardtii* e que quando exposta a $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cd, o conteúdo de clorofila “a” foi reduzido em 76%.

Perales-Vela et al. (2007) verificaram efeitos sobre taxa de crescimento, conteúdo de clorofila, carotenóides, taxa fotossintética, taxa de respiração em *Scenedesmus incrassatulus* expostas a concentrações subletais de cobre (Cu²⁺). Awasthi e Raí (2005) demonstraram que a absorção de nitrato (NO₃⁻) em células de *Scenedesmus quadricauda* foi inibida quando a alga foi exposta aos metais Ni, Zn e Cd durante quatro horas. Peña-Castro et al. (2004) avaliaram efeitos da exposição de *Scenedesmus incrassatulus* aos metais Cu, Cd e Cr (VI) e verificaram aparecimento de formas unicelulares, alterações morfológicas nos cenóbios, além de prejuízos sobre a fotossíntese devido à redução na concentração de clorofila “a” e densidade de células. Esses autores verificaram também que as algas foram capazes de se recuperar quando os agentes estressores foram retirados.

O efeito do metal nos organismos é determinado por fatores intrínsecos relacionados à história de exposição prévia e fatores ambientais e, por isso há uma considerável variação das concentrações que exercem efeitos tóxicos no fitoplâncton. Concentrações de Cd entre $8,9 \times 10^{-8}$ e $8,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ foram suficientes para causar redução significativa nas taxas de crescimento de populações fitoperifíticas (BERE e TUNDISI, 2011). Baumann et al. (2009) obtiveram redução do conteúdo de clorofila pela exposição a 1×10^{-6} mol L⁻¹ de Cd nas espécies *Fucus vesiculosus*, *Cladophora rupestris*, *Palmaria palmata* e *Polysiphonia lanosa* após 14 dias. Inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* após exposição a 8×10^{-5} mol L⁻¹ de Cd foi obtido por Huang et al. (2009). Zbigniew et al. (2007) mostrou que a microalga *Scenedesmus armatus* exposta a $9,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de Cd durante 48 horas apresentou reduções no crescimento celular, no conteúdo de clorofila e alterações ultra-estruturais. Os parâmetros de crescimento, fotossíntese, biomassa e conteúdo de clorofila foram afetados pela exposição a concentração de 2×10^{-6} mol L⁻¹ de Cd após 48 horas sobre a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (ZHOU et al., 2006). A atividade da enzima superóxido dismutase em células de *Scenedesmus subspicatus*, *S. obliquus* e *S. microspina* foi significativamente reduzida após a exposição a $1,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cd durante 48 horas (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006).

Considerando as diferentes variáveis envolvidas nos mecanismos de toxicidade de metais nas microalgas e a propriedade que possuem de acumular os elementos em seus tecidos, esta pesquisa, que objetiva o estudo de transferência de metais em cadeia trófica com 3 níveis partindo da base fitoplancônica, vem contribuir para o entendimento dos mecanismos de regulação de metais nos ambientes aquáticos e o modo pelo qual se dá a transferência na cadeia trófica.

1.5. Zooplâncton

Os efeitos tóxicos pela exposição aos metais para organismos zooplancônicos são frequentemente abordados na literatura (YU e WANG, 2004; FRAYSSE et al., 2006; WANG et al., 2009). Os metais causam toxicidade principalmente através da exposição em sua forma dissolvida, ou seja, através da água (CAÑIZARES-VILLANUEVA et al., 2000; BOSSUYT and JANSSEN, 2005; PESTANA et al., 2007). No entanto, devido à capacidade que muitos elementos possuem de se acumular nas células algais, eles podem causar toxicidade a partir de contaminação via dieta alimentar (HOOK e FISHER, 2000; LIU et al., 2002; LIAO et al., 2011). Estudos que abordam este aspecto da toxicidade vêm sendo cada vez mais relatados na literatura (BARATA et al., 2002; FISHER e HOOK, 2002; WANG e

KE, 2002; YU e FLEEGER, 2006; SOFYAN et al., 2007; RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008; XIE, et al., 2010) e são de grande importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos na transferência trófica desses elementos, assim como a capacidade de biomagnificação.

Em relação ao cádmio, abordagens recentes (RAINBOW e SMITH, 2010; XIE, et al., 2010; LIAO et al., 2011; RAINBOW et al., 2011) comprovam a transferência deste alimento nas cadeias alimentares aquáticas, dependendo do tempo de exposição e da concentração do metal no alimento. No entanto, estudos anteriores (MASON, 1991; WREN et al. 1995; REINFELDER et al., 1998;) tratam o assunto da transferência trófica com cuidado, já que nem sempre ela ocorre de maneira efetiva.

No conceito de transferência trófica, a absorção do metal se dá através do alimento (Rainbow et al., 2011). Alguns autores utilizam para isso o termo Metal Troficamente Disponível (do inglês *Trophically Available Metal* - TAM). No entanto, é importante observar que um metal pode ser disponível para outro nível trófico através da dieta e nem por isso se biomagnificar (TIMMERMANS et al., 1989; MIHUC e MINSHALL, 1995). A biomagnificação de um elemento ocorre quando a concentração no tecido de um organismo excede a concentração do seu alimento ou de um nível trófico adjacente (REINFELDER et al., 1998).

A precisão na quantificação de parâmetros como contribuição das frações dissolvida e particulada, eficiência de assimilação do alimento ingerido, taxas de ingestão e filtração e, ainda, concentração do elemento na presa permitem uma melhor caracterização do potencial de transferência trófica de certos elementos (REINFELDER et al., 1998). A caracterização das frações dissolvida e particulada é fundamental para o conhecimento de qual via de absorção é mais importante ao organismo. A eficiência de assimilação (EA) caracteriza a passagem de metais através do trato intestinal durante a digestão e representa a fração do alimento ingerido que permanece acumulada no tecido do animal (GUAN e WANG, 2006). As taxas de ingestão e filtração contribuem para quantificação do alimento ingerido pelo animal (REINFELDER et al., 1998).

Outro aspecto importante da toxicidade por metais nos ambientes aquáticos se deve ao fato de que na maioria das vezes a toxicidade ocorre a partir da exposição crônica, ou seja, a baixas concentrações por períodos de tempo prolongados. Eventos agudos podem ter maior transtorno para os organismos afetados, no entanto são raros (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006; COSTA et al., 2008). Por isso a importância de se caracterizar os possíveis efeitos a partir da exposição a baixas concentrações através da cadeia trófica.

O mecanismo de ação tóxica do Cd através do alimento ocorre primeiramente devido a sua alta afinidade por moléculas de enxofre e nitrogênio. O Cd associado a essas moléculas entrará nas células dos invertebrados. As proteínas são constituídas por aminoácidos, muitos dos quais contêm enxofre e/ou nitrogênio. Dessa forma, o metal está metabolicamente disponível. Ele poderá então afetar a função de moléculas biológicas essenciais, até que processos fisiológicos do organismo afetado iniciem uma tentativa de excreção ou ligação a moléculas de alta afinidade da qual é improvável que o metal se desprenda (RAINBOW, 2002). A ligação a essas moléculas de alta afinidade caracteriza o metal na forma que será acumulado.

As moléculas de alta afinidade são caracterizadas como proteínas ligantes celulares, chamadas de metalotioneínas responsáveis pela inativação química da espécie metálica. Em seguida, ocorre o sequestro do metal em vesículas de membrana do tipo corpos lisossomais, que possuem a função de estocar, transportar ou compartimentalizar o metal (RAINBOW, 2002; FRAYSSE et al., 2006). A toxicidade celular tem início após a saturação desses sítios e o organismo irá sofrer inicialmente com efeitos subletais e eventualmente letais (LAWS, 2000). Estudos indicam que existe uma relação direta entre a distribuição do metal no alimento e a absorção desse metal. Nos invertebrados herbívoros a absorção do metal é diretamente proporcional ao conteúdo citoplasmático do elemento nas células algais (REINFELDER et al., 1998).

Os metais não essenciais são armazenados em grânulos no citoplasma e, em seguida, eliminados na forma de fezes, ou armazenados para posterior excreção. Mexilhões marinhos são capazes de eliminar metais não essenciais por egestão (GUAN e WANG, 2006), enquanto que copépodos marinhos liberam metais por excreção (REINFELDER et al., 1998). O mecanismo de eliminação de metais não essenciais em invertebrados aquáticos ainda necessita de estudos mais aprofundados. No entanto, algumas propostas já foram descritas e utilizadas para explicar o mecanismo de eliminação nesses organismos (RAINBOW, 2002).

No caso do Cd e de outros metais não essenciais, existem duas possibilidades após o sequestro nos corpos residuais lisossomais. Primeiramente o metal pode ser acumulado em órgãos específicos do organismo sem que haja qualquer excreção (MASON e JENKINS, 1995; LANGSTON et al., 1998). Segundo, existe a possibilidade de acumulação com pequena excreção (GALEY e RAINBOW, 1998). No primeiro caso, as células contendo os corpos residuais lisossomais “enfileiram-se ou acumulam-se” no trato intestinal, impedindo a excreção do Cd absorvido, portanto o metal será acumulado completamente (MASON e JENKINS, 1995; LANGSTON et al., 1998). No segundo caso, o processo ocorre da mesma

forma que nos metais essenciais, ou seja, o organismo consegue “lidar ou regular” esse metal e excretá-lo em pequenas porções (GALEY e RAINBOW, 1998; RAINBOW 2002).

Anfípodas que absorveram cádmio através da dieta tiveram a capacidade de regulá-lo da mesma forma que ocorre com os metais essenciais (GALEY e RAINBOW, 1998). Elementos não essenciais como Ag e Cd podem ser excretados em uma taxa mais rápida que elementos essenciais e essa velocidade de eliminação parece ser dependente principalmente da quantidade do alimento disponível e da via de absorção no caso de copépodos, por exemplo. Em contraste, a taxa de eliminação de elementos essenciais como Se e Zn é independente da disponibilidade do alimento e da via de absorção (REINFELDER et al., 1998).

Os efeitos tóxicos interferem no ciclo de vida, comportamento, reprodução e processos fisiológicos normais dos organismos (BRULAND et al., 1991). As interferências crônicas irão afetar o tempo de desenvolvimento embrionário, idade para primeira reprodução, tempo de geração (tempo de ovo a ovo), intervalo para produção de ovos, taxas de fertilidade, número de ovos, ninhadas e neonatos, taxas de filtração, ingestão e assimilação, taxas de crescimento, longevidade e taxas de produtividade secundária (KNOPS et al., 2001; BARATA et al., 2002; DEKKER et al., 2002; HOOK e FISHER 2002; WANG e KE 2002; GUAN e WANG 2006; De SCHAMPHELAERE et al., 2007; GOULET et al., 2007; SOFYAN et al., 2007; RODGHER et al., 2009; RAINBOW e SMITH 2010; XIE et al., 2010).

As principais causas para os efeitos da exposição ao alimento devem-se a prejuízos no desenvolvimento do embrião dentro da câmara de incubação das fêmeas (ORCHARD, et al., 2002), devido à falhas no processo de vitelogênese, ausência de desenvolvimento dos ovos, diminuição do conteúdo de proteína e redução na porcentagem de eclosão (HOOK e FISHER, 2002), ou ainda pela diminuição do tamanho do corpo dos organismos (HÜLSMANN, 2001). Alguns estudos mostraram ainda que os divertículos do intestino médio são os principais alvos de absorção do cádmio e nutrientes como cálcio, e que problemas no metabolismo do cálcio podem afetar a fisiologia do intestino (BARATA et al., 2002). Outros trabalhos mostram que dafinídeos coletam e ingerem normalmente células algais expostas ao cádmio, porém o contaminante dificulta a digestão ocasionando a passagem de células através do intestino sem serem digeridas ou assimiladas (TAYLOR et al., 1998).

De acordo com Hook e Fisher (2002), a exposição ao alimento contaminado com $6,4 \times 10^{-8}$ mol Cd g PS⁻¹ provocou redução na produção de ovos em cladóceros. Efeitos tóxicos foram também observados por Barata et al. (2002), considerando alimento e água como

potenciais fontes para absorção do Cd, sobre a sobrevivência e taxas de alimentação de *Daphnia magna*. Wang e Ke (2002) sugeriram que o Cd pode ser biomagnificado durante a transferência trófica de bivalves (*Ruditapes philippinarum*) para gastrópodos predadores *Babylonia formosae habei* e *Nassarius teretiusculus*.

De Schampheleare et al. (2004) verificaram que concentrações entre 130 a 490 $\mu\text{g Zn g PS}^{-1}$ na alga *P. subcapitata* e utilizada com alimento para *D. magna* causaram redução significativa na reprodução e tamanho do corpo dos organismos. Guan e Wang (2004) demonstraram que juvenis de *D. magna* acumularam Cd e Zn quando alimentados com algas expostas a esses metais. O anfípoda *Leptocheirus plumulosus* e os bivalves *Macoma baltica* e *Potamocorbula amurensis* foram expostos a espécies fitoplanctônicas contaminadas com Se e apresentaram alterações na eficiência de assimilação do alimento devido à carga tóxica (SCHLEKT et al., 2002). Hook e Fisher (2001) mostraram que a Ag fornecida através do alimento algal inibiu a reprodução em cladóceros.

Estudos considerando os efeitos subletais pela toxicidade via dieta alimentar foram realizados também para os metais cobre (Cu), mercúrio (Hg), zinco (Zn), selênio (Se), níquel (Ni) e prata (Ag). Rodgher et al., (2009) observaram redução no número de neonatos, número de ovos, tamanho do corpo e sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas por sete dias à *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminadas com concentrações entre 3 e 68 fg Cu célula⁻¹. A porcentagem de Hg e MeHg aumentou a cada nível trófico, a partir da água, algas e macroinvertebrados, indicando acumulação e magnificação em organismos bentônicos encontrados em ambientes contaminados (ZIZEK et al., 2007). Sofyan et al., (2006) encontraram que o alimento contaminado com Cd e Cu afetou a taxa de alimentação, sobrevivência e reprodução de *Ceriodaphnia dubia*. Bielmyer et al. (2006) relataram inibição da reprodução do copepoda marinho *Acartia tonsa* quando foram alimentados com diatomácea contaminada com Ag, Zn, Cu e Ni.

Larvas de *Centroptilum triangulifer* que foram criadas alimentando-se sobre o perifíton natural contaminado com concentrações entre 0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd na forma dissolvida apresentaram significante fator de transferência trófica deste metal e, ainda, efeitos sobre a sobrevivência dos organismos (XIE et al., 2010). Rodgher e Espíndola (2008) demonstraram que a sobrevivência e o número de neonatos de *Ceriodaphnia dubia* diminuíram com a exposição à alga *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminada com $1,0 \times 10^{-7}$ a $5,6 \times 10^{-6}$ mg Cd g PS⁻¹. Sofyan et al., (2007) descreveram que a sobrevivência, as taxas de alimentação e reprodução de *Ceriodaphnia dubia* foram significativamente afetadas devido à exposição através do alimento contaminado com 0,02 a 5,6 $\mu\text{g Cd g PS}^{-1}$. Goulet et al., (2007)

observaram que o alimento é uma importante rota de absorção do Cd, entretanto, esses autores mostraram que a exposição crônica de *Daphnia magna* às algas *Chamydomonas reinhardtii* e *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminadas com $5,6 \times 10^{-7}$ e $1,1 \times 10^{-4}$ g Cd g PS⁻¹ não causou efeitos significativos sobre a sobrevivência e reprodução dos organismos. As taxas de alimentação e o tamanho do corpo do anfípoda marinho *Leptocheirus plumulosus* foram prejudicados quando esses organismos alimentaram-se com as algas *Nitzschia punctata*, *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana* contaminadas com $4,12 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd (YU e FLEEGER, 2006).

De acordo com os trabalhos encontrados na literatura, fica evidente que o alimento deve ser considerado uma importante fonte de contaminação por Cd e também por outros metais. Por isso, uma análise persistente e aprofundada dos possíveis efeitos tóxicos sobre organismos zooplancctônicos após exposição crônica ao alimento contaminado é importante para uma melhor caracterização deste tipo de exposição. Essas informações podem ser úteis para prever efeitos sobre outros organismos aquáticos expostos ao Cd de maneira semelhante, e ainda as ameaças que este tipo de exposição pode ter sobre o equilíbrio e dinâmica dos ecossistemas aquáticos.

1.6. Peixe

Os efeitos sobre organismos aquáticos podem ser mais amplos e atingir consumidores de segunda ordem como peixes. Os peixes de pequeno porte fazem parte das cadeias alimentares aquáticas como consumidores secundários e são organismos com capacidade para acumular elevadas concentrações de metais. Quando o Cd contamina o ecossistema aquático, ele pode entrar na cadeia alimentar através do consumo direto da água ou da biota, e ainda por meio de rotas não dietéticas como a absorção pelo epitélio. Para os peixes, as brânquias, a pele e o trato digestivo são os potenciais sítios de absorção do Cd através da água.

O mecanismo de ação tóxica do metal Cd nos peixes é semelhante ao processo encontrado nos invertebrados. O Cd possui alta afinidade por moléculas de enxofre e nitrogênio e, quando associado a essas moléculas, terá capacidade de entrar nas células e iniciar seus efeitos sobre as moléculas biológicas essenciais. Os peixes também utilizarão proteínas de alta afinidade como metalotioneínas na tentativa de regular o efeito tóxico (RAINBOW, 2002). A diferença aqui é que essas proteínas ligantes são mais eficientes, produzidas em quantidades maiores e, portanto, a toxicidade pode ser controlada dependendo

do grau de exposição (RAINBOW, 2002; REINFELDER et al., 1998). Por isso, nos casos de contaminação via dieta alimentar, a possibilidade de acúmulo do metal é atenuada.

As respostas tóxicas em peixes expostos ao Cd na água são bem relatadas (MATZ et al., 2007; WANGSONGSAK et al., 2007; LIAO et al., 2011; LIU et al., 2011). Entretanto, estudos sobre a exposição através da dieta são menos frequentes (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006; NG e WOOD, 2008), embora o alimento seja uma importante rota de contaminação por Cd em peixes sobre condições naturais. Frequentemente, a acumulação do Cd em peixes ocorre em órgãos como intestino, rim, fígado, brânquias e, no caso dos grandes peixes, nos músculos, parte que é destinada ao consumo humano (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006). Os efeitos crônicos incluem alterações histológicas, hematológicas, comportamentais, mudanças no peso e ainda pode atingir aspectos reprodutivos e, conseqüentemente, a sobrevivência da espécie (HOFFMAN et al., 1995; REINFELDER et al., 1998; BERNTSSEN et al., 2001; KRUMSCHNABEL et al., 2010).

Inicialmente, os estudos de toxicidade por metais para peixes eram realizados através da exposição na água ou na dieta produzida comercialmente. Berntssen et al. (2001) avaliou a dieta produzida comercialmente na forma de pelets secos enriquecidos com metais e verificou que de 10 a 125 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ de alimento seco por um período de 35 dias a 4 meses causou respostas fisiológicas adversas tais como hipocalcemia, aumento no número de enterócitos e apoptose no intestino, diminuição na digestibilidade de nutrientes e aumento das células cloreto nas brânquias de *Salmo salar*. Em outros estudos, a exposição a dietas contaminadas com 300 a 500 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ durante quatro semanas não afetou a sobrevivência e o crescimento de truta arco-íris (BALDISSEROTTO et al., 2005). Da mesma forma, a exposição durante 35 dias a 10 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ não causou mortalidade em tilápia *Oreochromis mossambicus* (PRATAP et al., 1989). No entanto, estes estudos não avaliaram efeitos subletais.

Em seguida, iniciou-se a exploração de efeitos tóxicos devido à transferência de metais através da cadeia trófica. Estudos sobre a toxicidade do Cd incorporado ao alimento natural demonstraram que a exposição do verme *Lumbriculus variegatus* a 0,1; 5; 20 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e oferecido como alimento ao peixe *Oncorhynchus mykiss* durante 1 mês, causou uma taxa de transferência trófica de Cd do verme para o peixe relativamente baixa. Entretanto, houve inibição do crescimento e acúmulo de Cd no intestino, fígado, rins, brânquias e carcaça. Os autores relataram ainda que, em comparação à absorção e acumulação pelo alimento comercial peletizado, houve maior disponibilidade e toxicidade do Cd para o

peixe quando este foi incorporado ao alimento natural (NG e WOOD, 2008). Da mesma maneira, Harrison e Curtis (1992) relataram que a eficiência de absorção do Cd do alimento natural por truta arco-íris foi 5 vezes maior que do alimento comercial peletizado. Essas discrepâncias são possivelmente causadas por diferenças na ligação do metal entre o alimento natural e artificial, afetando então a absorção ou assimilação de metais por predadores. De acordo com Reinfelder et al. (1998), a eficiência de assimilação do metal pelo predador é afetada pela bioquímica do metal na presa/alimento e na fisiologia do predador.

Experimentos realizados sobre bioacumulação de Cd, com concentrações entre 0,35 e 3,50 mg L⁻¹, em uma cadeia alimentar aquática experimental envolvendo uma alga *Chlorella vulgaris*, um zooplâncton *Moina macrocopa* e o peixe híbrido *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*, demonstraram que houve transferência do Cd entre os diferentes níveis da cadeia alimentar, sendo encontrados resíduos nos músculos dos peixes sessenta dias após exposição (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006).

Goto e Wallace (2009) avaliaram mecanismos relacionados aos metais Cd, Cu, Pb e Zn em presas contaminadas (*Palaemonetes pugio* e *Nereis acuminata*) sobre a transferência trófica para o peixe bêntico forrageador *Funflus heteroclitus*. Os autores concluíram que fracionamentos intracelulares dos metais nas presas podem ser parcialmente responsáveis pela disponibilidade trófica para um predador em habitats poluídos com metal. Peixes da espécie *Danio rerio* alimentados com larvas de quironomídeos (*Chironomus riparius*) expostas através da água (288 µg Cd g PS⁻¹) e sedimento (153 µg Cd g PS⁻¹) ao metal Cd durante sete dias, apresentaram elevadas concentrações de Cd no rim, fígado e intestino, e baixas concentrações nas brânquias e carcaça, evidenciando que o Cd pode ser adquirido através do alimento natural em peixe (BÉCHARD et al., 2008).

A transferência trófica de As, Cd, Cr, Hg (II) e MeHg de um anfípoda bêntico (*Leptocheirus plumulosus*) e um verme (*Lumbriculus variegatus*) para um peixe (*Fundulus heteroclitus*) foi investigada por Dutton e Fisher (2001). Os autores observaram que o Cd e Hg(II) foram acumulados principalmente no intestino, e ainda que o MeHg biomagnificou-se nos níveis tróficos avaliados, enquanto que os demais metais não biomagnificaram-se. Creighton e Twining (2010) avaliaram os efeitos do Cd, Se e Zn sobre o peixe de estuário *Ambassis jacksoniensis* a partir das exposições via água e alimento. Os metais foram fornecidos através de *Artemia* sp. alimentadas com algas contaminadas. O alimento foi uma melhor via de absorção de metal para o peixe que a água, no entanto, o potencial de biomagnificação para todos os metais foi baixo. Por isso, estudos de laboratório sugerem que

o alimento pode contribuir substancialmente para a absorção total de alguns metais, mesmo na ausência de biomagnificação (REINFELDER et al., 1998).

Liu et al. (2011) obtiveram diminuição da sobrevivência, crescimento, aumento do índice hepato-somático, alteração na atividade de enzimas hepáticas, alterações histológicas nas brânquias, fígado e baço de *Synechogobius hasta* expostos a concentrações entre 0 e 0,29 mg L⁻¹ de Cd na forma dissolvida por 15 dias. A exposição sub-crônica do peixe *Puntius gonionotus* a 0,06 mg L⁻¹ de Cd na forma dissolvida durante 60 dias provocou hipertrofia e hiperplasia das lamelas primárias e secundárias das brânquias, vacuolização dos hepatócitos além de danos sobre os glomérulos e túbulos renais. Os níveis de metalotioneínas no fígado foram elevados mesmo após os peixes terem sido removidos para água livre de Cd (WANGSONGSAK et al., 2007).

Os trabalhos disponíveis refletem a importância do Cd como causador de toxicidade, tanto na forma dissolvida como através do alimento, para níveis tróficos mais elevados das cadeias alimentares aquáticas. O alimento natural deve ser investigado como potencial fonte de Cd para os peixes. Por isso a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a transferência trófica desse elemento nas cadeias alimentares dos ambientes aquáticos.

1.7. Recuperação

Outro aspecto importante sobre a toxicidade dos metais para organismos aquáticos relaciona-se à existência ou não de recuperação depois de cessada a exposição dos organismos a esses tóxicos. De acordo com Mangas-Ramírez et al. (2004), cladóceros expostos a certas concentrações de metal podem recuperar-se quando as condições tornam-se favoráveis, quer seja através do restabelecimento de um ambiente livre de contaminantes, quer seja pela maior disponibilidade alimentar. No entanto, são poucos os estudos sob esse enfoque.

Muscatello e Liber (2010) observaram que a espécie de quironomídeo *Chironomus tetans* acumulou urânio (U) após 10 dias de exposição a 300 µg U L⁻¹ na forma dissolvida. No entanto, a concentração de U no corpo dos organismos diminuiu após 3 dias em que as larvas foram colocadas em água limpa. O crescimento das larvas de *C. tetans* também aumentou significativamente após serem transferidos para água livre de urânio.

Espécimes do caranguejo azul (*Callinectes sapidus*) coletados em ambientes contaminados (Cr, Cu, Hg, Pb e Zn) e livres de contaminação refletiram concentrações dos metais acumuladas no tecido de acordo com as características do ambiente. A concentração de mercúrio acumulado nos músculos dos organismos provenientes da área contaminada foi maior

em relação ao mercúrio acumulado nos músculos dos organismos da área livre de contaminação. E ainda, quando esses organismos foram transferidos para ambientes livres de contaminantes, as concentrações de mercúrio no tecido muscular não diminuíram. Os caranguejos das áreas limpas diminuíam as concentrações de Cu, Pb e Zn quando colocados em água limpa e com alimento não contaminado (REICHMUTH et al., 2010).

Guan e Wang (2006) avaliaram a toxicidade do Cd em três grupos de cladóceros da espécie *Daphnia magna*: clones tolerantes ao Cd, clones sensíveis ao Cd, e grupo de recuperação, cultivados após a intoxicação em água livre de Cd na forma dissolvida. Os organismos do grupo de recuperação não apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo de sobrevivência e concentração das metalotioneínas. No entanto, os cladóceros cultivados no sistema de recuperação foram capazes de restabelecer os padrões de crescimento e a concentração de Cd acumulada no corpo foi menor no grupo cultivado na ausência de Cd.

O comportamento alimentar de *Daphnia magna* foi avaliado após exposição a concentrações subletais do acaricida tetradifon, seguida de exposição a um período de recuperação. Os resultados indicaram que a taxa de filtração de *D. magna* continuou afetada pelo pesticida mesmo durante o período de recuperação, porém em menor intensidade (VILLARROEL et al., 1999).

O bivalve de água doce *Lamellidens marginalis* foi exposto experimentalmente a concentrações de 10, 20 e 30 mg L⁻¹ de Cd por 40 dias e transferidos para água livre de Cd através de EDTA ou uma espécie de macrófita (*Eichornia* sp.) conhecida por absorver Cd. Os organismos transferidos para água limpa diminuíram as concentrações de Cd nas brânquias, glândula digestiva (fígado), manto e concha (SHAMIK, 1999).

Van Gestel et al. (1993) avaliaram acumulação, eliminação e efeitos tóxicos sobre crescimento e reprodução do verme *Eisenia andrei* após exposição a 10 mg Kg⁻¹ de Cd no solo. A reprodução foi significativamente afetada após 3 semanas de exposição, porém foi completamente recuperada ao final do período de 3 semanas em solo não contaminado.

O inseticida carbaril foi aplicado em uma lagoa experimental e as alterações na comunidade zooplanctônica foram investigadas. A aplicação do inseticida causou uma redução significativa na população de cladóceros. Porém após a rápida degradação do pesticida na água a população de cladóceros foi restabelecida normalmente (HANAZATO e YASUNO, 1990).

A recuperação dos organismos aquáticos parece estar diretamente relacionada aos mecanismos de regulação de metais essenciais e não-essenciais encontrados nos invertebrados em geral (RAINBOW, 2002). A tolerância ou resistência à toxicidade por metais é realizada através da especiação do metal dentro da célula. O seqüestro por ligantes celulares

tais como as metalotioneínas, lisossomos e acúmulo em organelas específicas são estratégias comuns adotadas pelos invertebrados (WALLACE et al., 2003). Geralmente, as metalotioneínas são responsáveis pela homeostase de metais essenciais, Zn e Cu, e ainda para elementos não essenciais como Cd (FRAYSSE et al., 2006).

Dentro dessa temática, o alimento tem desempenhado um papel positivo nos processos de recuperação das populações zooplancônicas estressadas por substâncias tóxicas. Hauri e Horne (2004) mostraram que uma grande quantidade de alimento algal reduziu a disponibilidade do cobre para *C. dubia* durante testes crônicos de toxicidade devido à complexação do metal pelas partículas de alimento. Os autores chegaram à conclusão de que altos níveis de alimento poderiam suprir energia necessária para o crescimento e reprodução e, ao mesmo tempo, acentuar mecanismos específicos de detoxificação e resistência aos agentes tóxicos.

A possibilidade de “regulação” da concentração de metais nos organismos é considerada efetiva apenas para os metais essenciais como Zn e Cu (De SCHAMPHELAERE et al., 2004; 2007). No entanto, estudos já demonstraram a capacidade de “controle” dos efeitos tóxicos, mesmos para metais que não são essenciais, como o Cd (RAINBOW, 2002). A existência de recuperação em relação à toxicidade por metais não essenciais é pouco conhecida na literatura devido à crença no potencial de acúmulo e persistências nos organismos aquáticos. Por isso a necessidade de estudos que melhor caracterizem a existência ou não de recuperação para metais não essenciais como o Cd.

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais é um fato bastante preocupante do ponto de vista ambiental. Essas perturbações podem trazer efeitos deletérios tóxicos para o ecossistema como um todo. A contaminação das algas por metais possivelmente acarretará a transferência para outros níveis tróficos através do alimento. Os organismos zooplancônicos, por sua vez, ocupam uma posição-chave nas cadeias alimentares aquáticas, por constituírem um elo entre produtores primários e níveis tróficos superiores. Desta forma, o impacto de possíveis alterações em sua composição bioquímica, ciclo de vida e produtividade sobre outros níveis tróficos deve ser investigado.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos tóxicos do metal cádmio em uma cadeia alimentar experimental aquática constituída por uma microalga clorofícea, *Scenedesmus quadricauda*, um cladócero dafínídeo, *Simocephalus serrulatus* e um peixe da família Characidae, *Hyphessobrycon eques*. Para isso, foram delimitados os objetivos específicos que seguem.

Avaliar os efeitos do cádmio sobre a alga *Scenedesmus quadricauda* através do acompanhamento das seguintes variáveis:

- Concentração de clorofila “a”;
- Crescimento celular (densidade);
- Número de células por cenóbio;
- Biomassa seca;
- Fração do metal intracelular (adsorvido/absorvido).

Avaliar os efeitos do cádmio via alimento sobre o cladócero *Simocephalus serrulatus* através do acompanhamento das seguintes variáveis:

- Parâmetros do ciclo de vida:
 - Tempo de desenvolvimento embrionário;
 - Idade para primípara;
 - Intervalo na produção de ovos;
 - Tempo de geração (tempo de ovo a ovo);
 - Longevidade;
 - Taxas de fecundidade;
- Taxa de alimentação (Filtração e Ingestão);
- Produção secundária diária e no período experimental:
 - Investida em crescimento;
 - Investida em reprodução;
- Fração de metal particulado;
- Verificar a existência de recuperação em *S. serrulatus* exposto ao cádmio via dieta após tratamento com alimento livre de metal.

Avaliar os efeitos do cádmio via cadeia trófica sobre o peixe *Hyphessobrycon eques* através do acompanhamento das seguintes variáveis:

- Características histológicas das brânquias e do fígado;
- Peso fresco.

CAPÍTULO 1

TOXICIDADE E BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO EM *Scenedesmus quadricauda*

CAPÍTULO 1. Toxicidade e bioacumulação de cádmio em *Scenedesmus quadricauda*

RESUMO

O aumento da concentração dos poluentes nos ambientes aquáticos é preocupante do ponto de vista ecotoxicológico. Espécies fitoplanctônicas podem ser prejudicadas pela presença de metais e os resultados são refletidos sobre a produtividade primária nas cadeias alimentares aquáticas. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos do cádmio (Cd) sobre parâmetros fisiológicos da microalga clorofícea *Scenedesmus quadricauda*. As algas foram cultivadas em meio *Oligo* sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C), intensidade luminosa ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (16:8 h claro:escuro). Células em fase de crescimento exponencial foram expostas durante 96 h à concentrações nominais de 10^{-7} ; 3×10^{-7} ; 6×10^{-7} ; 10^{-6} e $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Cd. A concentração do metal acumulado, o conteúdo de clorofila “a”, o crescimento, o número de células por cenóbio e a biomassa seca foram monitorados durante a exposição. Os resultados indicaram que o Cd foi bioacumulado nas algas e que houve prejuízos no conteúdo de clorofila “a” e no crescimento populacional nas concentrações mais elevadas do metal. Os parâmetros danificados são importantes, pois ameaçam sistematicamente o equilíbrio da estrutura dos ambientes de água doce frequentemente afetados pela presença do cádmio, uma vez que o fitoplâncton suporta os níveis tróficos superiores.

Palavras-chave: água, cadeia alimentar, ecotoxicidade, metal, microalga.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da concentração dos poluentes nos ambientes aquáticos é preocupante do ponto de vista ecotoxicológico (PERALES-VELA et al., 2007; ZBIGNIEW et al., 2007; BERE e TUNDISI, 2011). O cádmio é um metal que contribui para a poluição dos ecossistemas aquáticos devido ao seu uso difundido em processos industriais, fertilizantes químicos, galvanoplastia, entre outros (TERRY e STONE, 2002; ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006; ZHOU et al., 2006). Esse elemento não possui função biológica conhecida aos organismos vivos e apresenta características de alta solubilidade em água, o que determina sua ampla distribuição, capacidade de acumulação nos tecidos e elevada toxicidade em vários níveis de organização trófica (ZHOU et al., 2006; BAUMANN et al., 2009).

Nos ambientes aquáticos o Cd pode ser absorvido ou adsorvido por espécies fitoplanctônicas. A superfície das algas contém numerosos grupos funcionais com alta afinidade por íons metálicos e uma carga negativa, devido aos ácidos carboxílicos e grupos fosfatados (TWISS et al., 2001). As interações entre microalgas e íons metálicos envolvem a adsorção passiva do metal na superfície da alga e absorção ativa intracelular (TWISS et al., 2001, BATLEY et al., 2004). Embora pouco seja conhecido sobre o modo de ação do Cd, devido à sua alta afinidade por grupos sulfidríla, este metal é considerado um bloqueador de grupos funcionais essenciais nas biomoléculas, o que resulta na inibição de vários processos metabólicos nas células (ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006). A toxicidade pode também estar relacionada ao estresse oxidativo induzido tanto pelo aumento da concentração de espécies reativas ao oxigênio ou pela redução da capacidade oxidante da célula. Em produtores primários esses efeitos podem resultar na inibição da produção de clorofila, fotossíntese e crescimento populacional (BAUMANN et al., 2009).

O Cd é um metal poluente amplamente estudado devido à sua alta toxicidade. No entanto, os mecanismos que norteiam a toxicidade desse elemento são variáveis dependendo da espécie exposta e, segundo alguns autores não são bem entendidos (TERRY e STONE, 2002; ZBIGNIEW e WOJCIECH, 2006; PERALES-VELA et al., 2007). Nos estudos ecotoxicológicos, ainda é questionado se o Cd pode ter alguma função nutritiva sobre organismos fitoplanctônicos ou não. Sabe-se que esse metal foi utilizado como nutriente substituindo o Zn em algumas diatomáceas marinhas (PRINCE e MOREL, 1990). Espécies do gênero *Scenedesmus* são encontradas em todos os tipos de ambiente inclusive em águas poluídas por metais. A espécie *Scenedesmus quadricauda* é conhecida por formar pequenos cenóbios com número variável de células dependendo das condições ambientais e do estado

fisiológico (LOMBARDI et al., 2007). O conhecimento dos efeitos do Cd sobre esta e outras espécies comuns, bem como a possibilidade de essencialidade deste metal é importante para o entendimento da dinâmica desse elemento nos ecossistemas e sua relação com a biota. Sabe-se que a legislação brasileira atual permite concentrações de Cd entre 0,001 e 0,01 mg L⁻¹ ($8,9 \times 10^{-9}$ e $8,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) em águas de classe I, II e III indicadas, entre outras funções, na preservação de organismos aquáticos (CONAMA, 2005). Danos sobre o crescimento populacional, parâmetros fotossintéticos, morfologia das células e biomassa refletem diretamente no planejamento de estratégias que visam à proteção desses ambientes (PEÑA-CASTRO et al., 2004; HUANG et al., 2009; BERE e TUNDISI, 2011).

De modo geral, os metais exercem significativo efeito tóxico sobre parâmetros fisiológicos das microalgas (PERALES-VELA et al., 2007; ZBIGNIEW et al., 2007). A produtividade primária e, conseqüentemente, dos níveis tróficos superiores das cadeias alimentares sofrem as conseqüências dos efeitos dos metais sobre as microalgas (BAUMANN et al., 2009; BERE e TUNDISI, 2011). Alterações nos parâmetros populacionais do fitoplâncton assim como na composição química das células podem afetar o equilíbrio e dinâmica dos ecossistemas aquáticos (ZHOU et al., 2006; LOMBARDI et al., 2007; HUANG et al., 2009). Por isso, o entendimento do comportamento do Cd no primeiro nível trófico, assim como a interação com níveis posteriores, contribui para o conhecimento e compreensão de processos ambientais tais como acumulação, transferência trófica e efeitos do metal nos ecossistemas.

Este estudo investigou os efeitos da exposição ao cádmio sobre *Scenedesmus quadricauda*. As concentrações de metal total dissolvido e particulado foram determinadas nos cultivos, assim como o conteúdo de clorofila, crescimento, alterações nos cenóbios e biomassa seca da microalga. A especiação do Cd foi obtida através de simulação numérica usando-se o modelo de equilíbrio químico MINEQL⁺ 4.62.3.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivos da alga *Scenedesmus quadricauda*

A microalga *Scenedesmus quadricauda* foi obtida do Centro Canadense de Cultivo de Microrganismos (University of British Columbia, Departamento de Botânica, Canadá) e mantida no Laboratório de Plâncton da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Apesar da cepa usada não ser nativa, a espécie é cosmopolita e encontrada em

vários ecossistemas aquáticos do Brasil. Cultivos-estoque das algas foram preparados em meio *Oligo* (AFNOR, 1980) utilizando-se água ultra-pura (Barnstead Easypure Rodi, USA), com pH ajustado para faixa entre 6,8 e 7,2 através de HNO₃ ou NaOH 0,1 mol L⁻¹. O meio *Oligo* foi escolhido pois fornecia às exigências nutricionais para crescimento de algas verdes (AFNOR, 1980; ABNT, 2005). O meio de cultivo foi autoclavado durante 20 min em temperatura de 121 °C, em Erlenmeyers de 2000 mL de capacidade contendo 1000 mL de meio. Após 24 h da autoclavagem, o meio foi inoculado com as células de *S. quadricauda* em fase exponencial de crescimento tendo uma concentração inicial nas novas culturas de 10⁵ células mL⁻¹ de sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar (Pachane, Brasil). A cultura foi mantida sob condições ambientais controladas com 100 µE m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa, fotoperíodo de 16:8 h (claro:escuro) em temperatura de 22±1 °C (ABNT, 2005). O crescimento dos cultivos foi acompanhado a cada 48 h através da contagem do número de células em hemocítômetro (Fuchs-Rosenthal espelhada) sob microscópio óptico (Leica DMLS), desde o dia da inoculação até o final da fase de crescimento exponencial.

2.2. Exposição ao cádmio

A exposição de *S. quadricauda* ao Cd foi realizada com três réplicas em frascos de policarbonato com 1000 mL de capacidade contendo 500 mL do meio de cultivo. Os frascos foram inoculados com células de *S. quadricauda* oriundas de cultura em fase exponencial de crescimento em concentração inicial de 10⁴ células mL⁻¹ e, portanto, 10⁴ células por mL foram expostas ao metal. Quando a população de *S. quadricauda* atingiu a fase exponencial de crescimento, as células foram expostas ao metal Cd por 96 h. As concentrações nominais de Cd usadas foram 10⁻⁷; 3x10⁻⁷; 6x10⁻⁷; 10⁻⁶ e 10⁻⁵ mol L⁻¹ (0,01; 0,03; 0,07; 0,11 e 1,12 mg L⁻¹). Essas concentrações foram escolhidas a partir de testes preliminares de exposição ao Cd em relação ao efeito sobre o crescimento celular, e ainda por se tratar de concentrações mais próximas das encontradas em ambientes naturais. O controle consistiu no cultivo da alga sem adição do metal. As condições das culturas experimentais foram as mesmas utilizadas nos cultivos estoque (intensidade luminosa, fotoperíodo e temperatura) e pH ajustado para 6,8-7,2.

As soluções de cádmio foram preparadas a partir de solução estoque na concentração de 8,9x10⁻³ mol L⁻¹ (Titrisol, Merck, Alemanha) utilizando-se água ultra-pura. O monitoramento das culturas foi realizado a cada 24 h através de contagem do número de células em hemocítômetro (Fuchs-Rosenthal espelhada) sob microscópio óptico (Leica

DMLS). Durante as 96 h de exposição ao Cd foram monitoradas as variáveis de concentração de clorofila “a”, crescimento populacional, número de células por cenóbio e biomassa seca.

Os materiais utilizados no cultivo das algas e nos experimentos de exposição ao Cd foram previamente lavados com detergente neutro, deixados em solução de HCl 10% por sete dias, enxaguados abundantemente em água destilada e autoclavados por 20 minutos a 121°C (ABNT, 2005; APHA, 1995).

2.3. Análise do metal

A concentração de Cd total dissolvido foi determinada no início da exposição das algas ao Cd (0 h). Para isso, 14 mL de amostras das culturas foram filtradas à vácuo em filtros de membrana de acetato de celulose com 0,2 µm de diâmetro de poro (Sartorius, Alemanha) previamente lavados com HNO₃ 1 mol L⁻¹ (24 h) e enxaguados com água ultra-pura. Os filtrados foram acidificados com HNO₃ ultra-puro (J.T. Baker) em concentração final de 0,1 mol L⁻¹, de acordo com os procedimentos descritos em Lombardi et al. (2002). As concentrações de íons Cd livre (Cd²⁺) nos cultivos foram calculadas através do modelo de equilíbrio químico MINEQL⁺ versão 4.62.3. Este software forneceu as informações sobre a especiação do Cd nos meios experimentais, levando em consideração variáveis como pH e concentrações do metal.

O Cd total acumulado nas células de *S. quadricauda* foi determinado ao final das 96 h de exposição seguindo os procedimentos descritos em Lombardi et al. (2002). Dez mililitros de amostras dos cultivos, contendo número de células conhecido, foram filtradas em filtros de membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Sartorius, Alemanha) previamente lavados em HNO₃ 1 mol L⁻¹ e com massa seca inicial conhecida. Os filtros, contendo a biomassa algal, foram secos a 60 °C em estufa durante 48 h, resfriados em dessecador e pesados novamente para estimativa do peso seco final. A determinação do Cd foi realizada após digestão ácida dos filtros obtida pela adição de HNO₃:HCl (3:1 – água régia) com ácido ultra-puro (J.T. Baker). A digestão ácida foi realizada em tubos de Teflon[®] em temperatura ambiente durante 72 h. A concentração de Cd nas algas foi considerada como a concentração total de metal acumulado e é reportada em g Cd célula⁻¹ e g Cd g PS⁻¹.

Branco de procedimentos foram feitos para a fração dissolvida e particulada do metal. Para a dissolvida, amostras do meio de cultura *Oligo* sem algas foram usadas e a determinação de Cd seguiu o mesmo procedimento que as amostras. Para Cd particulado foram usados três filtros de membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro (Sartorius, Alemanha)

previamente lavados com HNO_3 1 mol L^{-1} . Esses filtros foram digeridos e analisados da mesma maneira que as amostras e os resultados foram considerados os brancos do material particulado. As frações de Cd total dissolvido e particulado foram determinadas através de espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS, Varian AA220, Austrália).

2.4. Concentração de clorofila “a”

As determinações do conteúdo de clorofila “a” foram realizadas a cada 24 h em amostras de 10 mL filtradas em filtros de éster de celulose com 0,45 μm de poro (Millipore, Brasil). O procedimento para a extração e determinação da concentração de clorofila “a” encontra-se descrito em Shoaf e Lium (1976) seguindo-se a fórmula descrita abaixo.

$$[\text{Clorofila "a"}] = [11,47 \times (\Delta 664\text{nm}) - 0,40 \times (\Delta 630\text{nm})] \times \frac{X}{Y}$$

Onde.: X = volume do solvente utilizado (Dimetilsulfóxido - DMSO).

Y = volume da amostra filtrada.

Como parâmetro de toxicidade, a concentração efetiva média ($\text{CE}_{50-96\text{h}}$) foi calculada considerando as concentrações de Cd total dissolvido em relação à resposta de inibição da concentração de clorofila “a” comparado o grupo controle. A $\text{CE}_{50-96\text{h}}$ foi calculada a partir do programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON, 1977).

2.5. Crescimento populacional e número de células por cenóbio

O crescimento populacional foi estimado através de contagem de células (lâminas de Fuchs-Rosenthal espelhada) ao microscópio óptico (Leica DMLS) em amostragens realizadas a cada 24 h. As amostras foram preservadas com solução de lugol acético.

A ocorrência de formas unicelulares ou cenóbios com diferente número de células, sempre comparados ao controle, foi obtida através de contagens em lâminas de Fuchs-Rosenthal sob microscópio óptico (Leica DMLS). Cada amostra foi contada seis vezes,

e o número médio de células por cenóbios foi estimado. As contagens foram feitas com amostras coletadas a cada 24 h durante as 96 h de exposição.

Como parâmetro de toxicidade, a concentração efetiva média (CE_{50-96h}) foi calculada considerando as concentrações de Cd total dissolvido em relação à resposta de inibição do número de células por mililitro comparado o grupo controle. A CE_{50-96h} foi calculada a partir do programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON, 1977).

2.6. Biomassa seca

A biomassa seca das células algais foi avaliada no início e final do período experimental de exposição ao Cd (0 e 96 h). Dez mililitros de amostras dos cultivos foram filtrados em filtros de membrana de acetato de celulose com 0,45 μm de diâmetro de poro (Sartorius, Alemanha). Os filtros haviam sido previamente secos em estufa a 60 °C (FANEM/Orion 515, Brasil) durante 24 h, resfriados em dessecador por 30 min, e seu peso seco inicial determinado através de balança microanalítica com legibilidade de 1 μg (Sartorius MC21S). Após a filtração das amostras, os filtros foram encaminhados novamente para secagem em estufa a 60 °C durante 48 h, resfriados em dessecador por 30 min e, em seguida, o peso seco final foi determinado em balança microanalítica. A diferença entre os pesos final e inicial forneceu os valores das biomassas secas das células algais em relação ao volume da amostra filtrada.

2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade (*Teste de Shapiro-Wilk*). Quando apresentaram distribuição normal os resultados foram testados quanto à homogeneidade da variância (*Teste de Levene*). Em seguida os resultados foram analisados através de One-way ANOVA para o *Teste de Tukey* com 95% de confiança, a fim de se detectar diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com o metal. A análise estatística foi realizada através do software Paleontological Statistics (*Past*) versão 2.08.

3. RESULTADOS

3.1. Análise do metal

As determinações das concentrações de Cd nominal adicionadas, Cd total dissolvido e particulado obtidas ao início e final do período experimental são apresentadas na Tabela 1. Observa-se que os valores usados encontram-se próximos da faixa de concentrações permitida pela legislação brasileira para ambientes de água doce de classe I, II e III ($8,9 \times 10^{-9}$ a $8,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ou 0,001 a 0,01 mg L^{-1}) (CONAMA, 2005). O resultado da modelagem de equilíbrio químico usado para o cálculo da concentração de íons Cd livre mostrou que a maior parte do Cd^{2+} adicionado ($\sim 95\%$), encontrava-se na forma livre, não complexado, portanto, disponível para ser incorporado (adsorvido/absorvido) pelas células algais.

Tabela 1. Médias \pm Desvio padrão das concentrações de Cd nominal adicionadas, total dissolvido (inicial) e total particulado (final) em *S. quadricauda* após 96 h exposição.

Concentrações nominais Cd (mol L ⁻¹)	Cd total dissolvido 0 h		Cd Particulado 96 h	
	(mol L ⁻¹)	(mol L ⁻¹)	(g Cd célula ⁻¹)	(g Cd g PS ⁻¹)
Controle	< LD*	< LD*	< LD*	< LD*
1x10 ⁻⁷	< LD*	< LD*	3,8x10 ⁻¹⁴ \pm 0,1x10 ⁻¹⁴	1,6x10 ⁻⁴ \pm 0,1x10 ⁻⁴
3x10 ⁻⁷	3,2x10 ⁻⁸ \pm 0,7x10 ⁻⁸	3,2x10 ⁻⁸ \pm 0,7x10 ⁻⁸	1,8x10 ⁻¹³ \pm 1,0x10 ⁻¹⁴	3,5x10 ⁻⁴ \pm 0,9x10 ⁻⁴
6x10 ⁻⁷	6,7x10 ⁻⁸ \pm 1,8x10 ⁻⁸	6,7x10 ⁻⁸ \pm 1,8x10 ⁻⁸	4,0x10 ⁻¹³ \pm 3,8x10 ⁻¹⁴	7,2x10 ⁻⁴ \pm 0,2x10 ⁻⁴
1x10 ⁻⁶	1,6x10 ⁻⁷ \pm 2,3x10 ⁻⁸	1,6x10 ⁻⁷ \pm 2,3x10 ⁻⁸	4,4x10 ⁻¹³ \pm 6,4x10 ⁻¹⁴	1,1x10 ⁻³ \pm 0,5x10 ⁻⁴
1x10 ⁻⁵	1,3x10 ⁻⁶ \pm 1,5x10 ⁻⁷	1,3x10 ⁻⁶ \pm 1,5x10 ⁻⁷	5,9x10 ⁻¹² \pm 1,6x10 ⁻¹²	1,4x10 ⁻² \pm 0,5x10 ⁻³

* < LD indica abaixo do limite de detecção. LD = 1,6x10⁻⁹ mol L⁻¹.

3.2. Concentração de clorofila “a”

A quantificação das concentrações de clorofila “a” obtida para as algas expostas ao Cd durante o período de 96 h está mostrada na Tabela 2 e Figura 1(A e B). A maior concentração de clorofila “a” foi obtida no controle, sendo todas as outras menores e, em geral, tanto menor quanto maior a concentração de Cd adicionada ($p < 0,05$) (Figura 1A). A Figura 1B mostra os resultados para as concentrações de clorofila “a” após as 96 h de exposição em relação à porcentagem de inibição da clorofila “a”. Observa-se que houve uma inibição significativa da concentração de clorofila de acordo com o aumento das concentrações de Cd.

A concentração que causou efeito em 50% da população sobre a inibição da concentração de clorofila “a” após 96 h de exposição ao Cd (CE_{50-96h}) foi 3,8x10⁻⁸ mol L⁻¹.

Tabela 2. Média \pm desvio padrão da concentração de clorofila “a” (mg L^{-1}) durante as 96 h de exposição ao Cd.

Cd dissolvido (mol L^{-1})	Concentração de clorofila “a” (mg L^{-1})				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	$0,41 \pm 0,075$	$0,59 \pm 0,076$	$0,52 \pm 0,076$	$0,55 \pm 0,061$	$0,64 \pm 0,080$
< LD	$0,43 \pm 0,032$	$0,50 \pm 0,053$	$0,38 \pm 0,016$	$0,37 \pm 0,015^*$	$0,37 \pm 0,029^*$
$3,2 \times 10^{-8}$	$0,04 \pm 0,013$	$0,18 \pm 0,013^*$	$0,21 \pm 0,056^*$	$0,28 \pm 0,067^*$	$0,34 \pm 0,017^*$
$6,7 \times 10^{-8}$	$0,06 \pm 0,003$	$0,35 \pm 0,072^*$	$0,12 \pm 0,027^*$	$0,17 \pm 0,032^*$	$0,25 \pm 0,038^*$
$1,6 \times 10^{-7}$	$0,17 \pm 0,040$	$0,27 \pm 0,140^*$	$0,14 \pm 0,032^*$	$0,18 \pm 0,005^*$	$0,10 \pm 0,028^*$
$1,3 \times 10^{-6}$	$0,16 \pm 0,045$	$0,18 \pm 0,037^*$	$0,13 \pm 0,020^*$	$0,12 \pm 0,026^*$	$0,03 \pm 0,006^*$

* Indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$ na mesma coluna); < LD indica que o valor ficou abaixo do limite de detecção. LD = $1,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3. Crescimento populacional e número de células por cenóbio

O número de células de *S. quadricauda* por mililitro de cultura após as 96 h de exposição ao metal está representado na Figura 2A. Da mesma forma que para a concentração de clorofila “a”, houve diminuição significativa ($p < 0,05$) do crescimento populacional das algas em função do aumento das concentrações de Cd no meio de cultivo. A Figura 2B representa as porcentagens de inibição do número de células por mililitro em função ao aumento das concentrações de Cd total dissolvido (mol L^{-1}) nos meios de cultivo de *S. quadricauda*.

A concentração que causou efeito em 50% da população sobre a inibição do número de células após 96 h de exposição ao Cd ($\text{CE}_{50-96\text{h}}$) foi $6,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

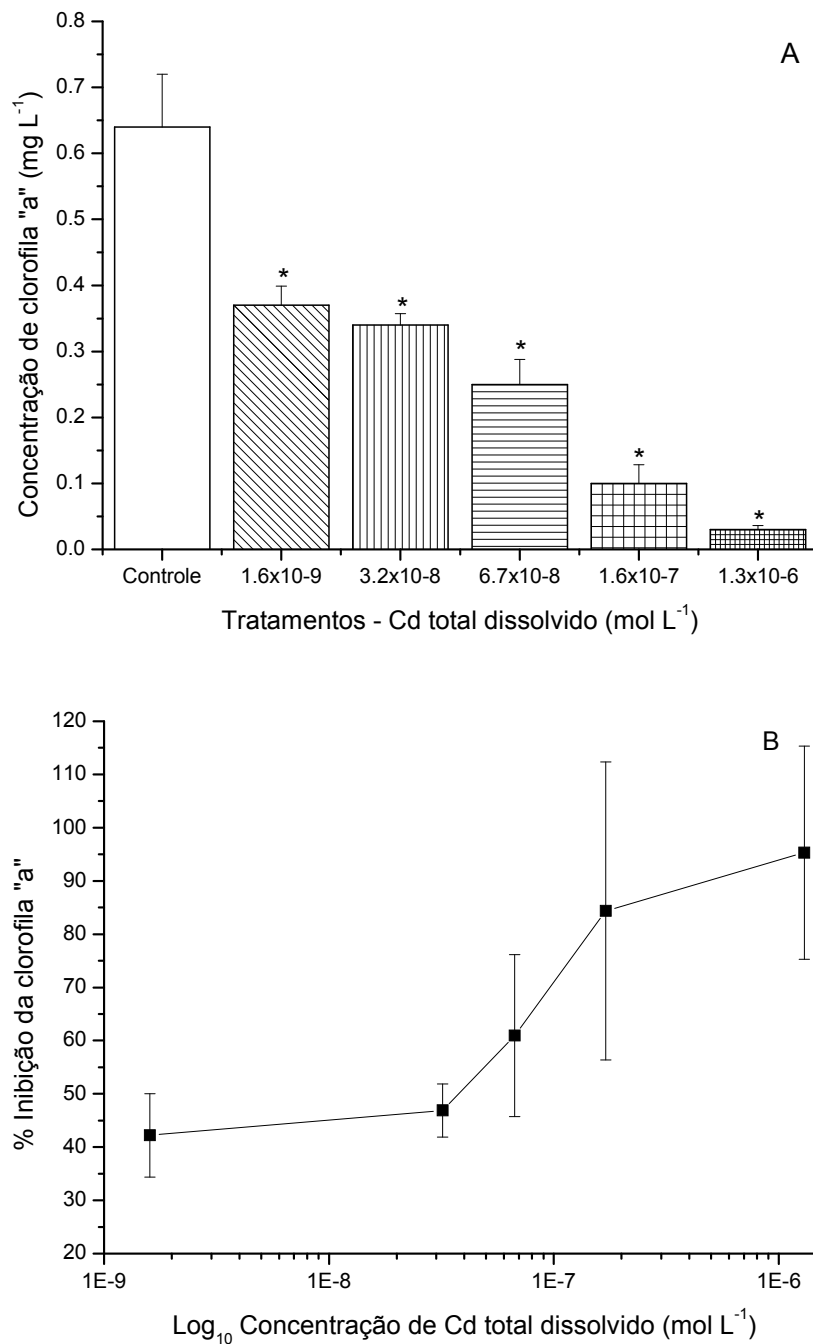


Figura 1. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como concentração de clorofila "a" (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total dissolvido (A) e porcentagem de inibição da clorofila "a" (B) em relação ao controle, após 96 h de exposição. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle. LD = $1,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

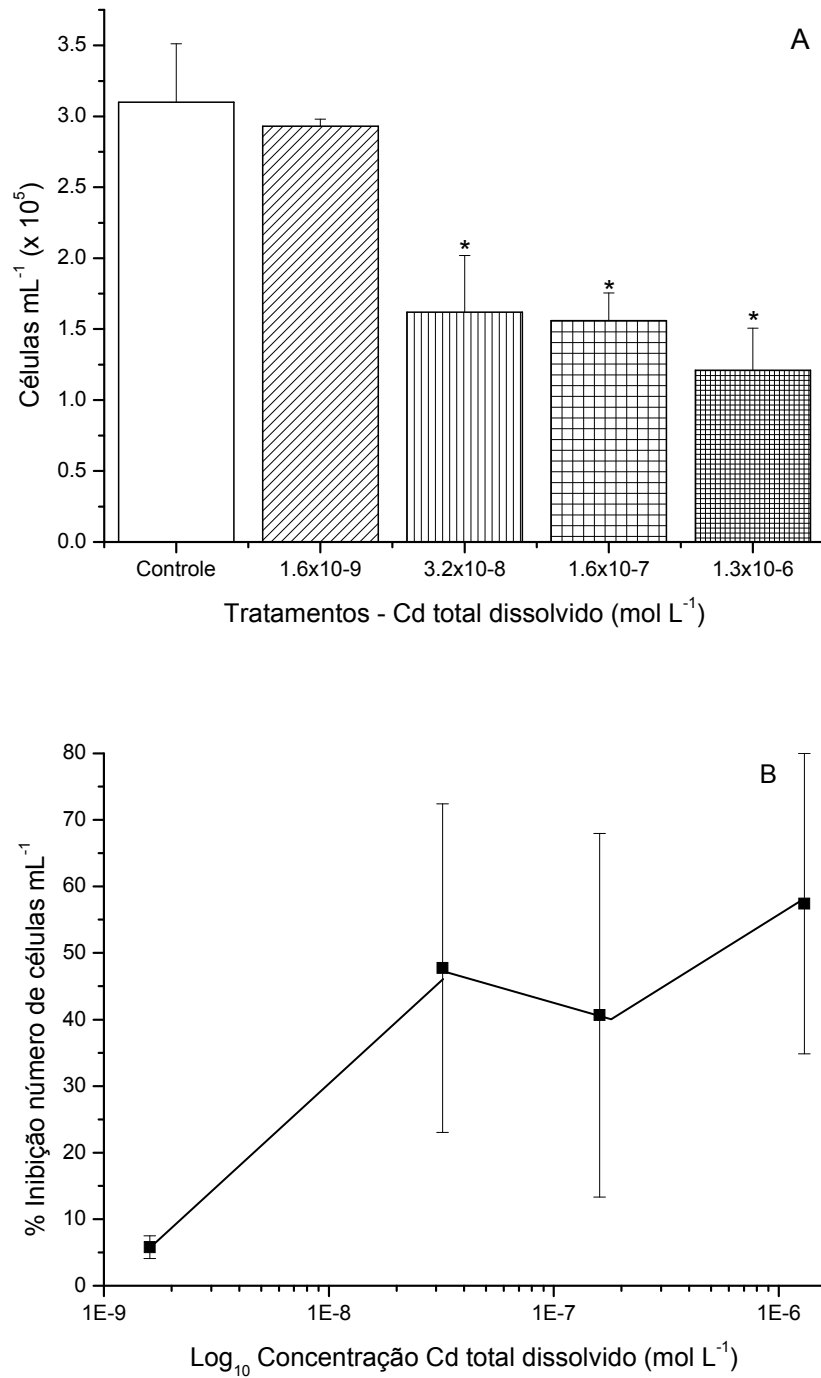


Figura 2. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como número de células por mililitro (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total dissolvido (A) e porcentagem de inibição do crescimento populacional (B) em relação ao controle, após 96 h de exposição. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle. LD = $1,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

O número de células por cenóbio de *S. quadricauda* em função da concentração de Cd acumulado nas células está apresentado na Figura 3. Normalmente *S. quadricauda* apresenta cenóbios com 4 células em culturas sob condições saudáveis, em fase exponencial de crescimento. Após a exposição ao Cd, não foi detectada uma influência sistemática desse metal no número de células por cenóbio, havendo sempre predominância de cenóbios com quatro células e, raramente foram observadas células livres, sem a formação de cenóbios, ou cenóbios menores.

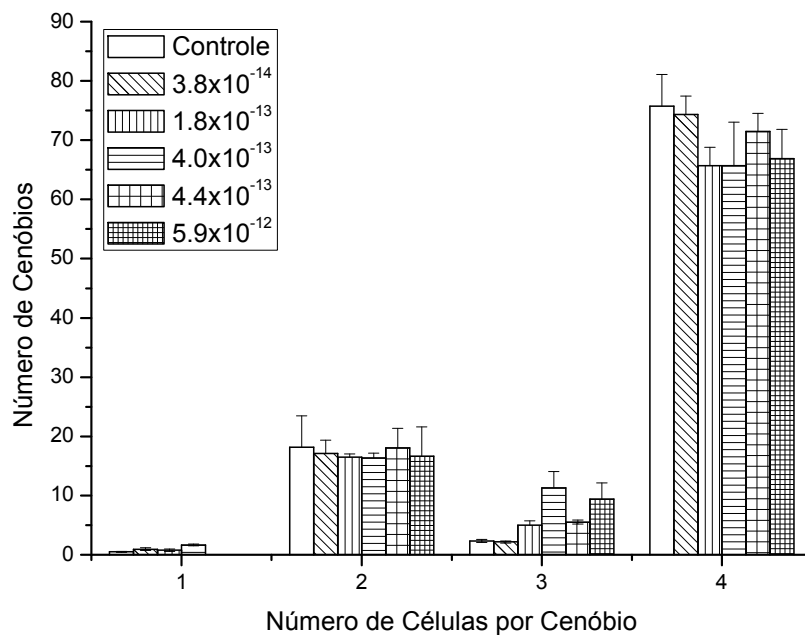


Figura 3. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como tamanho dos cenóbios (média \pm desvio padrão) em relação ao número de células por cenóbio após 96 h de exposição.

3.4. Biomassa seca

A cultura exposta à concentração de $1,6 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de Cd total dissolvido, que resultou em acúmulo de $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹, apresentou biomassa seca significativamente inferior ao controle ($p < 0,05$), mas para as demais concentrações avaliadas não foi obtido algum efeito sobre a biomassa seca (Figura 4).

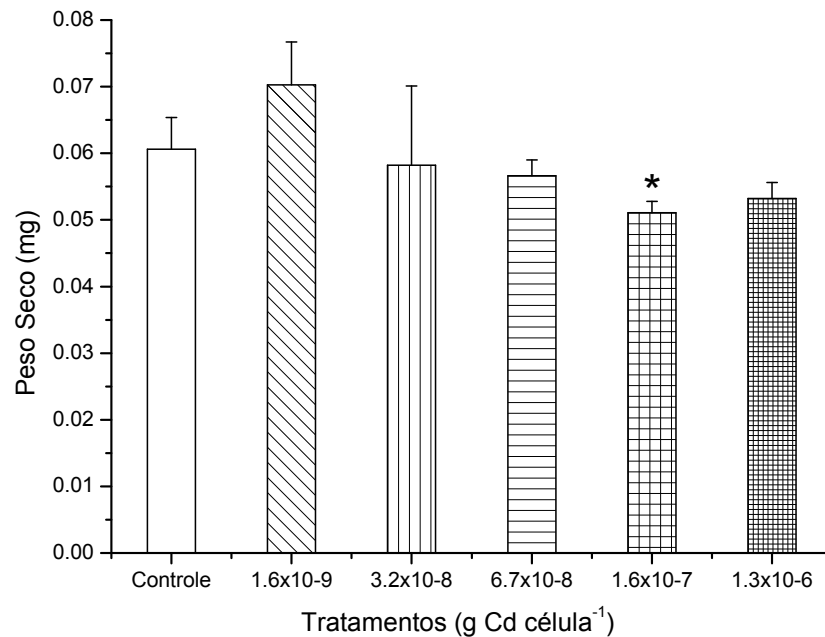


Figura 4. Toxicidade do Cd em *Scenedesmus quadricauda* reportada como biomassa seca (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total dissolvido após 96 h de exposição.

4. DISCUSSÃO

As concentrações de Cd usadas nos experimentos, ainda que abaixo das permitidas pela legislação brasileira, afetaram a síntese de clorofila “a”, densidade populacional quantificada através do número de células por mililitro de cultura e biomassa seca de *S. quadricauda*. A concentração de íons Cd²⁺ livre nos meios experimentais foi calculada e foram obtidos valores próximos de 95%. Por esse motivo, basearemos nossa discussão nos valores de Cd total dissolvido quantificado. Sabe-se que em ambientes aquáticos, o Cd apresenta tendência de permanecer na forma iônica, sendo por isso pouco complexado tanto com materiais inorgânicos como orgânicos, quer em ambientes de água doce como marinho (SLAUENWHITE e WANGERSKY, 1991; BATLEY et al., 2004; ZHOU et al., 2006). Esse comportamento é confirmado pelos nossos resultados, onde a maior parte do metal dissolvido permaneceu na forma iônica e disponível para as células. O acúmulo do metal por *S. quadricauda* é apresentado na tabela 1, mostrando que quanto maior foi a concentração de Cd usada, maior foi o acúmulo do metal nas células. Este resultado está de acordo com outros estudos, que também mostram a bioacumulação do Cd por espécies

fitoplanctônicas (TERRY e STONE 2002; ZBIGNIEW e WOJCIECH 2006; ZHOU et al., 2006; BAUMANN et al., 2009).

O efeito do Cd sobre o conteúdo de clorofila “a” foi significativo durante todo o período experimental, sendo que quanto maior foi o tempo de exposição, maior foi a quantidade acumulada pelas células; e ainda, o máximo foi obtido após as 96 h de exposição. Estes resultados estão de acordo com outros da literatura, que demonstraram o efeito inibidor desse metal sobre o conteúdo de clorofila “a” (LEBORANS e NOVILLO 1996; PRASSAD et al., 1998; PEÑA-CASTRO et al., 2004; ZHOU et al., 2006; ZBIGNIEW et al., 2007; BAUMANN et al., 2009). Segundo Küpper et al. (1996) e Baumann et al. (2009) alguns metais, tais como Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} podem substituir o átomo central de Mg^{2+} na molécula de clorofila, o que reduz o rendimento da fotossíntese, inibindo assim o crescimento populacional e a própria síntese de clorofila. Analisando os efeitos do Cd na fotossíntese de células algais, Zhou et al. (2006) observou que o Cd pode alterar a atividade do fotossistema II, o que já é suficiente para inibir o aumento populacional segundo Lombardi e Maldonado (2011). De acordo com Zbigniew et al. (2007) o Cd pode agir sobre o sistema de transferência de elétrons do fotossistema II para os centros de reações afetando diretamente o rendimento fotossintético.

A inibição do conteúdo de clorofila “a” devido à presença do Cd nos cultivos foi sentida pelas algas logo nas menores concentrações de exposição, resultando em uma concentração efetiva inibitória a 50% da população (CE_{50}) de $3,8 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} de Cd total dissolvido. Esse resultado comprova que mesmo em concentrações relativamente baixas de Cd pode haver a interferência sobre o sistema fotossintético de *S. quadricauda*, já que atua de modo tão significativo sobre a concentração do principal pigmento fotossintético, a clorofila “a”. Considerando que a legislação brasileira aceita concentrações de Cd em ecossistemas aquáticos entre $8,9 \times 10^{-9}$ e $8,9 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} (0,001 e 0,01 mg L^{-1}), ou seja, próximos do valor de CE_{50-96h} obtido nesta pesquisa chama-se a atenção para a possibilidade de prejuízos à espécie fitoplanctônica aqui estudada e também de outras que possam estar em risco. Em uma simples extrapolação de concentração e toxicidade, a concentração máxima permitida pelo CONAMA (2005), e.g., $8,9 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} , em águas de classe III, poderia ocasionar o extermínio de mais de 50% da população.

Os efeitos observados poderiam ser caracterizados provavelmente como uma inibição em cadeia, afetando primeiramente a concentração de clorofila “a”, seguido pelo crescimento populacional de *S. quadricauda* também prejudicado pela exposição ao Cd. Sabe-se que, antes de ser detectável através da divisão celular (crescimento populacional), os

efeitos tóxicos de cátions metálicos podem atingir a síntese de moléculas específicas ou induzir alterações morfológicas (LOMBARDI et al., 2007; LOMBARDI e MALDONADO, 2011).

Os resultados obtidos nesta pesquisa em relação ao efeito inibitório do Cd sobre a microalga estão de acordo com outros estudos que comprovam efeitos deste metal sobre o crescimento de organismos fitoplanctônicos. Zbigniew et al. (2007) mostrou que o Cd reduziu o crescimento de *Scenedesmus armatus* em mais de 50% após a exposição a uma concentração de $9,3 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Huang et al. (2009) demonstraram que concentrações de 2×10^{-5} e 4×10^{-5} mol L⁻¹ de Cd estimularam o crescimento de *Chlorella vulgaris*. Porém a concentração de 8×10^{-5} mol L⁻¹ teve significativo efeito inibitório. Da mesma forma, o crescimento de *Microcystis aeruginosa* não foi afetado por 5×10^{-7} mol L⁻¹ de Cd, mas foi significativamente reduzido por 4×10^{-6} mol L⁻¹ segundo os estudos de Zhou et al. (2006).

Esses dados da literatura indicam que o crescimento celular parece ser afetado pelo Cd de forma específica. Por isso alguns autores consideram que, em pequenas quantidades, há a possibilidade de essencialidade do Cd, como demonstrado em algumas espécies de diatomáceas marinhas (PRINCE e MOREL, 1990). Em nosso estudo os efeitos sistemáticos do Cd foram observados em concentrações mais baixas do que os outros que encontramos na literatura e com os quais comparamos nossos resultados, evidenciando que pode haver diferentes estratégias de defesa diante da exposição ao Cd nas diversas microalgas e, por isso, as diferenças observadas na literatura em relação às concentrações e aos efeitos sobre o crescimento e síntese de pigmentos fotossintéticos.

O parâmetro *biomassa seca* não se mostrou o mais adequado na predição dos efeitos causados pelo metal Cd. Em situações onde o crescimento celular e o conteúdo de clorofila “a” são afetados, esperava-se que ocorresse diminuição da biomassa celular, fato que não ficou claro nos nossos resultados. Isto pode ter ocorrido possivelmente em razão do volume filtrado não ter sido suficiente para determinação da biomassa seca. Sabe-se também que biomassa seca é variável de acordo com as condições fisiológicas da célula. É possível que a célula estressada pela presença do metal tenha sofrido alteração de outros processos metabólicos como, por exemplo, mudanças no conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídios e isso tenha prejudicado a resposta deste parâmetro (biomassa seca) (ZHOU et al., 2006; ZBIGNIEW et al., 2007; BAUMANN et al., 2009; LOMBARDI e MALDONADO, 2011).

Alterações no número de células por cenóbio não foram observadas como uma resposta sistemática à exposição ao Cd. Van den HOEK et al. (1995) caracterizam a formação de cenóbios com número de células diferente do padrão, para uma dada espécie, como

“plasticidade fenotípica”. Existem vários mecanismos que explicam a formação do cenóbio (PICKETT-HEAPS, 1975). Segundo esses autores, a clivagem de células no gênero *Scenedesmus* resultando na formação dos cenóbios, ocorre somente após a formação de dois, quatro ou oito protoplastos seguida pela produção dos respectivos núcleos dentro da célula parental, no entanto, o mecanismo envolvido na redução ou alteração do tamanho do cenóbio ainda não está bem esclarecido. Nosso estudo mostrou que o número de células por cenóbio variou dentro da espécie; com cenóbios variando de 1 a 4 células, predominando este último. No entanto, não foi obtida nenhuma relação significativa entre a concentração de Cd e o número de células por cenóbio.

De acordo com Peña-Castro et al. (2004) a presença de metais diminui a disponibilidade de energia para microalgas através de danos fotossintéticos e pela produção de radicais livres, podendo diminuir o número de células por cenóbio. Em oposição aos nossos resultados, esses autores obtiveram efeitos sobre o tamanho dos cenóbios em *Scenedesmus incrassatulus* exposta ao Cd, sendo o número de células afetado a partir de $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de Cd. Ressalta-se que essa concentração é cerca de 100 vezes maior do que a concentração mais alta testada em nossa pesquisa. As respostas obtidas em nosso estudo, em relação ao tamanho do cenóbio, diferiram dos apresentados na literatura, no entanto, as concentrações aqui utilizadas foram menores e, por isso, mais próximas das concentrações encontradas em ambientes aquáticos naturais. A concentração de $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ testada por Peña-Castro et al. (2004) poderia não apenas induzir a plasticidade fenotípica como também causar a destruição das células. Da mesma forma, Lombardi et al. (2007) observaram efeitos morfológicos marcados pela troca de cenóbios maiores por cenóbios menores em *Scenedesmus acuminatus* exposta a concentrações de Cu²⁺ de 3×10^{-10} mol L⁻¹.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que houve bioacumulação do metal cádmio nas células da microalga *Scenedesmus quadricauda*. A presença do Cd causou alterações significativas sobre o conteúdo de clorofila “a” e crescimento populacional da espécie avaliada. O número de células por cenóbio e biomassa seca não apresentaram respostas relacionadas à presença do Cd nos cultivos. *S. quadricauda* mostrou-se sensível ao Cd, que foi inibitório para 50% da população (CE50) em $3,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Os resultados obtidos nesta pesquisa refletem também na necessidade do questinamento da legislação brasileira atual, a

qual permite concentrações de Cd que podem ser tóxicas a esta espécie e, provavelmente, a outras espécies fitoplanctônicas. Os parâmetros afetados pelo Cd em *Scenedesmus quadricauda* são importantes do ponto de vista ecotoxicológico, pois ameaçam sistematicamente o equilíbrio da estrutura dos ambientes de água doce frequentemente afetados pela presença desse metal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR12648:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2005. 24 p.

ASSOCIATION FRANÇAISE NORMALISATION (AFNOR). **Norme expérimentale. T90-304.** Essais de seuil Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance, Paris, France, 1980.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER CONTROL FEDERATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19 ed. New York, 1995.

AWASHI, M.; RAÍ, C.L. Toxicity of nickel, zinc and cadmium to nitrate uptake in free and immobilized cells of *Scenedesmus quadricauda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 268-272, 2005.

BATLEY, G.E.; APTE, S.C.; STAUBER, J.L. Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, p. 903-919, 2004.

BAUMANN, H.A.; MORRISON, L.; STENGEL, D. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1063-1075, 2009.

BERE, T.; TUNDISI, J.G. Toxicity and sorption kinetics of dissolved cadmium and chromium III on tropical freshwater phytoplankton in laboratory mesocosm experiments. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4772-4780, 2011.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimmed Spearman – Karber methodo for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.7, p. 714-719, 1977.

HUANG, Z. et al. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p.54-61, 2009.

KÜPPER, H.; KÜPPER, F.C.; SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, p. 259-266, 1996.

LEBORANS, G.F.; NOVILLO, A. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus*. **Water Resources**, v.30, p.57-62, 1996.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI, L.A. Muscilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

LOMBARDI, A.T. et al. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74-78, 2007.

LOMBARDI, A.T.; MALDONADO, M.T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaecocystys cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, p. 77-87, 2011.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress reseach: a case study with the green microal *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 64-69, 2003.

PEÑA-CASTRO, J.M. et al. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. **Chemosphere**, v. 57, p. 1629-1636, 2004.

PERALES-VELA, H.V. et al. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**, v. 67, p. 2274-2281, 2007.

PRASSAD, M.N. et al. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 306-311, 1998.

PRINCE, N.M.; MOREL, F.M.M. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. **Nature**, v. 344, p. 658-660.

SHOAF, W.T.; LIUM, B.W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethylsulfoxide. **Limnology and Oceanography**, v. 61, p. 926-928, 1976.

SLAUENWHITE, D.E.; WANGERSKY, P.J. Behaviour of copper and cadmium during a phytoplankton bloom: a mesocosm experiment. **Marine Chemistry**, v. 32, p. 37-50, 1991.

TERRY, P.A.; STONE, W. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. **Chemosphere**, v. 47, p. 249-255, 2002.

TWISS, M.R. et al. Coupling the use of the computer chemical speciation models and cultures techniques in laboratory investigations of trace metals toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 13, p. 9-24, 2001.

Van den HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. Algae, an introduction to phycology. Cambridge University Press, New York, 1995, 623 p.

ZBIGNIEW, T.; WOJCIECH, P. Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three *Scenedesmus* species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 323-331, 2006.

ZBIGNIEW, T. et al. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 291-299, 2007.

ZHOU, W.; JUNEAU, P.; QIU, B. Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. **Chemosphere**, v. 65, p. 1738-1746, 2006.

CAPÍTULO 2

EFEITOS DA TRANSFERÊNCIA TRÓFICA DE CÁDMIO E RECUPERAÇÃO NO CLADÓCERO

Simocephalus serrulatus

CAPÍTULO 2. Efeitos da transferência trófica de cádmio e recuperação no cladócero *Simocephalus serrulatus*

RESUMO

Nos ecossistemas aquáticos o alimento pode ser um veículo importante na transferência trófica de metais para o zooplâncton. Neste estudo foram avaliados os efeitos tóxicos do metal cádmio (Cd) para o cladócero *Simocephalus serrulatus* através da exposição via dieta usando a microalga *Scenedesmus quadricauda* como alimento contaminado. Parâmetros do ciclo de vida tais como tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade da primeira reprodução, intervalo na produção de ovos, tempo de geração, longevidade, taxas de fertilidade, taxas de alimentação, produção secundária e recuperação foram avaliados. Microalgas, em fase exponencial de crescimento, foram expostas durante 96 h a concentrações de Cd total dissolvido entre $1,6 \times 10^{-9}$ e $1,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Após 96 h, as concentrações de Cd total particulado nas algas foram $3,8 \times 10^{-14}$; $1,8 \times 10^{-13}$; $4,0 \times 10^{-13}$; $4,4 \times 10^{-13}$ e $5,9 \times 10^{-12}$ g Cd célula⁻¹. A biomassa algal contaminada com Cd foi utilizada como alimento aos cladóceros na concentração de 10^4 células mL⁻¹ dia⁻¹ durante todo o ciclo de vida. O controle consistiu de alimento sem exposição ao Cd. Houve aumento no tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade da primeira reprodução e tempo de geração dos organismos nas concentrações acima de $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. A longevidade dos organismos foi reduzida nas concentrações acima de $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. As taxas de alimentação e produção secundária individual diminuíram nas concentrações acima de $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. Os resultados indicam que houve transferência trófica do metal Cd do fito para o zooplâncton e que o metal acumulou-se nos tecidos dos cladóceros. Os organismos afetados apresentaram evidências de recuperação sobre padrões reprodutivos na ausência de contaminação.

Palavras-chave: bioacumulação, bionomia, fitoplâncton, metal, produção secundária, taxas de alimentação, zooplâncton.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de metais nos ambientes aquáticos causa preocupação em relação aos efeitos sobre os organismos e suas interações nesses ambientes. As consequências da exposição aos metais através da água são frequentemente descritas na literatura (CAÑIZARES-VILLANUEVA et al., 2000; BOSSUYT e JANSSEN, 2005; PESTANA et al., 2007). Porém, efeitos sobre a transferência de metais via fitoplâncton como fonte de contaminação ao zooplâncton são menos estudados, apesar da importância desse processo para o entendimento dos mecanismos de biomagnificação desses elementos nas cadeias alimentares (RODGHER et al., 2008).

Nos ambientes aquáticos, os organismos estão sujeitos a diferentes fontes e concentrações de poluentes. No caso dos metais, a exposição ocorre em baixas concentrações, pois eventos agudos são raros. Dados da literatura mostram que a exposição a baixas concentrações de metais por períodos prolongados pode causar prejuízos ao ciclo de vida, afetar a reprodução e outros parâmetros populacionais. Rodgher et al. (2009) verificaram que a exposição entre 3 e 68 fg de cobre (10^{-15} g) via alimento, durante o ciclo de vida do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, reduziu a produção de ovos, de neonatos, a sobrevivência e o tamanho do corpo dos organismos. Sofyan et al. (2007) descreveram efeitos sobre a sobrevivência, taxas de alimentação e reprodução de *Ceriodaphnia dubia* devido à exposição por sete dias ao alimento e água contaminados com Cd. Efeitos tóxicos foram também observados por Barata et al. (2002), considerando alimento e água como potenciais fontes para absorção do Cd sobre a sobrevivência e taxas de alimentação de *Daphnia magna*. Sabe-se que alterações na qualidade alimentar modificam a atividade alimentar dos consumidores primários podendo resultar em mudanças de parâmetros populacionais, tais como crescimento, reprodução e sobrevivência, os quais, são dependentes da entrada de energia proveniente da alimentação (CLÉMENT e ZAID, 2004). De acordo com Hook e Fisher (2002), a exposição ao alimento contaminado com $6,4 \times 10^{-8}$ mol Cd g⁻¹ peso seco reduziu a produção de ovos em cladóceros. Reinfelder et al. (1998) demonstraram que o Cd pode acumular-se nos tecidos dos organismos vivos, entretanto, a transferência deste elemento através das cadeias alimentares precisa ser esclarecida, assim como suas implicações sobre organismos de níveis tróficos superiores. Por essa razão, é necessário investigar o potencial para biomagnificação do Cd nas cadeias alimentares aquáticas e seus possíveis efeitos sobre os organismos.

O cádmio é usado para a produção de fertilizantes químicos, pigmentos, anticorrosivos, na indústria petroquímica e da galvanoplastia (RUANGSOMBOON e

WONGRAT, 2006). Devido à sua ampla utilização e potencial toxicidade, há necessidade de avaliações de seus efeitos sobre a biota, bem como a realização de estudos aprofundados sobre as consequências de sua contaminação nas cadeias alimentares aquáticas.

A utilização de organismos nativos em avaliações ecotoxicológicas é recomendada, pois tais organismos fornecem informações ecológicas relevantes e compatíveis com as condições ambientais locais, refletindo as características dos principais grupos de organismos encontrados (RODGHER et al., 2008). Além disso, os dafinídeos são internacionalmente aceitos e comumente usados em avaliações ecotoxicológicas. Eles apresentam facilidade de manejo em laboratório, ciclo de vida curto, elevada taxa de reprodução e sensibilidade a elementos tóxicos (KNOPS et al., 2001; ORCHARD et al., 2002; ABNT, 2005; De SCHAMPHELAERE et al., 2007). O cladócero dafinídeo *Simocephalus serrulatus*, usado nesta pesquisa, ocorre nas regiões sul e sudeste do Brasil (BARBOSA e MATSUMURA-TUNDISI, 1984).

O entendimento dos efeitos do Cd em diferentes níveis de organização biológica é importante nos estudos de ecotoxicologia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do Cd fornecido através do alimento para o cladócero *Simocephalus serrulatus*. Alguns efeitos tóxicos sobre o crescimento dos organismos podem refletir na transferência de energia para reprodução e alterar a dinâmica das populações. Esta informação é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas dos cladóceros à exposição via alimento, transferência trófica deste metal e principais danos causados pela exposição crônica. O potencial de toxicidade do alimento com Cd ao *S. serrulatus* levou em consideração uma sistemática avaliação dos parâmetros do ciclo de vida como tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade da primeira reprodução (primípara), intervalo na produção de ovos, tempo de geração (tempo de ovo a ovo), longevidade, taxas de fertilidade, taxas de alimentação, produção secundária e recuperação. Estes parâmetros ainda não haviam sido estudados nessa espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivos de *Simocephalus serrulatus* e *Scenedesmus quadricauda*

Cladóceros da espécie *S. serrulatus* foram coletados no reservatório do Lobo (Broa) localizado entre os municípios de Itirapina e Brotas (SP, Brasil). Os cladóceros foram

obtidos com auxílio de rede para coleta de zooplâncton com malha de 68 μm . Em laboratório, os organismos foram triados, identificados e transferidos para béqueres de vidro com capacidade para 2000 mL com água coletada do próprio reservatório. Após o período de adaptação às condições laboratoriais, os organismos passaram pelo processo de aclimação à água de manutenção de cultivo ou água reconstituída. A água reconstituída foi preparada com água destilada e adicionando-se 1500 mg L^{-1} $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 200 mg L^{-1} KCl ; 4800 mg L^{-1} NaHCO_3 e 6100 mg L^{-1} MgSO_4 . O pH foi ajustado para 7,2-7,6 usando-se 0,1 mol L^{-1} NaOH ou HNO_3 ; a condutividade foi de 160 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e a dureza entre 40-48 mg L^{-1} de CaCO_3 . O meio de cultivo dos cladóceros foi renovado parcialmente (50%) a cada sete dias. A cada 15 dias, novos lotes de organismos foram montados com 50 indivíduos com idade em torno de 24 h. Esse procedimento tinha por finalidade manter lotes de organismos com idades controladas. Os cultivos foram mantidos em câmaras incubadoras sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e fotoperíodo de 16:8 h (claro:escuro) (ABNT, 2005).

Linhagens da alga clorofícea *S. quadricauda* foram obtidas do Centro Canadense de Cultivo de Microrganismos (University of British Columbia, Departamento de Botânica, Canadá) e mantidas no Laboratório de Plâncton da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os cultivos-estoques da clorofícea foram mantidos em meio de cultura *Oligo* (AFNOR, 1980) com pH ajustado para faixa de 6,8-7,2 usando-se 0,1 mol L^{-1} NaOH ou HNO_3 . Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em frascos tipo Erlenmeyer contendo 1 L de meio, no qual eram inoculados cerca de 10^5 células mL^{-1} de algas em fase de crescimento exponencial. As culturas algais foram mantidas em condições controladas de intensidade luminosa ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fotoperíodo de 16:8 h (claro:escuro) e temperatura (22 ± 1 °C). Células de *S. quadricauda* em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf 5702R), ressuspensas em água reconstituída e usadas como alimento para os cladóceros, na quantidade diária de 10^4 células mL^{-1} (ABNT, 2005). As algas foram mantidas em geladeira a 4 °C durante o período experimental. Para alimentação dos cladóceros, as algas eram retiradas da geladeira e aclimatadas à temperatura do cultivo. Antes do fornecimento das algas, o cultivo foi ressuspensado com auxílio de uma pipeta de Pasteur com o objetivo de disponibilizar as células algais depositadas no fundo do recipiente como alimento aos cladóceros. Em seguida o alimento fresco foi adicionado.

2.2. Controle da sensibilidade para *Simocephalus serrulatus*

O controle da sensibilidade da espécie de cladóceros utilizada foi realizado a cada 15 dias durante o período experimental com a substância de referência NaCl (Cloreto de Sódio). O NaCl foi escolhido como substância de referência por atender aos critérios recomendados para sua utilização nesta finalidade e também por ser uma substância menos danosa ao meio ambiente. O teste de sensibilidade foi realizado com as seguintes concentrações de NaCl: controle; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g L⁻¹ com duração de 24 h. Os resultados foram expressos através de uma carta controle (Figura 1) e servem de referência para o acompanhamento das condições dos organismos cultivados no laboratório e utilizados nos experimentos. A concentração efetiva média CE_{50-24h} foi calculada através do programa Trimmed Sperman-Karber (HAMILTON et al., 1977). Foram realizados 10 testes de sensibilidade durante a fase experimental. A partir dos testes, a média para a CE_{50-24h} calculada para o NaCl foi de 0,71 g L⁻¹; o limite inferior foi de 0,50 e o limite superior foi de 1,06.

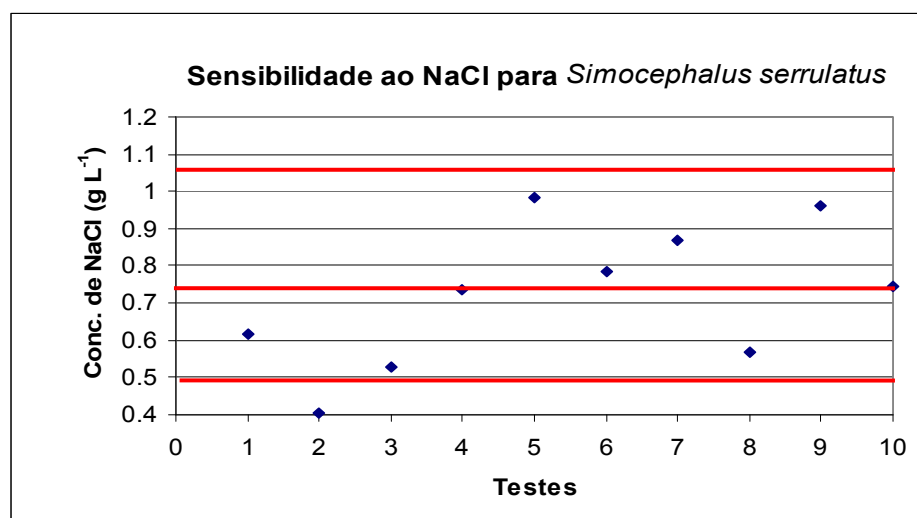


Figura 1. Carta controle da sensibilidade de *Simocephalus serrulatus* ao NaCl.

2.3. Exposição da alga ao cádmio

Células de *S. quadricauda* em fase exponencial de crescimento foram expostas por 96 h a cinco concentrações de cádmio total dissolvido: $1,6 \times 10^{-9}$; $3,2 \times 10^{-8}$; $6,7 \times 10^{-8}$; $1,6 \times 10^{-7}$ e $1,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ equivalente a 1,4; 3,6; 7,5; 17,4 e 146,0 µg L⁻¹. O controle consistiu de meio *Oligo* sem adição de cádmio. As culturas experimentais foram mantidas nas mesmas

condições controladas usadas para os cultivos-estoques (temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo). Os valores de pH nos meios foram ajustados para 6,8-7,2. As soluções-estoques de Cd^{2+} foram preparadas a partir de uma solução padrão de Cd em concentração de $8,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) (Titrisol, Merck, Alemanha) usando-se água ultra-pura (Barnstead Easypure Rodi, Estados Unidos). A exposição ao Cd foi realizada com três réplicas em frascos de polycarbonato contendo 500 mL de meio de cultivo. Após 96 h de exposição, as células algais foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min (centrífuga Eppendorf 5702R), ressuspensas em água reconstituída e fornecidas como alimento aos cladóceros. A suspensão algal foi mantida em geladeira a 4 °C em recipientes de polycarbonato durante o período de experimento.

2.3. Exposição do cladóceros ao cádmio

2.4.1. Ciclo de vida

Neonatos de *S. serrulatus* (24 h de vida) foram mantidos em recipientes de polycarbonato com 80 mL de água reconstituída e expostos ao alimento contaminado com $3,8 \times 10^{-14}$; $1,8 \times 10^{-13}$; $4,0 \times 10^{-13}$; $4,4 \times 10^{-13}$ and $5,9 \times 10^{-12} \text{ g Cd célula}^{-1}$. Dez réplicas contendo um neonato cada foram preparadas por tratamento. A água reconstituída e as condições usadas para o experimento com o cladóceros foram as mesmas descritas para a manutenção das culturas-estoques. Os animais foram expostos ao alimento contaminado com Cd durante todo o ciclo de vida. A água de cultivo e o alimento foram renovados a cada 24 h e as condições do meio monitoradas através da determinação do pH, condutividade e dureza. Durante a exposição ao contaminante foram avaliados diariamente os seguintes parâmetros:

- Tempo de duração do desenvolvimento embrionário: desde a postura dos ovos na câmara de incubação das fêmeas até a eclosão, ou seja, tempo para que se complete o desenvolvimento do ovo.
- Idade da primeira reprodução (primípara): é o período de desenvolvimento do indivíduo até a primeira postura de ovos, também chamado de tempo de desenvolvimento pós-embrionário.
- Intervalo na produção de ovos: intervalo entre uma postura de ovos e a postura seguinte.

- Tempo de geração (tempo de ovo a ovo): é a soma do tempo de duração do desenvolvimento embrionário com o tempo para a primípara ou tempo de desenvolvimento pós-embrionário.
- Longevidade: tempo de vida dos organismos, desde o nascimento até a morte.
- Fertilidade: número de ovos e ninhadas produzidos durante a vida dos organismos.

As observações e medições do tamanho do corpo dos animais foram realizadas sob estereomicroscópio (Leica MZ6) munido de ocular micrometrada. As variáveis bionômicas foram observadas em intervalos de 24 h, evitando-se ao máximo as condições de estresse dos indivíduos. Para cada tratamento, foram mantidas dez réplicas adicionais, nas quais os organismos não eram medidos, com o objetivo de garantir que as respostas obtidas não eram provocadas pelo estresse da manipulação excessiva dos animais experimentais. Os resultados foram considerados válidos quando a sobrevivência dos organismos do tratamento controle foi superior a 80% (ABNT, 2005).

2.4.2. Taxas de alimentação (Filtração e Ingestão)

As taxas de filtração e ingestão de *S. serrulatus* foram determinadas em dez recipientes de polycarbonato contendo 80 mL de água reconstituída com um organismo na fase jovem (aproximadamente sete dias) por recipiente. As condições experimentais (temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo) foram as mesmas mantidas durante as avaliações do ciclo de vida. As algas contaminadas com Cd e não contaminadas (controle) foram fornecidas como alimento aos cladóceros durante 24 h. Em seguida, os organismos foram removidos dos recipientes-teste e esses foram vigorosamente agitados para ressuspender as células decantadas. Uma alíquota de um mL foi coletada de cada frasco experimental e fixada com lugol acético para contagem das células. Foram determinadas as concentrações das células algais (células mL⁻¹) no início (0 h) e ao final (24 h) do experimento através de contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal espelhada, sob microscópio óptico (Leica DMLS) de acordo com Clément e Zaid (2004). As taxas médias de filtração (F) (mL animal⁻¹ h⁻¹) e ingestão (I) (células animal⁻¹ h⁻¹) foram calculadas a partir de uma equação adaptada de Gauld (1951) descrita em Villarroel et al. (1999).

$$F = v \frac{(\ln C_0 - \ln C_t)}{t} - A$$

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t}$$

$$I = F \cdot \sqrt{C_0 \cdot C_t}$$

Onde, C_0 e C_t representam as concentrações inicial e final das algas (células mL^{-1}), t representa o tempo (h) equivalente ao período experimental e v é o volume em mililitro (mL) do recipiente teste. A representa um fator de correção para mudanças no controle com concentração final C_t após o tempo t .

2.4.3. Produção secundária

O comprimento do corpo dos indivíduos experimentais foi medido durante as avaliações do ciclo de vida através de estereomicroscópio (Leica MZ6) munido de ocular micrometrada, durante aproximadamente 20 dias. Para estimar a produção secundária investida em crescimento (P_c), o comprimento do corpo foi convertido em biomassa por meio da relação entre peso e comprimento. A produção secundária individual (P_c) diária e no período experimental foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$P_c = \frac{B_f - B_i}{t}$$

Onde:

B_i é a biomassa média do animal no tempo zero.

B_f é a biomassa média do animal após o tempo t (dias).

A biomassa média dos animais experimentais foi estimada indiretamente a partir de equação matemática relacionando comprimento e peso seco dos indivíduos. O peso seco foi determinado em cada fase de desenvolvimento do cladóceros: neonato, jovem, adulto e adulto com ovos. Para isto, utilizaram-se recipientes de papel alumínio previamente secos em estufa a 60 °C (FANEM - Orion 515) por 24 h, resfriados por 30 min em dessecador, e a massa foi quantificada em balança microanalítica com legibilidade de 1 μg (Sartorius - MC21S, Alemanha). Para a determinação do peso seco de cada fase, foram utilizados quinze neonatos, dez jovens, cinco adultos e três adultos com ovos. Os indivíduos foram medidos em seis

réplicas e adicionados aos recipientes de alumínio, os quais seguiram para secagem em estufa (60 °C, 48 h). Os comprimentos foram plotados num gráfico juntamente com o peso seco para obtenção de uma curva (Figura 2A). Em seguida, a partir do Ln das massas (mg peso seco) obtidas pela pesagem direta dos animais e do Ln dos seus comprimentos (mm), foi feita uma regressão linear relacionando LnPeso (mg) e LnComprimento (mm). Através dessa equação foi calculado o acúmulo de biomassa individual diário e no período experimental para cada concentração de cádmio (Figura 2B). A equação linear LnPeso Seco x LnComprimento utilizada foi a seguinte:

$$Lny = -3,187 + 5,047Lnx$$

$$y = 0,041x^{5,047}$$

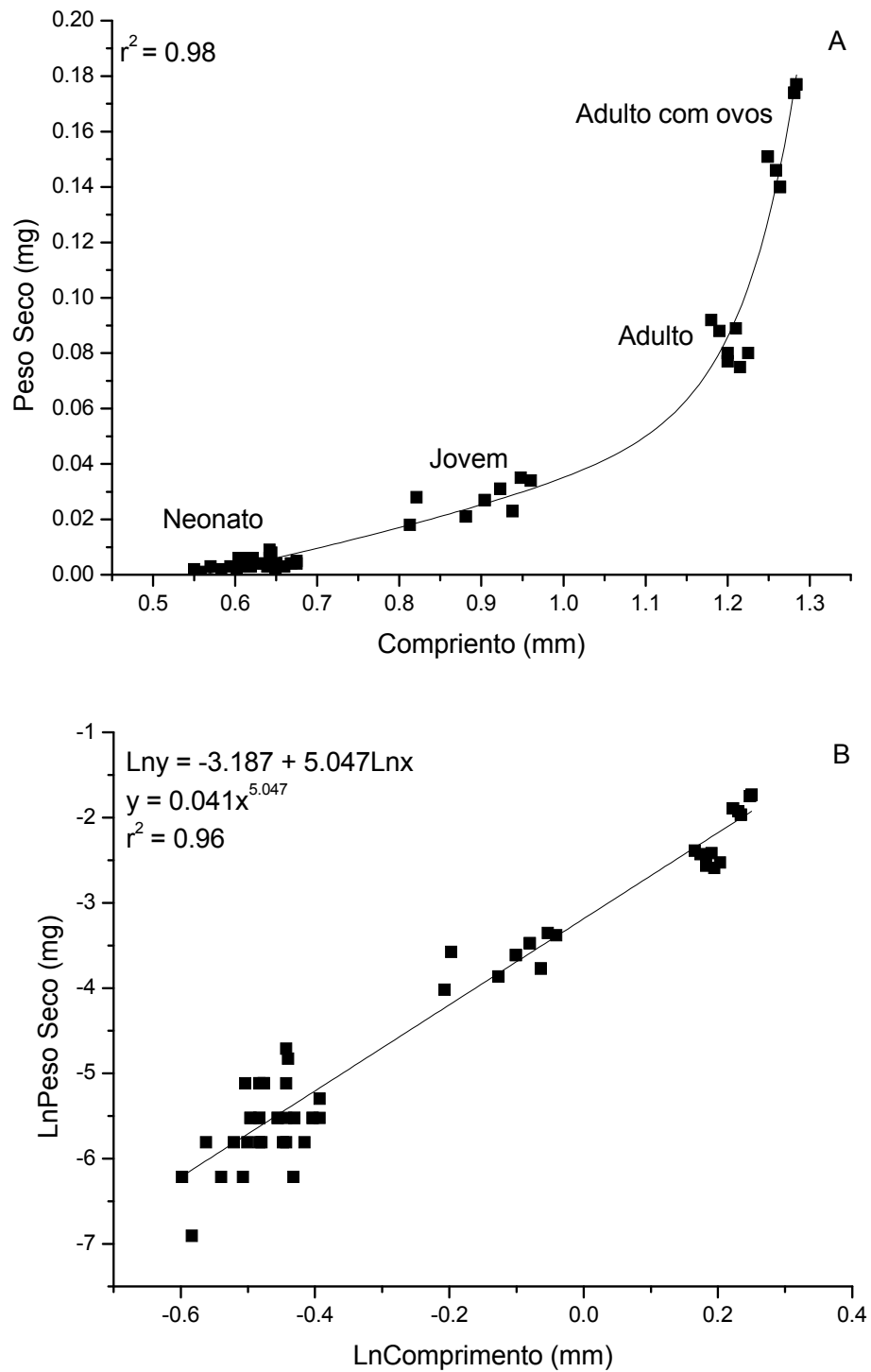


Figura 2. Curva Comprimento x Peso Seco para as diferentes fases de crescimento do cladóceros (A). Regressão linear e coeficiente de correlação obtidos após a plotagem dos valores de LnComprimento (mm) e LnPeso Seco (mg) dos animais experimentais (B).

A produção individual total média (Pt) foi estimada a partir de conceitos descritos em Edmondson e Winberg (1971), Winberg (1971) e Downing e Rigler (1984) e correspondeu à soma da produção diária para crescimento somático (Pc) e para reprodução (Pr) ao longo de todo o período experimental.

$$Pt = Pc + Pr$$

A produção investida em reprodução (Pr) foi estimada a partir da quantificação dos ovos produzidos diariamente por cada indivíduo experimental e da determinação do peso seco médio de cada ovo. Os pesos médios dos ovos foram determinados através da subtração do peso dos animais com ovos em relação ao peso dos animais sem ovos, dividido pelo número de ovos.

2.4.4. Experimentos de recuperação

A avaliação do padrão de recuperação dos organismos foi realizada com neonatos de *S. serrulatus* (24 h de idade) em frascos de polycarbonato contendo 80 mL de água reconstituída e 10^4 células mL⁻¹ de alimento. Os experimentos foram realizados em dez réplicas com um neonato em cada réplica. Inicialmente os organismos foram alimentados com as algas *S. quadricauda* previamente contaminadas com duas concentrações de Cd: $1,8 \times 10^{-13}$ e $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. O controle consistiu no alimento livre de contaminação. As condições experimentais foram as mesmas mantidas para as avaliações do ciclo de vida. O meio de cultivo e o alimento foram renovados a cada 24 h.

Quando os organismos atingiram a fase jovem (aproximadamente sete dias) o alimento contaminado com Cd foi substituído por alimento sem contaminação. As taxas de filtração e ingestão foram medidas através da contagem do número de células algais inicial (0 h) e final (24 h) quando os animais estavam sendo alimentados com as algas contaminadas. Em seguida, após o alimento contaminado ser substituído, as taxas de filtração e ingestão inicial (0 h) e final (24 h) foram novamente determinadas. Subamostras de um mL foram retiradas de cada uma das dez réplicas experimentais, fixadas com lugol acético para posterior contagem em câmaras de Fuchs-Rosenthal espelhada, e determinação da taxa de filtração e ingestão dos organismos de acordo com o modelo adaptado de Gaud (1951) e citado por Villarreal (1999) conforme descrito anteriormente.

Após a substituição do alimento, os animais continuaram sendo alimentados com as algas *S. quadricauda* não contaminadas durante aproximadamente 10 dias. Os parâmetros avaliados foram: taxas de fertilidade (número de ovos e ninhadas) e produção secundária investida em crescimento (Pc) e produção total (Pt) crescimento e reprodução (Pr), conforme descrito anteriormente. Os demais parâmetros como tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade para primeira reprodução, intervalo na produção de ovos e tempo de geração não foram avaliados, pois as medidas dessas variáveis ocorrem antes da substituição do alimento contaminado por alimento livre de contaminação.

2.5. Análise do metal

A concentração de íons cádmio livre (Cd^{2+}) nos meios de cultivo das algas e dos cladóceros foi estimada com auxílio do modelo de equilíbrio químico MINEQL⁺ versão 4.62.3.

A concentração de Cd total dissolvido foi determinada no início da exposição das algas ao Cd (0 h). Da mesma forma o Cd total dissolvido foi determinado nos cultivos dos cladóceros durante a exposição. Para isso, 14 mL de amostras das culturas foram filtradas à vácuo em filtros de membrana de acetato de celulose (0,2 μm de poro, 47 mm de diâmetro) (Sartorius, Alemanha). Os filtros foram previamente lavados com HNO_3 1 mol L^{-1} durante 24 h e enxaguados em água ultra-pura. Os filtrados foram acidificados com HNO_3 ultra-puro (J.T. Baker) para uma concentração final de 0,1 mol L^{-1} , de acordo com os procedimentos descritos em Lombardi et al. (2002).

O Cd total acumulado pelas algas *S. quadricauda* foi determinado ao final das 96 h de exposição seguindo os procedimentos descritos em Lombardi et al. (2002). Dez mililitros de amostras dos cultivos, contendo número de células conhecido, foram filtradas em filtros de membrana de acetato de celulose (0,45 μm do poro, 13 mm de diâmetro) (Sartorius, Alemanha) previamente lavados em HNO_3 1 mol L^{-1} e peso seco inicial conhecido. Os filtros foram secos a 60 °C em estufa durante 48 h, resfriados em dessecador e pesados novamente para a determinação do peso seco final. A determinação do Cd foi realizada a partir da digestão ácida dos filtros pela adição de HNO_3 :HCl (3:1 – água régia) (ácido ultra-puro, J.T. Baker). A digestão ácida foi realizada em tubos de Teflon[®] durante 72 h em temperatura ambiente. A concentração de Cd nas algas foi considerada como a concentração total de metal acumulado em g Cd célula⁻¹ e g Cd g PS⁻¹.

O Cd total acumulado nos cladóceros *S. serrulatus* foi determinado ao final da exposição. Para isso, foram utilizados filtros de membrana de acetato de celulose previamente

lavados com HNO_3 1 mol L^{-1} por 24 h, enxaguados em água ultra-pura, secos em estufa a 60 °C por 24 h, resfriados em dessecador por 30 min e pesados em balança microanalítica com legibilidade de 1 μg (Sartorius MC21S). Ao final do experimento de bionomia, ou seja, após a morte dos indivíduos experimentais, os mesmos foram colocados sobre os filtros (seis indivíduos em cada filtro), em três réplicas. Os filtros foram secos novamente em estufa a 60 °C por 48 h, resfriados em dessecador por 30 min e em seguida pesados novamente em balança microanalítica para obtenção do peso seco dos indivíduos. Posteriormente, os filtros foram mantidos congelados até o momento da extração da fração particulada do metal. A extração da fração particulada do metal nos cladóceros foi realizada em frascos de Teflon[®], onde foram adicionados com 200 μL de HNO_3 concentrado (ácido ultra-puro, J.T. Baker); em seguida os filtros foram mantidos em estufa por 48 h a 90 °C. Posteriormente, foram adicionados oito mL de água ultra-pura e encaminhados para a análise. A concentração de Cd total particulado foi determinada com g Cd g PS^{-1} .

Branco de procedimentos foram determinados usando amostras dos meios de cultura *Oligo* e água reconstituída, para a fração dissolvida. Além disso, três filtros não usados, previamente lavados com HNO_3 1 mol L^{-1} , foram digeridos e analisados como branco para as determinações da fração particulada e teste das condições do equipamento (APHA, 1995). As frações de cádmio total dissolvido e particulado foram determinadas através de espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS, Varian AA220, Austrália).

As concentrações de Cd total particulado determinadas nas algas (*S. quadricauda*), ao final das 96 h de exposição, e utilizadas como alimento para os cladóceros (*S. serrulatus*) foram: $3,8 \times 10^{-14}$; $1,8 \times 10^{-13}$; $4,0 \times 10^{-13}$; $4,4 \times 10^{-13}$ e $5,9 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ ($1,6 \times 10^{-4}$, $3,5 \times 10^{-4}$, $7,2 \times 10^{-4}$, $1,1 \times 10^{-3}$ e $1,4 \times 10^{-2}$ g Cd g PS^{-1}). O controle consistiu no alimento não contaminado com metal.

2.6. Análise estatística

Os resultados obtidos para os parâmetros do ciclo de vida, taxa de alimentação, taxas de variação da produção secundária e recuperação foram submetidos ao teste de normalidade *Teste de Shapiro-Wilk* e ao teste de homogeneidade da variância, *Teste de Levene*. Em seguida, os resultados foram analisados através da ANOVA e *Teste de Tukey* com 95% de confiança, a fim de se detectar diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com o

metal. A análise estatística foi realizada através do programa Paleontological Statistics (*Past*) versão 2.08.

3. RESULTADOS

3.1. Ciclo de vida

Os efeitos do Cd sobre os parâmetros do ciclo de vida estão mostrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6; e Tabela 1. A menor concentração de Cd estudada ($3,8 \times 10^{-14}$ g Cd célula⁻¹) não causou efeito significativo ($p > 0,05$) sobre os parâmetros do ciclo de vida dos cladóceros. Os animais expostos $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ e $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de duração do desenvolvimento embrionário, idade da primeira reprodução e tempo de geração. O intervalo para produção de ovos não foi afetado em qualquer tratamento com o Cd. A longevidade foi significativamente diminuída ($p < 0,05$) nas concentrações de $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ e $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. A maior concentração testada, $5,9 \times 10^{-12}$ g Cd célula⁻¹ causou a morte dos organismos em menos de 24 h de exposição. A Tabela 1 mostra que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de ovos, número de ninhadas e na razão número de ovos por ninhada produzidos pelos cladóceros nas concentrações de $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ e $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. Na concentração de $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ os organismos não atingiram a fase reprodutiva.

A comparação entre os tratamentos revelou aumento significativo ($p < 0,05$) dos parâmetros tempo de duração do desenvolvimento embrionário e tempo de geração para os organismos expostos às maiores concentrações ($1,8 \times 10^{-13}$ e $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹). Da mesma forma, houve diminuição significativa entre os tratamentos sobre a longevidade, número de ovos, número de ninhadas e razão número de ovos por ninhada nas mesmas concentrações avaliadas.

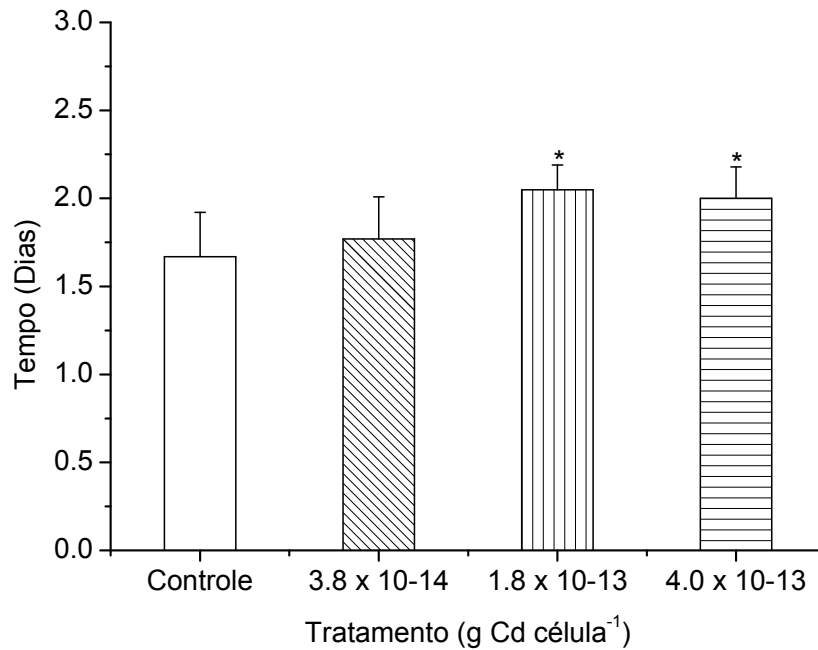


Figura 3. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como tempo de duração do desenvolvimento embrionário (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

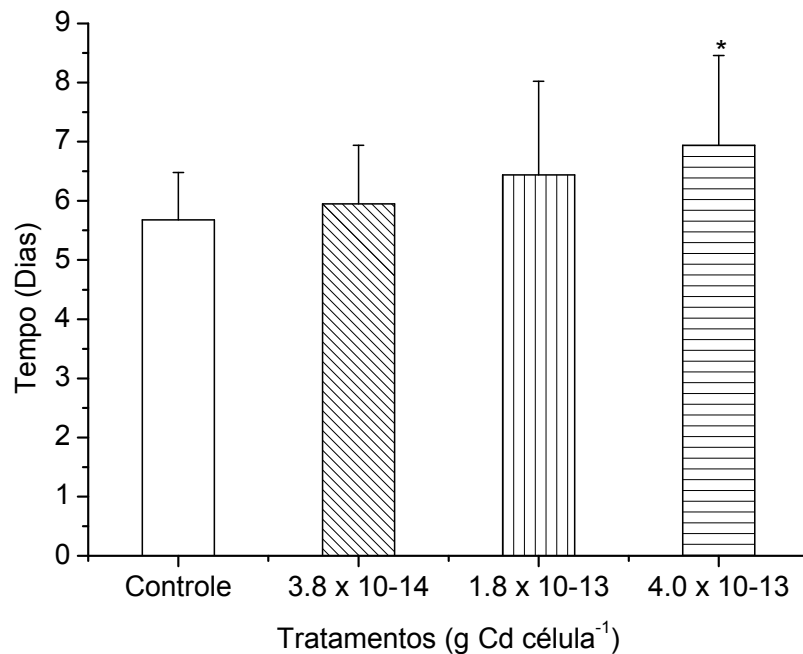


Figura 4. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como idade para primípara (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

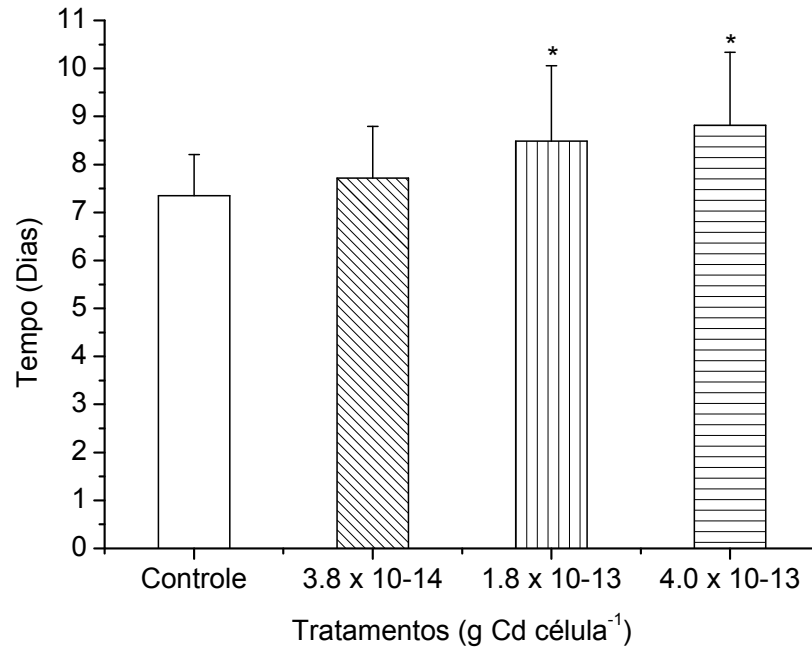


Figura 5. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como tempo de geração (ovo a ovo) (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

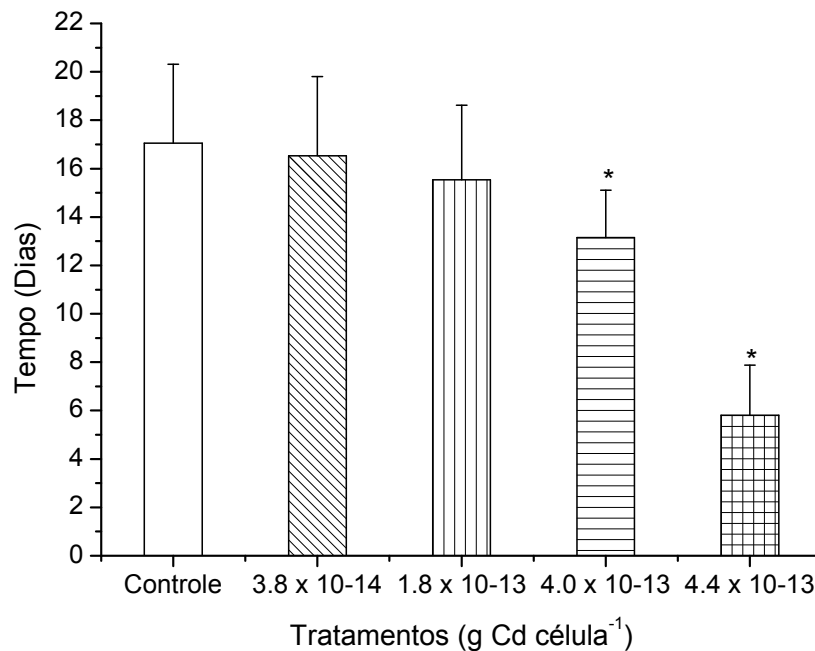


Figura 6. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como longevidade (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

Tabela 1. Número médio de ovos, ninhadas e ovos/ninhada produzidos por *S. serrulatus* exposto ao cádmio via alimento.

Tratamento (g Cd célula ⁻¹)	Ovos	Ninhadas	Ovos/Ninhada
Controle	36,08	5,52	6,54
$3,8 \times 10^{-14}$	22,70	4,60	4,93
$1,8 \times 10^{-13}$	9,56*	3,17*	2,95*
$4,0 \times 10^{-13}$	7,76*	2,35*	3,30*

*Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

O comprimento máximo do corpo atingido pelos indivíduos adultos também apresentou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de $1,8 \times 10^{-13}$; $4,0 \times 10^{-13}$ e $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ (Figura 7). A comparação entre os tratamentos demonstrou que o tamanho do corpo nessas concentrações foi significativamente menor ($p < 0,05$) comparado à menor concentração de $3,8 \times 10^{-14}$ g Cd célula⁻¹ e que a concentração de $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ apresentou tamanho inferior ($p < 0,05$) ao tratamento de $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹.

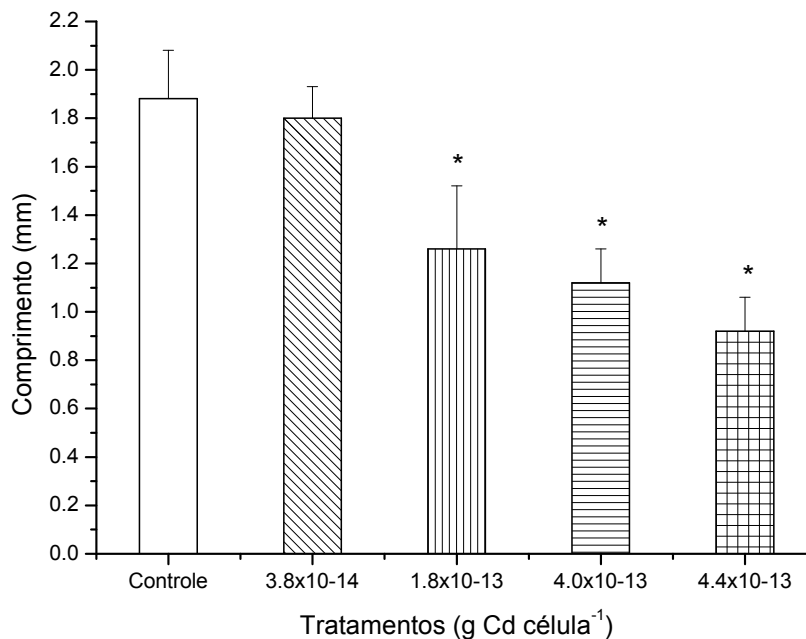


Figura 7. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como comprimento do corpo (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

3.2. Taxa de alimentação (Filtração e Ingestão)

A exposição ao alimento contaminado com Cd causou redução significativa ($p < 0,05$) na taxa de filtração ($\text{mL indivíduo}^{-1} \text{h}^{-1}$) e na taxa de ingestão ($\text{célula animal}^{-1} \text{h}^{-1}$) dos cladóceros experimentais nas concentrações de $1,8 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$; $4,0 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$ e $4,4 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$ (Figuras 8A e B).

3.3. Produção secundária

A produção secundária individual diária investida em crescimento (Figura 9A) foi significativamente diminuída ($p < 0,05$) nas concentrações mais elevadas do metal via alimento. Da mesma forma, a produção secundária total (Pt) investida em crescimento e reprodução (Figura 9B), por animal, durante todo o período experimental também foi afetada ($p < 0,05$) pelas concentrações $1,8 \times 10^{-13}$; $4,0 \times 10^{-13}$ e $4,4 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$.

A produção individual total (Pt) acumulada ao longo do período experimental também sofreu diminuição nas concentrações de $1,8 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$ e $4,0 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$ (Figura 10). Na concentração de $4,4 \times 10^{-13} \text{ g Cd célula}^{-1}$ não foi estimada a produção individual total, pois os organismos viveram em média apenas 5,8 dias.

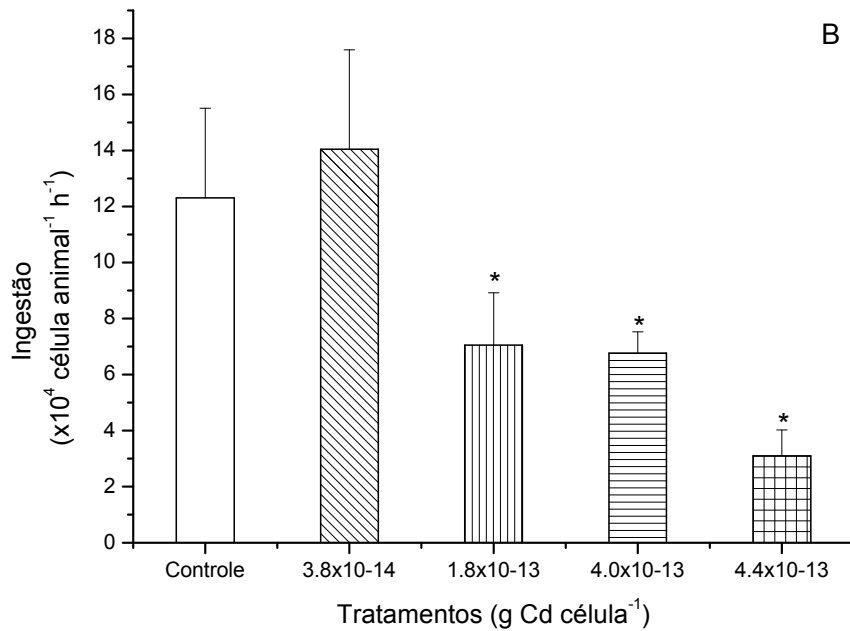
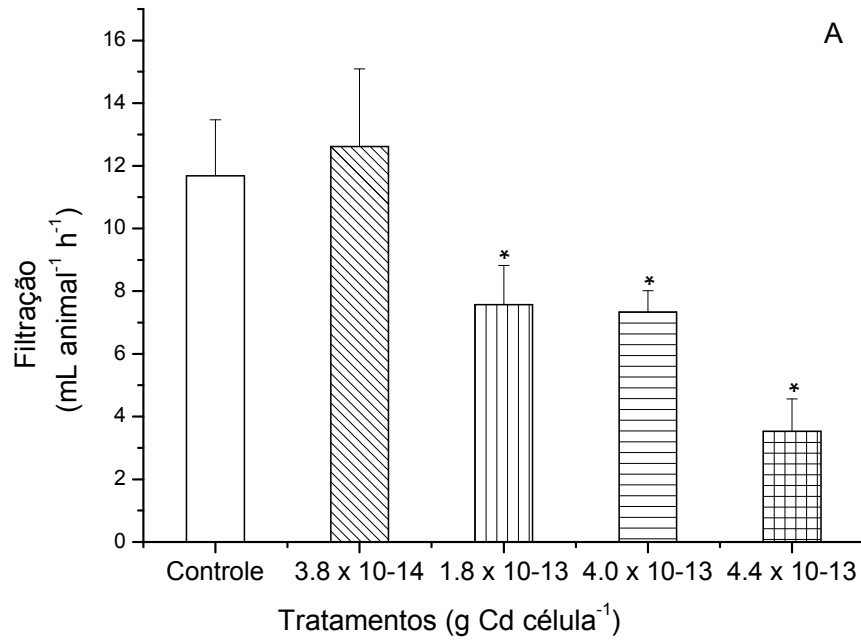


Figura 8. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como taxa de filtração (A) e taxa de ingestão (B) (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

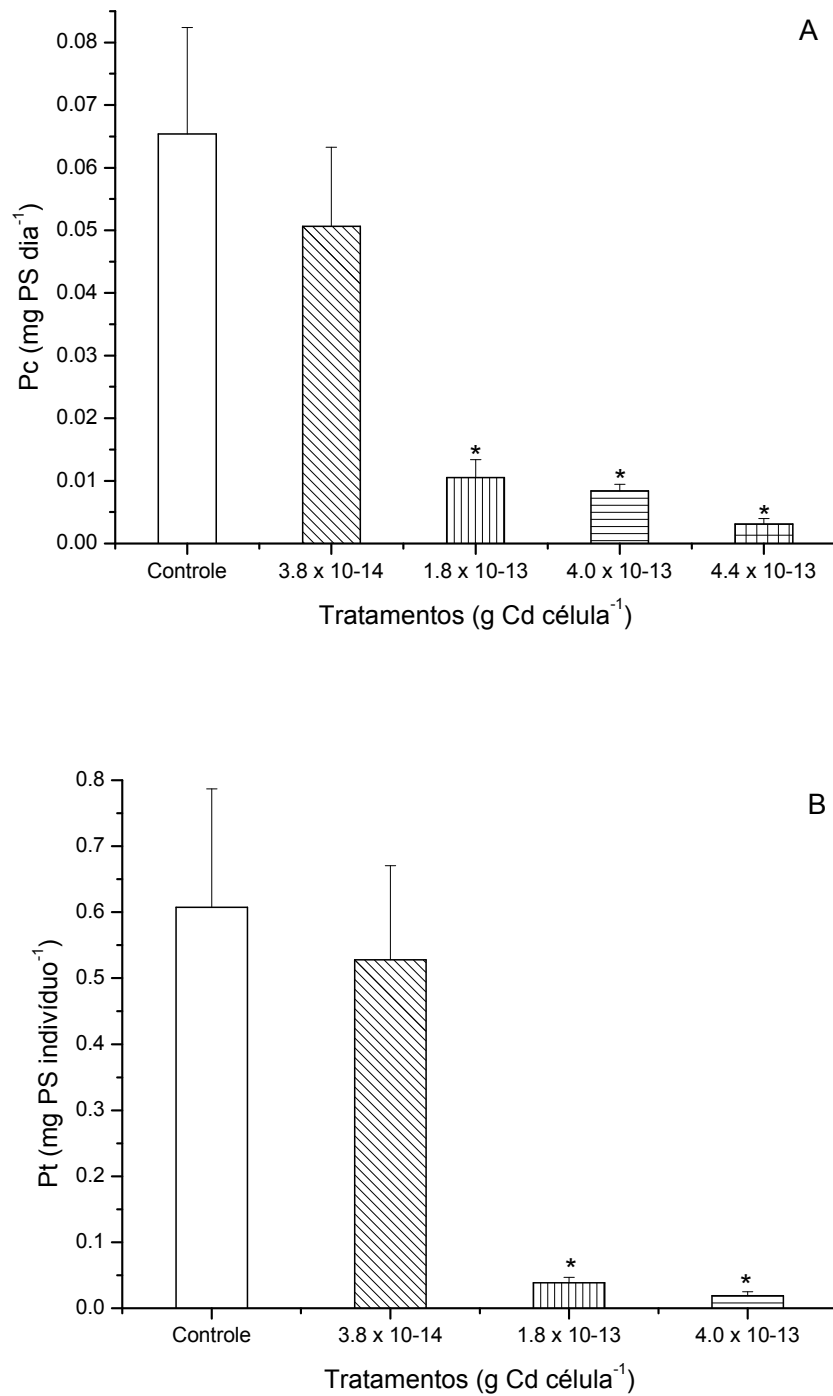


Figura 9. Toxicidade do Cd em *Simocephalus serrulatus* reportada como produção secundária diária investida em crescimento (Pc) (A) e produção secundária total investida em crescimento e reprodução (B) (média \pm desvio padrão) em função da concentração de Cd total particulado. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle.

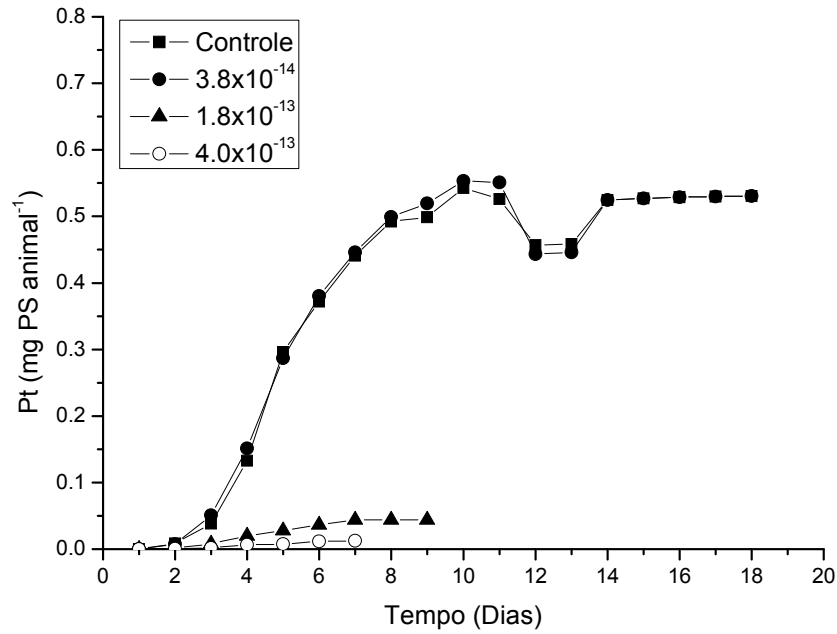


Figura 10. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como produção total acumulada em relação ao tempo de exposição em dias.

3.4. Experimentos de recuperação

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para as taxas de filtração e ingestão avaliadas 24 h após a substituição do alimento contaminado com Cd pelo o alimento livre de contaminação (Figura 11A).

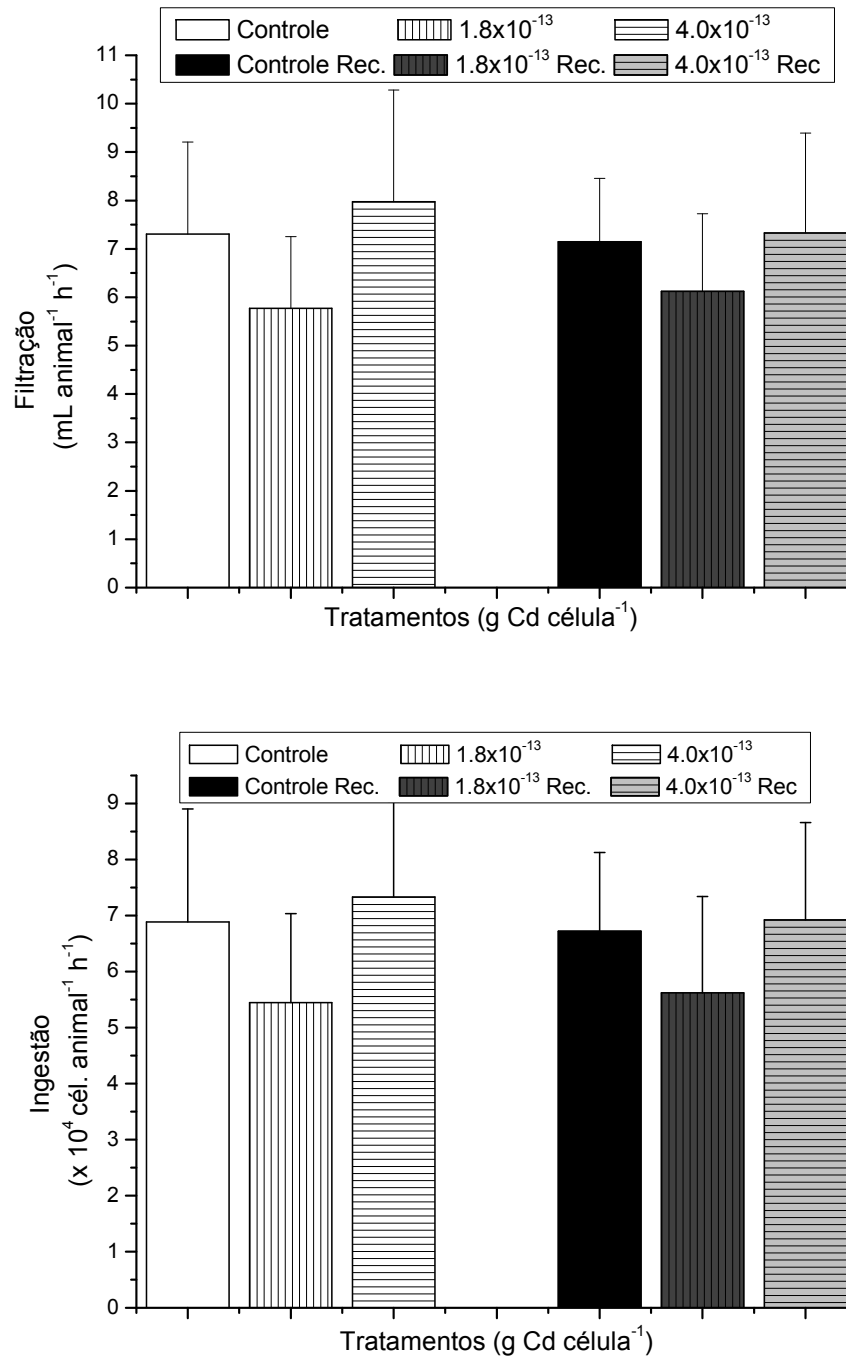


Figura 11. Toxicidade do Cd via alimento em *Simocephalus serrulatus* reportada como taxa de filtração (A) e taxa de ingestão (B) (média \pm desvio padrão) nas diferentes concentrações, durante 24 h de exposição ao Cd via alimento, e 24 h ao alimento livre de Cd.

A Tabela 2 apresenta os resultados para as taxas de fertilidade avaliadas para os cladóceros após a retirada do alimento contaminado com Cd. As variáveis, número de ovos, número de ninhadas e a relação ovos/ninhada não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) após a substituição do alimento. No entanto, pode-se observar que antes da retirada da contaminação essas variáveis haviam diminuído significativamente ($p<0,05$), mas após a ausência do contaminante essas variáveis não sofreram diminuição significativa em nenhum dos tratamentos.

Tabela 2. Número médio de ovos, ninhadas e ovos/ninhada produzidos por *S. serrulatus* exposto ao cádmio via alimento antes e depois da retirada do contaminante.

Tratamento (g Cd célula ⁻¹)	Ovos		Ninhadas		Ovos/Ninhada	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Controle	36,08	22,00	5,52	5,25	6,54	4,38
$1,8 \times 10^{-13}$	9,56*	15,50	3,17*	4,50	2,95*	3,25
$4,0 \times 10^{-13}$	7,76*	12,67	2,35*	4,33	3,30*	2,98

* Indica diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) comparado ao controle.

A produção secundária investida em crescimento (Pc) diária não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) para os experimentos de recuperação. Mesmo após a substituição do alimento contaminado por alimento livre de contaminação, o crescimento dos organismos no período avaliado foi significativamente inferior ao do grupo controle (Figura 12). Quando se comparou os dois grupos controle, os organismos da recuperação apresentaram Pc significativamente menor ($p<0,05$). No entanto quando se comparou os dois grupos tratados antes e depois da recuperação não houve diferença entre eles ($p>0,05$), indicando mais uma vez a inexistência de recuperação para a produção investida em crescimento.

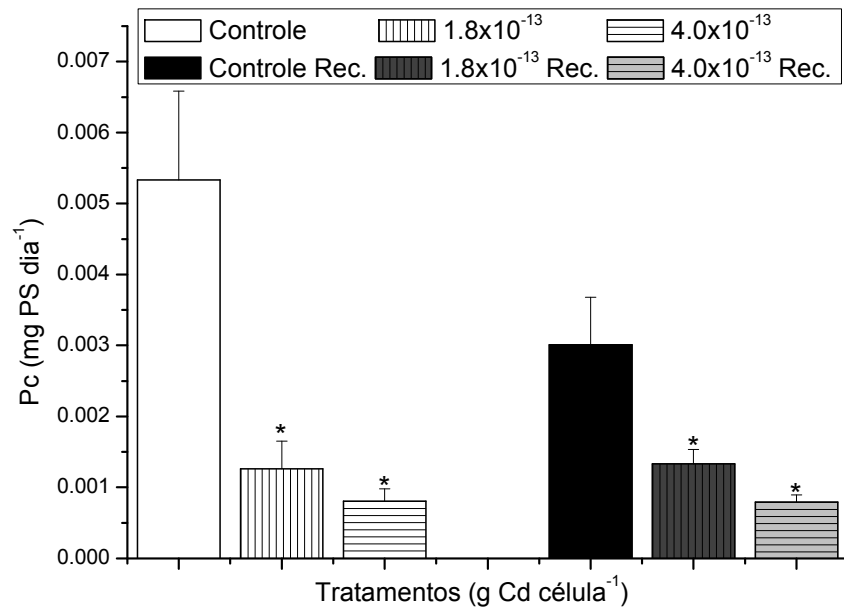


Figura 12. Produção secundária investida em crescimento (média \pm desvio padrão) em *S. serrulatus* antes e depois da retirada do contaminante. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle do mesmo grupo.

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos para produção secundária total (Pt) investida em crescimento e reprodução por indivíduo durante todo o período experimental. Os organismos submetidos ao experimento de recuperação apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da produção investida em crescimento e reprodução em comparação aos organismos controle do mesmo grupo. No entanto, os organismos que tiveram o alimento contaminado substituído pelo alimento livre de Cd apresentaram uma produção total significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação aos organismos alimentados com alga contaminada durante o ciclo de vida.

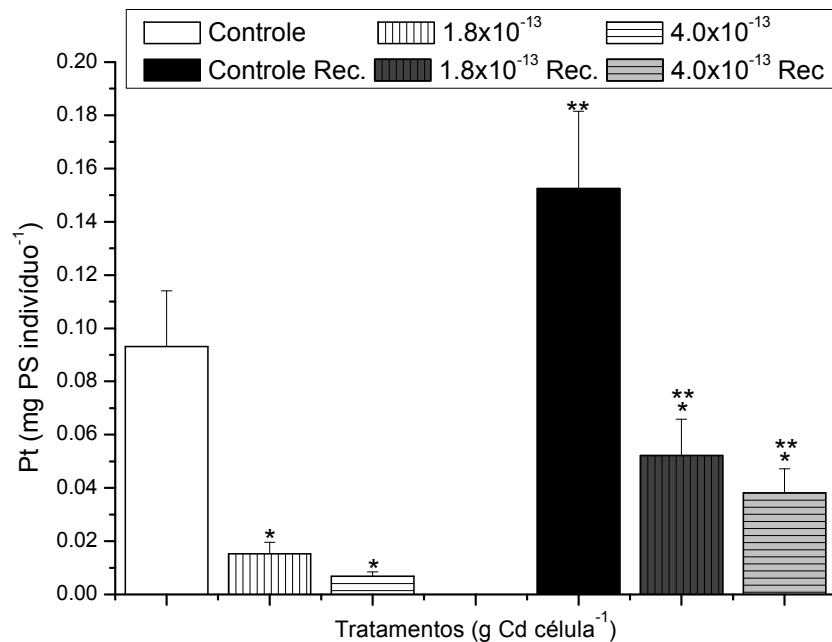


Figura 13. Produção secundária total investida em crescimento e reprodução (média \pm desvio padrão) em *S. serrulatus* antes e depois da retirada do contaminante. * Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao controle do mesmo grupo. ** Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao mesmo tratamento do grupo antes da recuperação.

3.5. Análise do metal

A estimativa dos íons Cd livre através do programa MINEQL⁺ demonstrou que a maior parte do Cd²⁺ adicionado (~95%) encontrava-se na forma livre, ou seja, não complexado, portanto, disponível para ser absorvido e/ou adsorvido pelas células algais. As concentrações do Cd total acumulado pelas algas foram apresentadas na metodologia.

A concentração de Cd total dissolvido na água de cultivo dos cladóceros, água reconstituída, mostrou que a contribuição do Cd dissolvido em relação ao Cd particulado fornecido como alimento não ultrapassou os 3,6%. Portanto, a exposição ocorreu principalmente através do alimento.

A concentração do Cd total particulado acumulado pelos cladóceros está apresentada na Tabela 3 e Figura 14. Os cladóceros submetidos aos tratamentos abaixo de $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹, assim como o grupo controle, apresentaram concentrações de Cd total particulado acumulado nos tecidos inferior a $270,29 \mu\text{g Cd g PS}^{-1}$. Os cladóceros submetidos ao tratamento de $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ apresentaram resultados muito variáveis entre as

réplicas 1, 2 e 3. Os cladóceros expostos a $5,9 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ não sobreviveram ao tratamento.

Tabela 3. Concentrações de Cd total particulado acumuladas nos cladóceros durante o ciclo de vida devido à exposição ao alimento contaminado.

Tratamentos (g Cd célula ⁻¹)	Cd Particulado (g Cd g PS ⁻¹)
Controle (1)	$8,4 \times 10^{-5}$
Controle (2)	$4,5 \times 10^{-5}$
$3,8 \times 10^{-14}$ (1)	$1,3 \times 10^{-4}$
$3,8 \times 10^{-14}$ (2)	$1,1 \times 10^{-4}$
$1,8 \times 10^{-13}$ (1)	$2,7 \times 10^{-4}$
$4,0 \times 10^{-13}$ (1)	$1,5 \times 10^{-4}$
$4,4 \times 10^{-13}$ (1)	$1,4 \times 10^{-4}$
$4,4 \times 10^{-13}$ (2)	$4,4 \times 10^{-4}$
$4,4 \times 10^{-13}$ (3)	$1,0 \times 10^{-3}$

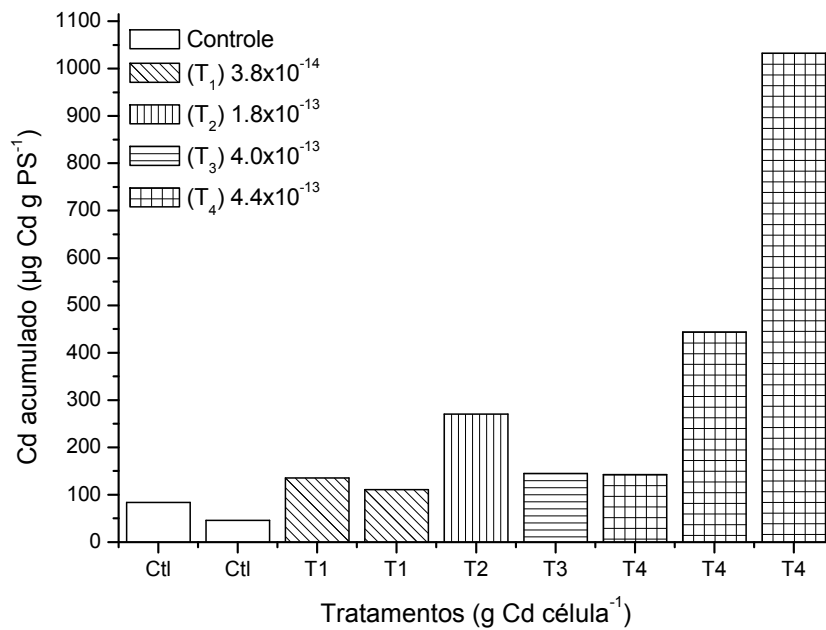


Figura 14. Concentrações de Cd total particulado acumuladas nos cladóceros durante o ciclo de vida em função da exposição ao alimento contaminado.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que concentrações de Cd acima de $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ ($3,5 \times 10^{-4}$ g Cd g PS⁻¹) fornecidas ao cladóceros *Simocephalus serrulatus* através do alimento (*Scenedesmus quadricauda*) provocaram efeitos deletérios. Esses danos foram manifestados através de alterações nos parâmetros do ciclo de vida, taxa de alimentação e produção secundária. Estes resultados estão de acordo com a literatura (REINFELDER et al., 1998; BARATA et al., 2002; PESTANA et al., 2007; SOFYAN et al., 2007; RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008), onde há diversas demonstrações de toxicidade do Cd para organismos zooplanctônicos por diferentes mecanismos fisiológicos e vias independentes de absorção, sendo uma delas a ingestão de alimento contaminado.

4.1. Ciclo de vida

A comparação entre nossos resultados e os dados encontrados na literatura reflete a importância da consideração do alimento como fonte de toxicidade do metal. Sofyan et al. (2007) observaram elevado potencial de toxicidade através do alimento contaminado com $2,0 \times 10^{-8}$ a $5,6 \times 10^{-6}$ g Cd g PS⁻¹ que promoveu a redução da reprodução e da sobrevivência em *Ceriodaphnia dubia*. Rodgher e Espíndola (2008) também verificaram diminuição da sobrevivência e do número de neonatos pela exposição do cladóceros *C. dubia* a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminada com $1,0 \times 10^{-7}$ a $5,6 \times 10^{-6}$ g Cd mg PS⁻¹. Goulet et al. (2007) não relataram efeitos tóxicos da exposição de *Daphnia magna* às algas *Chamydomonas reinhardtii* e *P. subcapitata* contaminadas com concentrações entre $5,6 \times 10^{-7}$ a $1,1 \times 10^{-4}$ g Cd g PS⁻¹ e posteriormente usadas como alimento. Barata et al. (2002) avaliaram diferentes vias de exposição ao Cd, sendo água, alimento (alga) e a combinação de água e alimento para *D. magna*. Esses autores mostram que a absorção do Cd ocorreu independentemente da via, porém os organismos absorveram o dobro de Cd quando na combinação água e alimento contaminados em comparação ao alimento somente.

A principal fonte de toxicidade por Cd aos animais do presente estudo foi o alimento (fitoplâncton); isto sugere transferência do metal na cadeia alimentar da alga *S. quadricauda* para o zooplâncton *S. serrulatus*. Entretanto, a transferência do Cd nas cadeias alimentares ainda é motivo de discussões na literatura. Alguns autores (RAINBOW e SMITH 2010; XIE et al., 2010; RAINBOW et al., 2011) acreditam que o Cd se bioacumula nos tecidos dos organismos vivos e pode ser transferido para consumidores. Entretanto, outros autores

(MASON, 1991; WREN et al., 1995; REINFELDER et al., 1998) obtiveram poucas evidências de biomagnificação do Cd ao longo da cadeia trófica. Portanto, um conhecimento detalhado da transferência trófica e dos efeitos do Cd no ciclo de vida dos organismos é importante para a proposta de preservação e manutenção da biodiversidade das comunidades aquáticas (REINFELDER et al., 1998, RAINBOW e SMITH, 2010; XIE et al., 2010).

Para cladóceros, os efeitos das contaminações crônicas podem permanecer no indivíduo durante todo seu ciclo de vida. Isto pode ter implicações na estrutura das populações e comunidades aquáticas em ambientes naturais como foi sugerido em outros estudos (BARATA et al., 2002; SOFYAN et al., 2007; RODGHER et al., 2009) e agora confirmado por nossos resultados. Demonstramos que a exposição através do alimento aumentou a duração do desenvolvimento embrionário, idade da primeira reprodução e o tempo de geração dos organismos durante 20 dias de exposição. Além disso, a sobrevivência e fertilidade (número de ovos e ninhadas) foram reduzidas nas concentrações mais elevadas de Cd. Os efeitos deletérios observados no ciclo de vida dos organismos estão diretamente relacionados com a manutenção do número de indivíduos das populações, que na qualidade de consumidores primários, suportam os níveis tróficos superiores em ambientes naturais (COSTA et al., 2008). Portanto, contaminações crônicas podem desencadear processos desestabilizadores do equilíbrio ecológico nos ambientes naturais através da redução persistente do número de indivíduos da população afetada.

As reduções das taxas de reprodução podem ser consideradas consequência de prejuízos no desenvolvimento do embrião dentro da câmara de incubação das fêmeas (ORCHARD, et al., 2002). Ou ainda pela diminuição do tamanho do corpo dos organismos, pois de acordo com Hülsmann (2001), a taxa de reprodução dos crustáceos é proporcional ao tamanho corporal. Em nossos estudos, uma redução do tamanho do corpo também foi observada. Outro aspecto importante seria a inibição na taxa de alimentação que poderia refletir indiretamente sobre o tamanho do corpo (KNOPS et al., 2001).

4.2. Taxa de alimentação (Filtração e Ingestão)

Em relação às taxas de filtração e ingestão, as alterações observadas neste estudo poderiam ser causadas pela tentativa do cladóceros em evitar o alimento contaminado ou por dificuldades na digestão do mesmo, o que concorda com os resultados de Orchard et al. (2002). Esses autores verificaram que a concentração de $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ($1,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) de Cd na forma dissolvida causou significativa inibição da taxa de filtração do cladóceros tropical

Moinodaphnia macleayi após 20 h de exposição. Similarmente, Sofyan et al. (2007) observaram inibição da taxa de alimentação em *C. dubia* na exposição ao Cd através do alimento. Taylor et al. (1998) relataram que a causa primária da redução da alimentação em *D. magna*, após ser exposta ao alimento com Cd, foi a dificuldade da digestão. Alguns estudos mostraram que em cladóceros, os divertículos do intestino médio são os principais alvos de absorção de cádmio e nutrientes como cálcio, e que problemas no metabolismo do cálcio podem afetar a fisiologia do intestino e eventualmente causar mortalidade (BARATA et al., 2002). Dafnídeos são capazes de coletar e ingerir normalmente células algais expostas ao cádmio, porém o contaminante interfere na digestão ocasionando a passagem de células através do intestino sem serem digeridas (TAYLOR et al., 1998). Isto resultaria em mudanças em nível de população, pois os principais parâmetros para crescimento e sobrevivência da população dependem da entrada de energia através da alimentação.

A taxa de alimentação foi um parâmetro bastante sensível à toxicidade pelo Cd. A seqüência de eventos iniciou-se com a diminuição da taxa de alimentação, em seguida afetou o tempo de desenvolvimento embrionário, o tempo de geração, o número de ovos e ninhadas. Isto foi comprovado pelo tratamento com $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ onde houve forte inibição da taxa de filtração, refletindo efeitos sobre a longevidade e os animais não atingiram a fase reprodutiva. As causas para os danos da exposição através da dieta em *S. serrulatus*, no presente estudo, podem ser consideradas uma ação conjunta dos aspectos fisiológicos investigados, e ainda, que nenhum fator isolado pode ser responsável pelos efeitos tóxicos observados. Eles ocorreram simultaneamente e juntos contribuíram para toxicidade do Cd através da dieta.

4.3. Produção Secundária

Baseados no presente estudo, podemos dizer que o alimento com metal resultou em efeitos sobre o fluxo energético na cadeia alimentar. A produção secundária alocada para crescimento individual (Pc) diária e no período experimental foi significativamente reduzida nas concentrações acima de $1,8 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. Portanto, a exposição dos animais ao Cd via alimento resultou na diminuição do crescimento e, conseqüentemente, em menor biomassa acumulada no período. A produção investida em reprodução (Pr) também foi reduzida nas maiores concentrações de Cd como decorrência da redução significativa na fertilidade (número de ovos e de ninhadas). Como consequência, a produção total (Pt) dos indivíduos experimentais também foi substancialmente reduzida. A biomassa acumulada pelos animais

está diretamente relacionada com a quantidade de energia assimilada pelos organismos, proveniente da ingestão do alimento (KNOPS et al., 2001; RODGHER et al., 2009). Os toxicantes podem diminuir a aquisição de energia devido à inibição da ingestão de alimento ou da eficiência de assimilação do mesmo (ALLEN et al., 1995). No presente estudo, observou-se alteração do comportamento alimentar evidenciada pela redução da taxa de filtração. O aumento do consumo de energia pode ser devido à resistência ao estresse pelo toxicante juntamente com a inibição da alimentação o que resultaria em diminuição do crescimento e reprodução. O aumento do consumo de energia poderia ser requerido, em processos de detoxificação tais como a produção de metalotioneínas (AMIARD et al., 2006) ou armazenamento de Cd em grânulos (De SCHAMPHELAERE et al., 2007).

Os resultados observados neste estudo sobre vários aspectos da biologia da espécie avaliada podem ser atribuídos aos efeitos que os metais provocam sobre a organização fisiológica geral dos organismos (REINFELDER et al., 1998). Hook e Fisher (2002) observaram prejuízos sobre a reprodução em cladóceros e copépodos marinhos expostos a metais via alimento, devido à falha no processo de vitelogênese, ausência de desenvolvimento dos ovos, diminuição do conteúdo de proteína e redução na porcentagem de eclosão. Neste estudo, ficou evidente a importância do alimento com fonte de toxicidade do metal cádmio para o cladóceros *S. serrulatus*, suportando então a hipótese da transferência do Cd via alimento na cadeia alimentar no primeiro e segundo níveis tróficos (*S. quadricauda* para *S. serrulatus*).

4.4. Experimentos de recuperação

As avaliações da recuperação após a ausência do contaminante revelaram que a taxa de filtração e ingestão não apresentaram evidências de recuperação. Esse resultado pode ser atribuído ao tempo de exposição dos organismos ao alimento livre de Cd. A avaliação da possibilidade de recuperação da taxa de alimentação foi realizada após 24 h na presença de alimento livre de Cd. Este período provavelmente não foi suficiente para o restabelecimento da taxa de alimentação. Villarroel et al. (1999) observaram também que o comportamento alimentar de *D. magna* exposta ao acaricida tetradifon continuou afetado mesmo durante o período de recuperação. Pode-se dizer que a taxa de alimentação é um parâmetro que não se recupera em um curto período de tempo.

A taxa de fertilidade avaliada a partir do número de ovos e ninhadas não apresentou sinais significativos de recuperação na ausência do contaminante. No entanto, esse parâmetro também não sofreu reduções significativas, na ausência do alimento contaminado,

em oposição ao que foi observado durante a avaliação na presença do alimento com Cd. Este resultado pode ser um indicativo de início de recuperação dos aspectos reprodutivos do animal na ausência do Cd. É possível que a taxa de fertilidade fosse restabelecida se as avaliações tivessem ocorrido por um maior período de tempo.

A produção secundária investida em crescimento (Pc) foi significativamente menor para os organismos alimentados com alga sem Cd, da mesma forma que ocorreu com os cladóceros alimentados com Cd. Pode-se dizer que este parâmetro de investimento em crescimento não apresentou sinais de recuperação. Em oposição aos nossos resultados, Guan e Wang (2006) verificaram recuperação do crescimento em clones de *Daphnia magna* após exposição ao Cd. É possível que os sinais de recuperação do crescimento não foram evidentes em decorrência também do período de tempo na qual a avaliação foi realizada. Muscatello e Liber (2010) observaram que espécies de quironomídeos (*Chironomus tentans*) que acumularam urânio foram capazes de diminuir a concentração deste elemento no corpo após 3 dias em que as larvas foram colocadas em água limpa, e ainda que o crescimento aumentou após serem transferidos para água livre de urânio. Da mesma forma, é possível que a recuperação do crescimento seja mais demorada em cladóceros da espécie *S. serrulatus*.

Por outro lado, a produção secundária total (Pt), soma das produções investidas em crescimento e reprodução, demonstrou taxa significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo no qual o alimento com Cd foi substituído por alimento sem Cd, indicando a existência de recuperação. De acordo com Mangás-Ramírez et al. (2004), cladóceros expostos a metais em determinadas concentrações podem recuperar-se quando as condições tornam-se favoráveis. Diante desses resultados, acredita-se que para essa espécie de cladóceros o investimento em reprodução seja mais importante que o investimento em crescimento. De acordo com nossos estudos, é possível inferir que a substituição do alimento contaminado com Cd por alimento livre de contaminação pode ser capaz de melhorar os parâmetros reprodutivos da espécie avaliada. A recuperação iniciou-se a partir da melhora no desempenho reprodutivo dos organismos. Por isso, a reprodução foi o parâmetro que se recuperou mais rapidamente. Acredita-se que a soma de investimentos em reprodução e crescimento, nessa ordem, é que reflete resultados positivos ao organismo.

4.5. Análise do metal

Em relação às concentrações de Cd acumuladas pelos cladóceros, podemos considerar que a transferência trófica deve ser vista com cuidado. As concentrações de Cd

acumuladas pelo cladóceros foram irregulares. As concentrações acumuladas entre as réplicas testadas apresentaram grandes variações. Durante as análises não foi possível determinar com precisão a concentração de Cd nos cladóceros nos tratamentos com $3,8 \times 10^{-14}$, $1,8 \times 10^{-13}$ e $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹. É possível que os organismos expostos ao Cd pelo alimento tenham sofrido alteração do comportamento alimentar, o que ocasionou a ingestão de alimento contaminado de forma irregular e dificultou as determinações das concentrações acumuladas nos cladóceros. Este fato pode ser evidenciado pela diminuição da taxa de alimentação obtida em nossos resultados.

No tratamento de $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ houve aumento das concentrações de Cd acumuladas entre as réplicas. Este resultado ocorreu possivelmente em virtude da elevada concentração de Cd no alimento e do tempo de exposição dos organismos. Geralmente, a acumulação de Cd varia em função da concentração e do tempo de exposição. Wang e Ke (2002) observaram que a concentração de Cd no caracol *Littorina littoranea* foi diretamente proporcional à concentração de Cd e linear em relação à duração da exposição. Brooks et al. (2004) verificaram que a exposição a $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd por 10 dias resultou em uma concentração de Cd de $600 \mu\text{g g PS}^{-1}$. Por outro lado, Ivorra et al. (2002) demonstrou que $64 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd resultam em uma concentração de $1000 \mu\text{g g PS}^{-1}$ por três semanas. A determinação da concentração de Cd total acumulado entre as réplicas no tratamento de $4,4 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ ocorreu ao final do ciclo de vida dos organismos. A réplica 1 representa os organismos expostos ao metal que tiveram menor longevidade. Provavelmente estes foram organismos mais sensíveis à exposição. Esses indivíduos sobreviveram poucos dias devido ao tratamento e acumularam menor concentração do metal. Por outro lado, a réplica 3 representa organismos que sobreviveram maior tempo alimentados com a alga contaminada. Possivelmente, foram organismos mais tolerantes ao metal. Eles ingeriram células algais contaminadas, acumularam o metal e resistiram maior tempo de exposição, por isso tiveram uma carga tóxica mais elevada do metal. De acordo com o modelo de acumulação de metais não essenciais descrito por Rainbow (2002), nos cladóceros existe a possibilidade de acumulação desses metais com uma pequena excreção. Segundo esses autores, as células contendo os corpos residuais lisossomais com Cd podem “acumular-se” no trato intestinal, impedindo a excreção do Cd absorvido (MASON e JENKINS, 1995; LANGSTON et al., 1998; RAINBOW, 2002), ou ainda, da mesma forma que ocorre com os metais essenciais, o organismo consegue “lidar ou regular” esse metal e excretá-lo em pequenas porções gradualmente (RAINBOW 2002; GALEY e RAINBOW, 1998). De acordo com esses autores,

a toxicidade inicia-se quando as concentrações do metal são elevadas e a “regulação” é impossibilitada.

Diante desses resultados pode-se dizer que em baixas concentrações é possível que os organismos tenham sido capazes de “regular” a concentração de Cd no corpo, com alguma excreção do metal. Por isso a dificuldade na determinação da concentração de Cd acumulada nos tratamentos com menores concentrações. Na concentração mais elevada ainda pode continuar havendo regulação. No entanto, a quantidade de metal que é ingerida pelo animal é muito maior do que a quantidade excretada, por isso existe uma falsa impressão de que o metal está sendo acumulado e não regulado. O que ocorre é que em altas concentrações de metal a regulação parece ser menos eficiente e mais lenta. Contudo, como os resultados não foram precisos, sugere-se que esta questão ainda seja tratada com cuidado, e estudos mais aprofundados devem ser realizados para maiores esclarecimentos.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o metal cádmio causou efeitos tóxicos para o cladóceros dafnídeo *Simocephalus serrulatus* através da exposição à alga clorofícea *Scenedesmus quadricauda* como fonte de alimento contaminado. Nós observamos que os efeitos do Cd ocorrem sobre diferentes parâmetros do ciclo de vida, taxas de alimentação e produtividade. O Cd no alimento é uma importante fonte de toxicidade para o cladóceros *Simocephalus serrulatus*. Esses resultados destacam para a importância da avaliação dos efeitos de contaminantes durante todo o ciclo de vida dos organismos e ainda para a possibilidade de recuperação diante da ausência de contaminação. A pesquisa foi fundamental para avaliação das alterações subletais sobre os cladóceros, os mecanismos envolvidos na transferência trófica e os principais danos após a exposição crônica. As informações apresentadas permitem o melhor entendimento do comportamento do cádmio nos ambientes aquáticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR13373:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2005b. 15 p.

ASSOCIATION FRANÇAISE NORMALISATION (AFNOR). **Norme expérimentale. T90-304.** Essais de réseaux Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance, Paris, France, 1980.

ALLEN, Y.; CALOW, P.; BAIRD, D.J. A mechanistic of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 14, p. 1625-1630, 1995.

AMIARD, J.C. et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 160-202, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER CONTROL FEDERATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19 ed. New York, 1995.

BARATA, C. et al. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. **Aquatic Toxicology**, v. 61, p. 143-154, 2002.

BARBOSA, M.P.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Consumption of zooplanktonic organisms by *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819 (Osteichthyes, Characidae) in Lobo Broa Reservoir, São Carlos, SP.** 1984.

BOSSUYT, B.T.A.; JANSSEN, C.R. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 145-154, 2005.

BOTTRELL, H.H. et al. A review of some problems in zooplankton production studies. **Norwegian Journal of Zoology**, v. 24, p. 419-456, 1976.

BROOKS, B.W. et al. Laboratory and field responses to cadmium: an experimental study in effluent-dominated stream mesocosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 1057-1064, 2004.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O.; MARTINEZ-JERÓNIMO, F.; ESPINOSA-CHAVES, F. Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn, and a mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 160-164, 2000.

- CLÉMENT, B., ZAID, S. A new protocol to measure the effects of toxicants on the daphnids-algae interactions. **Chemosphere**, v. 55, p. 1429-1438, 2004.
- COSTA, C.R. et al. Toxicity in aquatic environments and evaluation methods. **Quimica Nova** v. 31, p. 1820-1830, 2008.
- De SCHAMPHELAERE, K.A.C. et al. Chronic toxicity dietary copper to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 409-418, 2007.
- DOWNING, J.A., RIGLER, F.H. **A manual of methods for the assessment of secondary productivity in fresh water**. 2. ed. Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific, 1984, 501 p.
- EDMONDSON, W.T., WINBERG, G.G. A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. IBP N° 17. Oxford: Blackwell Scientific, Oxford and Edinburgh, 1971, 358 p.
- GALEY, M.; RAINBOW, P.S. Uptake, accumulation and excretion by *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda) of zinc, cadmium and cobalt added to sewage sludge. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 47, p. 603-620, 1998.
- GAULD, D.T. The grazing rate of planktonic copepods. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 29, p. 695-705, 1951.
- GOULET, R.R. et al. Dynamic multipathway modeling of Cd bioaccumulation in *Daphnia magna* using waterborne and dietborne exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 117-125, 2007.
- GUAN, R.; WANG, W.X. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. **Aquatic Toxicology**, v. 86, p. 217-229, 2006.
- HAMILTON, M. A., rUSSO, R.C., tHURSTON, V. Trimmed Spearman – Karber methodo for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 7, p. 714-719, 1977.

HOOK, S.E.; FISHER, N.S. Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. **Marine Environmental Research**, v.53, p. 161-174, 2002.

HÜLSMANN, S. Reproductive potential of *Daphnia galeata* in relation to food conditions: implications for a changing size-structure of the populations. **Hydrobiologia**, v. 491, p. 35-46, 2001.

IVORRA, N. et al. Responses of biofilms to combined nutrient and metal exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 626-632, 2002.

KNOPS, M.; ALTENBURGER, R.; SEGER, H. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 53, p. 79-90, 2001.

LANGSTON, W.J.; BEBIANNO, M.J.; BURT, G.R. Metal handling strategies in mollusks. In: ____ **Metal metabolism in aquatic environments**. London: Chapman and Hall, 1998, p. 219-283.

LOMBARDI, A.T., VIEIRA, A.A.H., SARTORI, L.A. Muscilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). **Jornal of Phycology**, v. 38, p. 332-337, 2002.

MANGAS-RAMÍREZ, E.; SARMA, S.S.S.; NANDINI, S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.216-222, 2004.

MASON, C. F. Biology of freshwater pollution. 2. ed. New York: John Willey and Sons, 1991, 351 p.

MASSON, A.Z.; JENKINS, K.D. Metal detoxification in aquatic organisms. In: ____ **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1995, p. 479-608.

MUSCATELLO, J.R.; LIBER, K. Uranium uptake and depuration in the invertebrate *Chironomus tetans*. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1696-1701, 2010.

ORCHARD, S.J. et al. A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran *Moinodaphnia macleayi*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 12-19, 2002.

PESTANA, J.L.T.; Ré, A.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. Effects of Cadmium and Zinco on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). **Chemosphere**, v. 68, p. 1556-1562, 2007.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RAINBOW, P.S.; SMITH, B.D. Trophic transfer of trace metals: Subcellular compartmentalisation in bivalve prey and comparative assimilation efficiencies of two invertebrate predators. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 390, p. 143-148, 2010.

RAINBOW, P.S.; LUOMA, S.N.; WANG, W.X. Trophically available metal – A variable feast. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2347-2349, 2011.

REINFELDER, J.R. et al. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Science of the Total Environment**, v. 219, p. 117-135, 1998.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Effects of interaction between algal densities and cadmium concentration on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 765-773, 2008.

RODGHER, S. et al. Change in life parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary cooper. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 826-833, 2008.

RODGHER, S.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G. Evaluation onto life cycle parameters of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to 36 days dietary copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1748-1753, 2009.

RUANGSOMBOON, S.; WONGRAT, L. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 15-20, 2006.

SOFYAN, A.; PRICE, D.J.; BIRGE, W.J. Effects of aqueous, dietary and combined exposure of cadmium to *Ceriodaphnia dubia*. **Science of the Total Environment**, v. 385, p. 108-116, 2007.

TAYLOR, G.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V. Surface binding contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 412-419, 1998.

VILLARROEL, M.J. et al. *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 40-46, 1999.

WANG, W.X.; KE, C. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. **Aquatic Toxicology**, v. 52, p. 153-165, 2002.

WINBERG, G.G. Methods for the estimation of production of aquatic animals. Academic Press, London and New York, 1971, 175 p.

WREN, C.D., HARRIS, S., HARTTRUP, N. Ecotoxicology of Mercury and Cadmium. In: _____ **Handbook of Ecotoxicology**. Florida, USA: Lewis Publishers, 1995, p. 392-423

XIE, L.; FUNK, D.H.; BUCHWALTER, B. Trophic transfer of Cd from natural periphyton to the grazing mayfly *Centroptilum triangulifer* in a life cycle test. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 272-277, 2010.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE HISTOLÓGICA DE BRÂNQUIAS E FÍGADO DE
Hyphessobrycon eques EXPOSTO AO CÁDMIO VIA
CADEIA ALIMENTAR

CAPÍTULO 3. Análise histológica de brânquias e fígado de *Hyphessobrycon eques* exposto ao cádmio via cadeia alimentar

RESUMO

Alterações histológicas induzidas pelo cádmio (Cd) foram estudadas no peixe *Hyphessobrycon eques* conhecido como *mato-grosso*, o qual foi exposto ao metal através de uma cadeia alimentar experimental. A fonte alimentar do peixe (consumidor secundário) foi o cladócero *Simocephalus serrulatus* (consumidor primário) que, por sua vez, foi alimentado com uma microalga clorofícea (*Scenedesmus quadricauda*) – produtor primário, contaminada com Cd. Cultivos de *S. quadricauda* foram expostas a $6,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ de Cd na forma dissolvida durante 96 h. Ao final desse período, a biomassa algal foi centrifugada e utilizada como alimento ao cladócero *S. serrulatus* na concentração de $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹, equivalente a $7,2 \times 10^{-4}$ g Cd g PS⁻¹, durante sete dias. Em seguida, os cladóceros foram coletados e fornecidos como alimento ao peixe *H. eques* durante sete dias. A concentração de Cd acumulada no cladócero e fornecida ao peixe foi de $1,26 \times 10^{-6}$ g Cd dia⁻¹. Ao final da exposição, os peixes foram mortos e as brânquias e fígado coletados. A análise histológica realizada através do Valor Médio de Alteração (VMA) e do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) desses órgãos revelou que os organismos não apresentaram evidências de alterações estruturais nas brânquias e no fígado. Os organismos de ambos os grupos, controle e tratado, apresentaram ligeiras alterações morfológicas nos órgãos estudados, mas sem comprometimento do funcionamento normal dos mesmos. Os resultados indicam que o Cd via cadeia trófica nas condições experimentais avaliadas no presente estudo não foi capaz de causar alterações histopatológicas nas brânquias e no fígado de *H. eques* após sete dias de exposição. Esses estudos sugerem a necessidade de exposições por períodos de tempo superiores a sete dias, ou exposição a concentrações mais altas de metal, e/ou ainda análises mais aprofundadas para que os efeitos sejam perceptíveis.

Palavras-chave: cadeia trófica, metal, microalga, toxicidade, zooplâncton.

1. INTRODUÇÃO

A exposição aos metais através da dieta nem sempre é considerada como causa de toxicidade para espécies aquáticas. No entanto, a transferência trófica pode ser o principal caminho de entrada de metais para alguns organismos aquáticos (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006; BÉCHARD et al., 2008; NG e WOOD, 2008; GOTO e WALLACE, 2009; LIAO et al., 2011). A absorção de metais através do alimento pode reduzir a sobrevivência, o crescimento e a reprodução de invertebrados e peixes (BARATA et al., 2002; RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006; SOFYAN et al., 2007; NG e WOOD, 2008). Devido à importância da transferência trófica, a toxicidade de metais via alimento para a biota de ecossistemas aquáticos necessita ser melhor compreendida.

A presença de metais nos ambientes aquáticos pode ser atribuída a processos naturais. Porém, nos últimos anos, a contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais tem aumentado mundialmente como resultado de despejos industriais (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006). O cádmio (Cd) é um metal tóxico encontrado frequentemente nos corpos d'água (BÉCHARD et al., 2008). As utilizações mais comuns para esse metal são em fertilizantes químicos, pigmentos, anti-corrosivos, revestimento de aço e ferro, fabricação de baterias níquel-cádmio e ligas metálicas (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006; LIU et al., 2011). Quando presente no ambiente aquático, o Cd pode causar toxicidade aos organismos diretamente através da água, ou pode ser acumulado pelos organismos pela absorção através da cadeia alimentar (LIU et al., 2002; SEEBROUGH et al., 2005). Durante os processos de contaminação por metais, organismos fitoplanctônicos, zooplanctônicos e peixes sofrem consequências a curto e a longo prazo. No caso dos peixes, os órgãos frequentemente afetados são as brânquias, fígado e trato digestório (LIAO et al., 2011; LIU et al., 2011).

A exposição do verme *Lumbriculus variegatus*, a concentrações entre 0,1 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e oferecido como alimento, durante um mês, ao peixe *Oncorhynchus mykiss*, causou inibição do crescimento e acúmulo de Cd no intestino, fígado, rins, brânquias e carcaça (NG e WOOD, 2008). Concentrações de Cd entre 0,35 e 3,50 mg L^{-1} , em uma cadeia alimentar aquática experimental envolvendo uma alga *Chlorella vulgaris*, um zooplâncton *Moina macrocopa* e o peixe híbrido *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*, demonstraram que houve transferência do Cd entre os diferentes níveis da cadeia alimentar, sendo encontrados resíduos nos músculos dos peixes sessenta dias após exposição (RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006). Larvas de quironomídeos (*Chironomus riparius*) expostos ao Cd através da água (288 $\mu\text{g Cd g PS}^{-1}$) e do sedimento (153 $\mu\text{g Cd g PS}^{-1}$), e

usados como alimento para o peixe *Danio rerio* durante sete dias, apresentaram elevadas concentrações de Cd no rim, fígado e intestino, e baixas concentrações nas brânquias e carcaça (BÉCHARD et al., 2008). Dutton e Fisher (2011) observaram que Cd e Hg(II) foram acumulados durante a transferência trófica de *Leptocheirus plumulosus* e *Lumbriculus variegatus* para o peixe *Fundulus heteroclitus*. Creighton e Twining (2010) avaliaram que *Artemia* sp. alimentadas com algas contaminadas foi uma melhor via de absorção de metais como Cd, Se e Zn para o peixe *Ambassis jacksoniensis* em relação à água, no entanto, o potencial de biomagnificação para os metais foi baixo. Liu et al. (2011) obtiveram diminuição da sobrevivência e crescimento, aumento do índice hepato-somático, alteração na atividade de enzimas hepáticas, alterações histológicas nas brânquias, fígado e baço de *Synechogobius hasta* expostos a concentrações entre 0 e 0,29 mg L⁻¹ de Cd na forma dissolvida por 15 dias. A exposição sub-crônica do peixe *Puntius gonionotus* a 0,06 mg L⁻¹ de Cd na forma dissolvida durante 60 dias provocou hipertrofia e hiperplasia das lamelas primárias e secundárias das brânquias, vacuolização dos hepatócitos além de danos sobre os glomérulos e túbulos renais (WANGSONGSAK et al., 2007).

O peixe *Hyphessobrycon eques* conhecido como *mato-grosso* é um consumidor secundário encontrado em diversos ambientes de água doce do país. Esta espécie possui pequeno porte, faz parte das cadeias alimentares e são capazes de acumular elevadas concentrações de metais em ambientes contaminados. Esta espécie vem sendo indicada em pesquisas na área de ecotoxicologia por apresentar sensibilidade aos agentes tóxicos e fácil manejo em laboratório (SOTERO-SANTOS et al., 2007; CRUZ et al., 2008; CARRASCHI et al., 2011). No entanto, esses estudos apresentam as respostas de toxicidade a partir da exposição através da água. Por isso, esta pesquisa procurou investigar os efeitos tóxicos da exposição ao Cd através de uma cadeia trófica.

É importante observar que o tempo, a concentração e a via de exposição são fatores importantes na determinação dos efeitos tóxicos do Cd sobre os peixes. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon eques* a partir da exposição através de uma cadeia alimentar constituída por cladóceros (*Simocephalus serrulatus*) e algas (*Scenedesmus quadricauda*) contaminados com esse metal. Como os efeitos de metais como o Cd sobre peixes através da água já foram bastante relatados na literatura (MATZ et al., 2007; WANGSONGSAK et al., 2007; KRUMSCHNABEL et al., 2010; LIU et al., 2011), o entendimento da toxicidade desse metal através da dieta é de grande importância para o esclarecimento do potencial de impacto ecológico nos ecossistemas de água doce e os efeitos em níveis superiores da cadeia trófica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Peixe *Hyphessobrycon eques*

Os peixes utilizados durante os experimentos foram obtidos comercialmente em uma loja de peixes ornamentais na cidade de São Carlos (SP, Brasil). Cinquenta peixes adultos entre machos e fêmeas foram transportados ao Laboratório de Plâncton da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e aclimatados às condições laboratoriais em um aquário com capacidade para 50 L. O aquário foi abastecido com água livre de cloro sob aeração constante. Os peixes permaneceram em observação durante um período de 15 dias, destinado à verificação da sanidade dos organismos e recuperação do estresse de transporte. A temperatura da água foi mantida em 25 ± 2 °C com auxílio de termostato. O fotoperíodo da sala de manutenção dos peixes 12:12 h (claro:escuro). As variáveis de pH e concentração de oxigênio dissolvido da água foram monitoradas durante o período experimental. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados com ração comercial para peixes ornamentais (*Tetra Collor Flakes*) com 42% de proteína bruta fornecida uma vez ao dia *ad libitum*. A alimentação dos peixes era complementada duas vezes por semana com organismos zooplancônicos da espécie *Simocephalus serrulatus*. Sobras de ração e fezes foram retiradas diariamente do aquário de manutenção com auxílio de um sifão.

2.2. Exposição do peixe ao cádmio

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para os aquários experimentais 24 h antes do início dos experimentos. A alimentação com ração foi então interrompida. Os aquários foram preenchidos com 3 L de água livre de cloro onde os peixes foram adicionados, totalizando cinco réplicas com um peixe por aquário. O peso médio dos organismos utilizados nos experimentos foi de $0,76 \pm 0,11$ g e tamanho médio de $4,34 \pm 0,86$ cm.

A exposição dos peixes ao Cd se deu através de uma cadeia alimentar experimental composta por um cladóceros dafínídeo da espécie *Simocephalus serrulatus* previamente alimentado com uma alga clorofícea da espécie *Scenedesmus quadricauda* intoxicada por Cd.

Cultivos de *S. quadricauda* foram expostos a uma concentração de Cd total dissolvido de $6,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ durante o período de 96 h. Ao final das 96 h de exposição, a

concentração de Cd total particulado acumulado pelas algas foi aproximadamente $4,0 \times 10^{-13}$ g Cd célula⁻¹ ou $7,2 \times 10^{-4}$ g Cd g PS⁻¹. O controle consistiu de cultivos da alga não contaminados com Cd. Após as 96 h, os cultivos foram centrifugados a 1000 rpm durante 10 min (centrífuga, Eppendorf 5702R), sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em água de cultivo de cladóceros e armazenadas em geladeira a 4 °C para posterior utilização como alimento para os cladóceros.

Cultivos de *S. serrulatus* foram alimentados com as algas *S. quadricauda* previamente expostas ao Cd durante um período de sete dias. As algas foram fornecidas diariamente na concentração de 10^4 células mL⁻¹ de cultivo. O controle consistiu em cultivos alimentados com algas não contaminadas com Cd. Durante a exposição, a água de cultivo dos organismos era parcialmente renovada a cada dois dias. A concentração de Cd total particulado acumulado nos cladóceros, ao final da exposição, foi de $1,5 \times 10^{-4}$ g Cd g PS⁻¹.

Após os sete dias de exposição dos cladóceros às algas contaminadas com Cd, os organismos foram coletados dos cultivos com auxílio de uma pipeta de Pasteur e fornecidos como alimento aos peixes previamente separados nos aquários experimentais.

Cada peixe recebeu uma quantidade de 100 unidades de cladóceros adultos por dia. O peso médio dos cladóceros adultos foi em média 87×10^{-6} g por organismo. Então os peixes foram alimentados com $8,7 \times 10^{-3}$ g de cladóceros contaminados com Cd por dia, equivalente a aproximadamente 1,15% do peso corporal do peixe. Todos os peixes adicionados foram consumidos não havendo sobras de alimento durante os experimentos.

A concentração aproximada de Cd fornecida aos peixes foi de $1,26 \times 10^{-6}$ g Cd dia⁻¹ (Tabela 1). Os peixes foram alimentados com os cladóceros previamente contaminados por sete dias. Os aquários experimentais foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo dos cultivos sob aeração constante. As fezes foram sifonadas dos aquários a cada dois dias. O volume de água perdido por evaporação ou durante o sifonamento foi repostado a cada dois dias. O peso dos organismos foi monitorado antes e depois do período de exposição.

As determinações das frações de Cd total dissolvido no cultivo das algas e Cd total particulado acumulado nos organismos (algas e cladóceros) foram realizadas através de espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS, Varian AA220, Austrália).

Tabela 1. Concentrações de Cd acumuladas nos organismos experimentais e utilizadas como alimento para o peixe *Hyphessobrycon eques*.

Concentrações de Cd	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	<i>Simocephalus serrulatus</i>
Total dissolvido	$6,8 \times 10^{-8}$ (mol L ⁻¹)	-
Total particulado	$4,0 \times 10^{-13}$ (g Cd célula ⁻¹)	$1,5 \times 10^{-4}$ (g Cd)
Peso cladóceros	-	87×10^{-6} (g)
Número de cladóceros dia⁻¹	-	100
Peso cladóceros dia⁻¹	-	$8,7 \times 10^{-3}$ (g)
Cd total acumulado dia⁻¹	-	$1,26 \times 10^{-6}$ (g Cd dia⁻¹)

2.3. Avaliação histológica

Ao final dos sete dias de exposição, os peixes foram coletados, mortos por secção medular e as brânquias e o fígado foram removidos. Os órgãos foram lavados em solução salina NaCl 0,9% e fixados por 24 h em glutaraldeído 2,5%, e em seguida glutaraldeído 0,5% em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,3 e armazenados.

As amostras de brânquias e fígado foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico 70, 80, 90 e 95%, permanecendo 1 h em cada solução perfazendo um total de 4 h. Em seguida, foram imersas em solução de álcool etílico 95% com metacrilato (Historesina Leica) por 4 h. As amostras foram deixadas “overnight” somente em metacrilato para posterior inclusão do tecido.

Os cortes histológicos das amostras incluídas em historesina foram efetuados com 3 µm de espessura para a confecção das lâminas. Os cortes foram corados em azul de toluidina no caso das brânquias, e azul de toluidina mais fucsina básica no caso do fígado. Os cortes foram avaliados aleatoriamente em 10 campos para cada amostra sob microscópio óptico (Olympus BX51) em aumento de 400 vezes. As imagens foram fotodocumentadas com câmara de vídeo acoplada para registro digital utilizando-se o software Motic Images Plus 2.0.

A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias e fígado foi avaliada de duas formas:

1) A partir do cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA) baseado na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para isso, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a lesão na seguinte escala:

a) Grau 1: ausência de alterações histopatológicas;

- b) Grau 2: ocorrência de lesões pontualmente localizadas;
- c) Grau 3: lesões amplamente distribuídas pelo órgão.

2) Pelo cálculo do Índice de Alterações Histopatológicas (IAH), com base na severidade de cada lesão (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNEDZIC, 1994). Para tanto, as alterações foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais (Tabela 2).

- a) Estágio I: que não comprometem o funcionamento do tecido;
- b) Estágio II: mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão;
- c) Estágio III: muito severas e irreversíveis.

O valor de IAH foi calculado para cada animal através da fórmula:

$$I = 10^0 \sum_{i=1}^a ai + 10^1 \sum_{i=1}^b bi + 10^2 \sum_{i=1}^c ci$$

Onde a = alterações de estágio I; b = alterações de estágio II; c = alterações de estágio III. O valor de I é dividido em categorias: 0-10 indicam um funcionamento normal do órgão; 11-20 indicam danos leves a moderados no órgão; 21-50 indicam danos de moderados a severos; valores superiores a 100 indicam danos irreparáveis no tecido.

Tabela 2. Alterações histopatológicas para avaliação de brânquias e fígado e respectivos estágios baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões.

Alterações			
	Estágio I	Estágio II	Estágio III
Brânquias	Hipertrofia do epitélio lamelar Hiperplasia do epitélio lamelar Congestão vascular Dilatação capilar Descolamento epitelial Constrição capilar Células cloreto Células mucosas Fusão das lamelas Edema	Aneurisma lamelar Ruptura epitelial (hemorragia)	Necrose focal Necrose total
Fígado	Hipertrofia nuclear / celular Atrofia nuclear /celular Aumento da frequência do número de vasos Deformação do contorno nuclear / celular Núcleos na periferia da célula Desarranjo dos cordões hepáticos Presença de melanomacrófagos Vacuolização citoplasmática Grânulos eosinófilos	Degeneração nuclear Núcleos picnóticos Ausência de nucléolo / núcleo Rompimento celular Estagnação biliar Ruptura de vasos Congestão	Necrose focal Necrose total

2.4. Análise estatística

As médias entre os resultados obtidos para os padrões observados nos dois grupos avaliados foram submetidas ao teste de normalidade *Teste de Shapiro-Wilk* e ao teste de homogeneidade da variância, *Teste de Levene*. Em seguida, os resultados foram analisados através da ANOVA e *Teste de Tukey* com 95% de confiança, a fim de se detectar diferenças significativas entre o controle e o tratamento com o metal. A análise estatística foi realizada através do programa Paleontological Statistics (*Past*) versão 2.08.

3. RESULTADOS

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para o peso fresco médio dos animais ao final do período de exposição. O peso fresco médio final dos organismos do grupo controle foi de $0,73 \pm 0,05$ g, enquanto que o peso fresco médio final dos organismos do grupo tratado foi de $0,68 \pm 0,09$ g.

As brânquias dos peixes avaliados têm organização estrutural comum aos teleósteos. O epitélio do filamento branquial é constituído de sete a dez camadas de células, sendo que a camada mais externa é constituída por células pavimentosas, células de cloreto e mucosas. O epitélio das lamelas é constituído por uma camada de células pavimentosas em contato com o meio aquático e uma camada de células indiferenciadas apoiada na membrana basal e no sistema de células pilares por onde passa o sangue para as trocas gasosas (Figura 1A).

A exposição ao Cd através da cadeia trófica não causou alterações severas no tecido branquial de *Hyphessobrycon eques* (Figura 1B, C e D). Os organismos expostos ao Cd através do alimento apresentaram uma ligeira hipertrofia do epitélio lamelar, com presença de células cloreto e de células mucosas. De acordo com a classificação pelo Valor Médio de Alteração (VMA) em função da incidência de lesões, pode-se observar que os efeitos são classificados em grau 1, ou seja, indica ausência de alterações histopatológicas.

Na Tabela 3, são apresentadas as frequências das alterações histopatológicas observadas nas brânquias ao final do período de exposição. As alterações ocorreram tanto nos animais tratados com Cd quanto nos animais controle. De acordo com o Índice de Alteração Histopatológica (IAH), os valores calculados foram entre 2,8 e 3,2 indicando lesões de estágio I, portanto, não comprometem o funcionamento do órgão. Na comparação entre os dois grupos avaliados, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em relação aos efeitos observados.

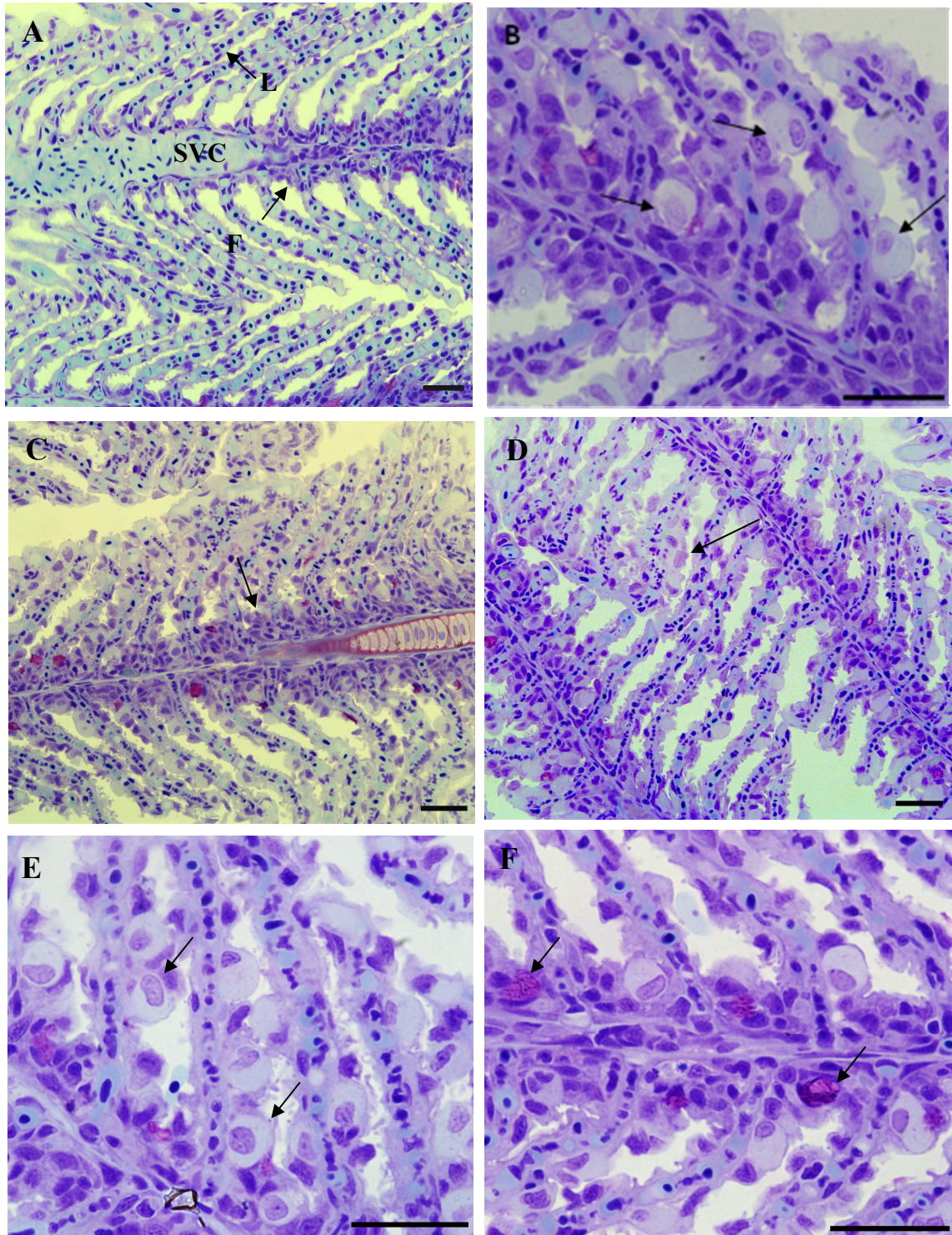


Figura 1. Fotomicrografia das brânquias de *Hyphessobrycon eques*. Controle (A). Visão panorâmica do filamento branquial (F), lamelas (L) e seio venoso central (SVC). Controle (B). Células cloreto. Histopatologias encontradas em brânquias dos peixes expostos ao cádmio via alimento na concentração $1,26 \times 10^{-6}$ g Cd dia⁻¹ (C, D, E e F). Hipertrofia do epitélio lamelar (C e D). Células cloreto (E). Células mucosas (F). Escala: 20 μ m. Coloração: Azul de toluidina.

Tabela 3. Frequências de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Hyphessobrycon eques* submetidas ao cádmio via alimento.

Alterações	Estágio das alterações	Controle	1,26x10 ⁻⁶ g Cd dia ⁻¹
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0	0
Fusão das lamelas	I	0	0
Dilatação capilar	I	0	0
Descolamento epitelial	I	0	0
Constrição capilar	I	0	0
Células mucosas	I	+	+
Células cloreto	I	++	++
Congestão vascular	I	0	0
Edema	I	0	0
Aneurisma lamelar	II	0	0
Ruptura epitelial (hemorragia)	II	0	0
Necrose pontual	III	0	0
Necrose total	III	0	0

0 = ausente; + = raramente frequente; ++ = frequente; +++ = extremamente frequente.

O fígado de *Hyphessobrycon eques* é constituído de túbulos anastomosados com parênquima homogêneo. Os hepatócitos têm formato hexagonal levemente arredondado com um núcleo esférico e central e nucléolo único também na posição central. Observa-se arranjo cordonal dos capilares sinusóides organizados.

As alterações histopatológicas do fígado foram observadas tanto nos peixes expostos ao Cd através da dieta alimentar quanto nos organismos do tratamento controle. De acordo com a Figura 2 (A, B, C e D), observou-se a presença de vacúolos no citoplasma, hipertrofia celular, deformação e degeneração da parede nuclear. De acordo com o VMA, podemos classificar a incidência das lesões como sendo de grau 2, ou seja, lesões pontualmente localizadas.

Na Tabela 4, são apresentadas as frequências das alterações histopatológicas encontradas no fígado. Observa-se que as lesões manifestaram-se no grupo controle e tratado. De acordo com o IAH, as lesões apresentadas podem ser classificadas nos estágios I e II e indicam a possibilidade de comprometimento do funcionamento normal do órgão. A comparação entre os dois tratamentos indica que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os dois grupos avaliados.

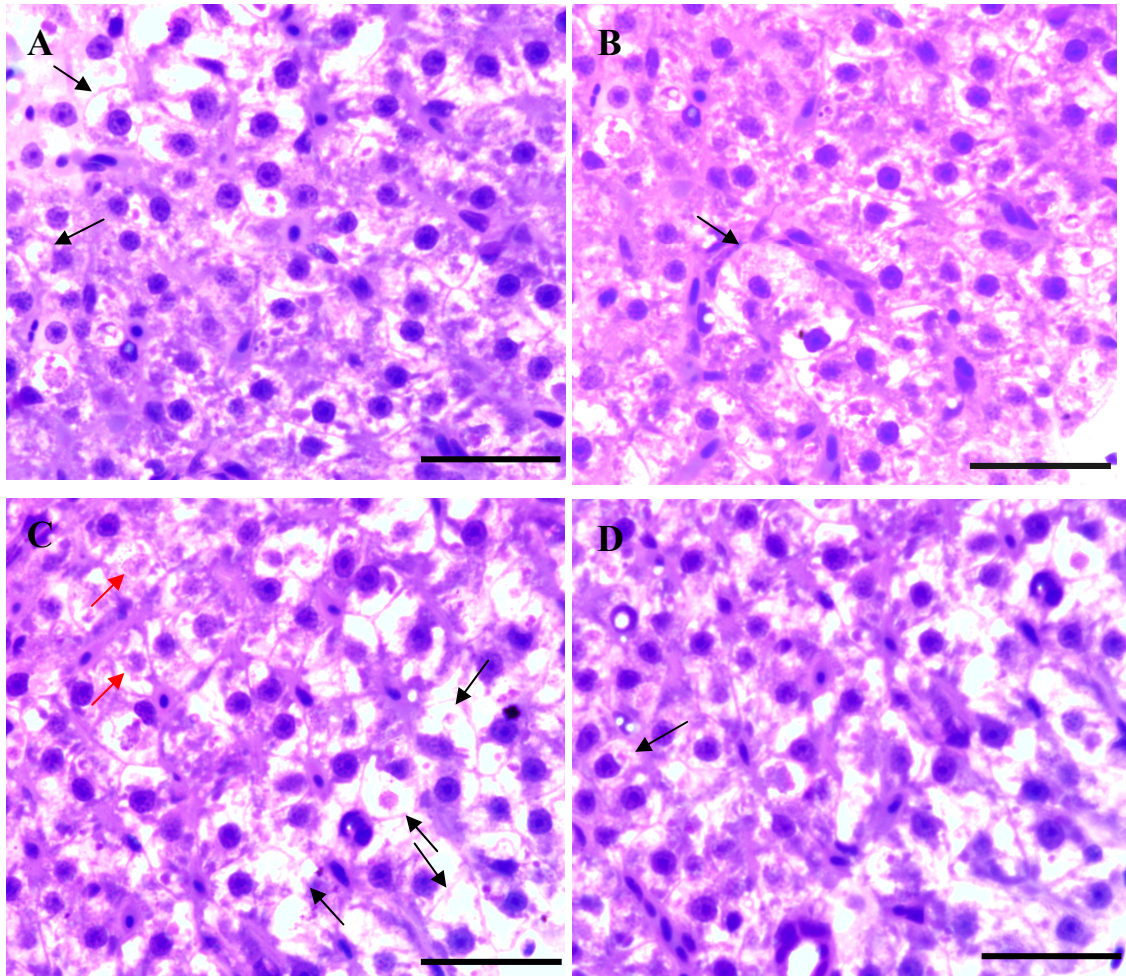


Figura 2. Fotomicrografia de fígado de *Hyphessobrycon eques*. Controle (A); a seta indica vacuolização citoplasmática. Histopatologias encontradas no fígado dos peixes expostos ao cádmio via alimento na concentração $1,26 \times 10^{-6}$ g Cd dia⁻¹ (B, C e D). Hipertrofia celular (B). Seta preta: vacuolização citoplasmática; Seta vermelha: degeneração nuclear (C). Deformação da parede nuclear (D). Escala: 20µm. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica.

Tabela 4. Frequências de alterações histopatológicas encontradas nos fígados de *Hyphessobrycon eques* expostos ao cádmio.

Alterações	Estágio das alterações	Controle	1,26x10⁻⁶ g Cd dia⁻¹
Hipertrofia nuclear	I	0	0
Hipertrofia celular	I	0	+
Atrofia nuclear	I	0	0
Atrofia celular	I	0	0
Aumento da frequência do número de vasos	I	0	0
Deformação do contorno nuclear	I	+	+
Deformação do contorno celular	I	++	++
Núcleos na periferia da célula	I	0	0
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	0	0
Presença de melanomacrófagos	I	0	0
Presença de vacúolos no citoplasma	I	+++	+++
Grânulos Eosinófilos	I	0	0
Gordura	I	0	0
Degeneração nuclear	II	+	+
Núcleos Picnóticos	II	0	0
Ausência de núcleo	II	0	0
Ausência de nucléolo	II	0	0
Rompimento celular	II	0	0
Ausência de membrana celular	II	0	0
Estagnação biliar	II	0	0
Ruptura de vasos	II	0	0
Congestão	II	0	0
Necrose Focal	III	0	0
Necrose Total	III	0	0

0 = ausente; + = raramente frequente; ++ = frequente; +++ = extremamente frequente.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises histológicas das brânquias e fígado de matogrosso (*Hyphessobrycon eques*) indicam que a exposição ao metal cádmio via cadeia trófica no período estudado não causou alterações significativas que levassem ao comprometimento dos órgãos estudados. As brânquias e fígados apresentaram características histológicas normais e poucas evidências de lesões patológicas manifestadas tanto pelo grupo controle quanto pelo grupo tratado. O peso fresco dos organismos avaliado ao final da exposição também não sofreu alteração em virtude do tratamento.

Durante as avaliações, foram observadas nas brânquias dos organismos controles e tratados uma ligeira hipertrofia do epitélio lamelar, com presença de células cloreto e células mucosas. Esses resultados indicam que as brânquias não foram afetadas pelo Cd através da dieta alimentar nas condições experimentais do presente estudo. Esta constatação se deve provavelmente à via de exposição a qual os organismos foram submetidos. Os animais foram expostos ao Cd através do alimento contaminado. Portanto, as brânquias não entraram em contato direto com o metal. Diferentemente de estudos por exposição através da água, onde ocorre contato direto com o metal na forma dissolvida e efeitos deletérios são mais evidentes.

O Cd é acumulado principalmente em tecidos metabolicamente ativos, tais como, rim, fígado e brânquias (LIU et al., 2011). De acordo com Wangsongsak et al., (2007) em comparação ao rim e ao fígado, as brânquias são os órgãos com menor capacidade de acumulação de Cd. No entanto, as brânquias têm mais da metade do seu desempenho funcional comprometido devido à presença de Cd seja através da água ou alimento (LIAO et al., 2011). Nas brânquias ocorrem os sítios de respiração envolvidos na osmoregulação, sendo que o acúmulo de metais nesses sítios tem efeitos sobre as funções relacionadas às trocas gasosas. Os danos frequentemente observados pela presença de Cd na água incluem hiperplasia das células pilares e epiteliais nas lamelas, hipertrofia do epitélio da lamela primária (WANGSONGSAK et al., 2007), edema das células epiteliais, aneurisma, hipertrofia e hiperplasia das células cloreto e células mucosas (THONPHON et al., 2003). A distância de difusão respiratória, ou seja, a distância de difusão sangue-água, é a distância que separa a lacuna de sangue das lamelas em relação ao meio externo. O levantamento do epitélio ou hiperplasia do epitélio resulta em aumento dessa distância de difusão, afetando então a troca de gases (WANGSONGSAK et al., 2007). Alguns estudos apontam que a hiperplasia das células cloreto ocorre em resposta à necessidade de eliminar o Cd absorvido pelas brânquias.

O Cd afeta o equilíbrio do cálcio e induz danos à estrutura das brânquias devido à redução do consumo de oxigênio e interrupção da função osmoregulatória (THOPHON et al., 2003; LIU et al., 2011;). Liu et al. (2011) relataram fusão, edema, hipertrofia e aumento do epitélio lamelar nas brânquias de *Synechogobius hasta* devido à exposição a $0,29 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd durante 15 dias. Não foram encontrados relatos na literatura de efeitos semelhantes nas brânquias devido à presença do Cd via alimento.

Da mesma forma, a análise histológica do fígado dos organismos expostos ou não ao Cd através da dieta não apresentaram diferenças significativas em relação aos efeitos observados. Os animais apresentaram em ambos os grupos presença de vacúolos no citoplasma, hipertrofia celular, deformação da parede celular e nuclear. Esses efeitos não foram relacionados ao tratamento, no entanto, indicam possibilidade de comprometimento do órgão afetado.

A ausência de sinais patológicos evidentes poderia ser atribuída ao tempo de exposição dos organismos ao Cd através do alimento. A exposição ao Cd ocorreu apenas durante sete dias. Acredita-se que esse tempo não foi suficiente para induzir alterações histológicas no grupo tratado. Grande parte dos trabalhos na literatura relaciona os efeitos do Cd, seja através da água ou da dieta, ao tempo de exposição (BERNTSSEN et al., 2001; RUANGSOMBOON e WONGRAT, 2006; NG e WOOD, 2008; LIU et al., 2011). Geralmente o tempo necessário para obter efeitos sobre variáveis estruturais são superiores a um mês de exposição. No presente estudo, o tempo de exposição foi limitado devido às condições experimentais. A quantidade de cladóceros utilizados durante o período experimental foi muito elevada, os cultivos, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, não possuíam organismos suficiente para o prolongamento dos experimentos.

Por outro lado a ausência de sinais patológicos no fígado dos peixes poderia ser devido à carga de Cd acumulada nos cladóceros (primeiro nível trófico). De acordo com Rainbow (2002) cladóceros expostos a metais não essenciais em baixas concentrações, são capazes de “regular” o acúmulo do metal no organismo e excretá-lo gradualmente, da mesma forma que ocorre com metais essenciais. Se o cladóceros *S. serrulatus* foi capaz de controlar o acúmulo de Cd, possivelmente esse metal não passaria para o segundo nível trófico na concentração utilizada nesse estudo.

Wangsongsak et al., (2007) observaram hipertrofia dos hepatócitos, presença de gotículas lipídios no citoplasma, dilatação do núcleo dos hepatócitos e necrose focal durante a exposição a $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd na forma dissolvida por 60 dias. Da mesma maneira, Thonphon et al. (2003) relataram que o fígado de *Lates calcarifer* expostos $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd

na água durante 90 dias apresentou congestão sanguínea nos vasos sinusóides, hipertrofia dos hepatócitos e vacúolos de lipídios. Berntssen et al. (2001) verificaram que a dieta produzida comercialmente contaminada com 10 a 125 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ de alimento causou aumento de enterócitos e apoptose no intestino em *Salmo salar*. Estudos demonstraram que a exposição do verme *Lumbriculus variegatus* a concentrações entre 0,1 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e oferecido como alimento, durante 1 mês, ao peixe *Oncorhynchus mykiss*, causou inibição do crescimento e acúmulo de Cd no intestino, fígado, rins, brânquias e carcaça (NG e WOOD, 2008). Larvas de quironomídeos (*Chironomus riparius*) expostos através da água (288 $\mu\text{g Cd g PS}^{-1}$) e sedimento (153 $\mu\text{g Cd g PS}^{-1}$) contaminados e usados como alimento para o peixe *Danio rerio* durante sete dias apresentaram elevadas concentrações de Cd no rim, fígado e intestino, e baixas concentrações nas brânquias e carcaça, evidenciando que o Cd pode ser adquirido através do alimento natural em peixe (BÉCHARD et al., 2008). Liu et al. (2011) verificaram em *Synechogobius hasta* congestão sanguínea, formação de vacuolos no citoplasma, pequenas hemorragias e presença de lipídios no fígado desses peixes expostos à concentrações entre 0 e 0,29 mg L^{-1} de Cd na forma dissolvida, por 15 dias.

Os resultados encontrados na literatura indicam que o fígado de peixes pode ser alvo da toxicidade pelo metal Cd, seja através da água ou via dieta alimentar. No entanto, o tempo de exposição e a carga de metal acumulado no primeiro nível trófico, podem ser determinantes no caso da toxicidade por baixas concentrações. Como observado no presente estudo, onde os organismos não evidenciaram alterações histopatológicas no fígado de *H. eques* expostos por sete dias ao Cd via cadeia trófica. É possível que se a exposição permanesse por mais tempo, ou ainda, se a carga de metal acumulado fosse maior, alterações histopatológicas pudessem ser detectadas. A análise histológica utilizada também não se mostrou eficiente na predição dos resultados. Um exame mais aprofundado de outras variáveis como a atividade da enzima metalotioneína, ou ainda, análise histológica do intestino e tecido muscular dos organismos, e a determinação do acúmulo de Cd nos órgãos estudados poderiam apresentar sinais de possíveis efeitos provocados pela presença do Cd através do alimento.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo evidenciam que o Cd fornecido através de uma cadeia trófica não causou alterações sobre a estrutura histológica de brânquias e fígado de *Hyphessobrycon eques* após sete dias de exposição. Esses resultados sugerem que

provavelmente o tempo de exposição e a carga de Cd acumulada nos cladóceros não foram suficientes para afetar os peixes, segundo nível da cadeia alimentar. Efeitos do Cd através do alimento podem ocorrer em peixes, no entanto, análises mais aprofundadas devem ser utilizadas para determinação de sinais sutis de toxicidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARATA, C. et al. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. **Aquatic Toxicology**, v. 61, p. 143-154, 2002.

BÉCHARD, K.M.; GILLIS, P.I.; WOOD, C.M. Trophic transfer of Cd from larval chironomids (*Chironomus riparius*) exposed via sediment or water routes, to zebrafish (*Danio rerio*): Tissue-specific and subcellular comparisons. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 310-321, 2008.

BERNTSSEN, M.H.G. et al. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 128, p. 299-310, 2001.

CARRASCHI, S.P. et al. Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe matogrosso (*Hyphessobrycon eques*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, p. 191-196, 2011.

CREIGHTON, N.; TWINING, J. Bioaccumulation from food and water of cadmium, selenium and zinc in an estuarine fish, *Ambassis jacksoniensis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1845-1821, 2010.

CRUZ, C. et al. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.3, p. 53-55, 2008.

DUTTON, J.; FISHER, N. Bioaccumulation of As, Cd, Cr, Hg(II), and MeHg in killifish (*Fundulus heteroclitus*) from amphipod and worm prey. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 3438-3447, 2011.

GOTO, D.; WALLACE, W.G. Relevance of intracellular partitioning of metals in prey to differential metal bioaccumulation among populations of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). **Marine Environmental Research**, v. 68, p. 257-267, 2009.

GOUVÊA, S.P.; VIEIRA, A.A.H.; LOMBARDI, A.T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, v. 60, p. 1332-1339, 2005.

KRUMSCHNABEL, G. et al. Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 73-85, 2010.

LIAO, C.M. et al. Assessing the impact of waterborne and dietborne cadmium toxicity on susceptibility risk for rainbow trout. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 503-513, 2011.

LIU, X.J.; NI, I.H.; WANG, W.X. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio rerio*. **Water Research**, v. 36, p. 4563-4569, 2002.

LIU, X.J. et al. Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to water cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1156-1163, 2011.

MATZ, C.J.; TREBLE, R.G.; KRONE, P.H. Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 44-48, 2007.

NG, T.Y.T.; WOOD, C.M. Trophic transfer and dietary toxicity of Cd from the oligochaete to the rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 87, p. 47-59, 2008.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: ____ **Sublethal and Chronic Effects of pollutants on Freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, v. 30, p. 339-352, 1994.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RUANGSOMBOON, S.; WONGRAT, L. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 15-20, 2006.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.

SEEBAUGH, D.R.; GOTO, D.; WALLACE, W.G. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 473-491, 2005.

SOFYAN, A.; PRICE, D.J.; BIRGE, W.J. Effects of aqueous, dietary and combined exposure of cadmium to *Ceriodaphnia dubia*. **Science of the Total Environment**, v. 385, p. 108-116, 2007.

SOTERO-SANTOS, R.B.; ROCHA, O.; POVINELLI, J. Toxicity of ferric chloride to aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 68, p. 628-636, 2007.

THONPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Journal of Environmental Pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.

WANGSONGSAK, A. et al. Alterations of organ histopathology and metallothionein mRNA expression in silver barb, *Puntius gonionotus* during subchronic exposure. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1341-1348, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi de grande importância para o entendimento do comportamento do metal Cd nos ambientes aquáticos, bem como do seu potencial de toxicidade aos organismos expostos. A pesquisa apresentou aspectos fundamentais da toxicidade através de uma cadeia alimentar, sendo de grande relevância para a compreensão dos principais parâmetros tóxicos apresentados pelos organismos envolvidos e as interferências nas suas interações, assim como nas interações com o ambiente.

A alga *Scenedesmus quadricauda* teve como característica uma elevada capacidade de acumulação de Cd, e ainda sofreu danos significativos sobre parâmetros fisiológicos importantes, como conteúdo de clorofila “a” e crescimento populacional. As algas desempenham importante função como produtores primários nos ambientes aquáticos, e eventuais efeitos sobre seus parâmetros fisiológicos acarretarão prejuízos a outros organismos que dependem da produtividade primária. O metal cádmio pode então causar toxicidade a organismos zooplanctônicos forrageadores devido à ingestão do alimento contaminado.

Quando o Cd acumula-se na cadeia alimentar aquática, o seu potencial de toxicidade é ampliado, devido à característica de persistência nos tecidos dos organismos vivos. Organismos zooplanctônicos como os cladóceros constituem uma ligação entre os produtores primários e os níveis tróficos superiores como os peixes. Os efeitos causados pelo Cd nesses organismos são capazes de ameaçar a integridade biológica dos ecossistemas aquáticos. Vários parâmetros do ciclo de vida dos organismos foram afetados indicando que a toxicidade por esse metal pode causar o desequilíbrio das cadeias alimentares aquáticas devido à redução persistente do número de indivíduos, evidenciada pelas significativas reduções das taxas de alimentação, produtividade e longevidade dos cladóceros estudados.

A transferência trófica do metal da microalga *Scenedesmus quadricauda* para o cladóceros *Simocephalus serrulatus* foi caracterizada por alterações dos parâmetros do ciclo de vida. No entanto, devido às concentrações testadas terem sido relativamente baixas, houve dificuldade na determinação das concentrações de Cd total acumulado pelos cladóceros expostos ao alimento contaminado. Este resultado mostra que o metal causou efeitos tóxicos a partir da exposição via alimento, mas não apresentou evidências de acumulação nos cladóceros. É possível que o metal tenha causado a toxicidade, mas ao mesmo tempo tenha sido “regulado” pelos organismos da mesma forma que ocorre para metais essenciais como, por exemplo, o cobre e o zinco (RAINBOW, 2002).

Esta constatação é suportada pelos sinais de recuperação apresentados pelos organismos diante da substituição do alimento contaminado por alimento livre de contaminação. A concentração do cádmio possivelmente foi “controlada” pelos organismos, os quais em condições ambientais favoráveis iniciaram a recuperação dos aspectos reprodutivos avaliados. Dessa forma, pode-se dizer que o Cd entrou na cadeia trófica via alimento, causou efeitos sobre os cladóceros, mas não permaneceu nos organismos e, portanto, não foi biomagnificado. Nesse caso, os cladóceros foram capazes de “regular” a concentração do Cd.

Esta hipótese é reforçada pela resposta observada na exposição dos peixes ao Cd via cadeia trófica. O metal não foi capaz de causar alterações na estrutura morfológica das brânquias e fígado dos peixes avaliados, sugerindo que o Cd não foi transferido para este nível da cadeia alimentar. Portanto, os peixes não foram alvos da toxicidade do Cd via cadeia trófica no período de tempo e na concentração avaliada.

Consideramos que este estudo apresentou aspectos importantes da transferência trófica do metal cádmio em uma cadeia alimentar aquática experimental. Os resultados obtidos apresentam informações ecologicamente relevantes e de extrema importância para o entendimento dos principais efeitos tóxicos do cádmio nos ecossistemas de água doce. As questões que foram discutidas nesta pesquisa contribuem para o enriquecimento dos conhecimentos atuais sobre o Cd e apontam para uma perspectiva, nem sempre considerada relevante nos estudos ecotoxicológicos, que consiste no controle da concentração de metais não essenciais em organismos zooplanctônicos. Acrescentamos ainda que estudos mais aprofundados que considerem essa possibilidade devam ser realizados no intuito de maiores esclarecimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR12648:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2005a. 24 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) **NBR13373:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2005b. 15 p.

AWASHI, M.; RAÍ, C.L. Toxicity of nickel, zinc and cadmium to nitrate uptake in free and immobilized cells of *Scenedesmus quadricauda*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 268-272, 2005.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 622 p.

BALDISSEROTTO, B.; CHOWDHURY, M.J.; WOOD, C.M. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from water, and their interactions in juvenile rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 72, p. 99-117, 2005.

BARATA, C. et al. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. **Aquatic Toxicology**, v. 61, p. 143-154, 2002.

BARBOSA, M.P.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Consumption of zooplanktonic organisms by *Astyanax fuscatus* Cuvier, 1819 (Osteichthyes, Characidae) in Lobo Broa Reservoir**, São Carlos, SP. 1984.

BATLEY, G.E.; APTE, S.C.; STAUBER, J.L. Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, p. 903-919, 2004.

BAUMANN, H.A.; MORRISON, L.; STENGEL, D. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1063-1075, 2009.

BÉCHARD, K.M.; GILLIS, P.I.; WOOD, C.M. Trophic transfer of Cd from larval chironomids (*Chironomus riparius*) exposed via sediment or water routes, to zebrafish (*Danio*

erio): Tissue-specific and subcellular comparisons. **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 310-321, 2008.

BERE, T.; TUNDISI, J.G. Toxicity and sorption kinetics of dissolved cadmium and chromium III on tropical freshwater phytoplankton in laboratory mesocosm experiments. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4772-4780, 2011.

BERRA, T. M. **Freshwater Fish Distribution**, San Diego, USA: Academic Press, 2001. 604 p.

BERNTSEN, M.H.G. et al. Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 128, p. 299-310, 2001.

BIELMYER, G.K.; GROSELL, M.; BRIX, K.V. Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 2063-2068, 2006.

BOSSUYT, B.T.A.; JANSSEN, C.R. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 145-154, 2005.

BUFFLE, J.; TERCIER-WAEBER, M.L. Voltametric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 172-191, 2005.

BRULAND, K.W.; DONAT, J.R.; HUTCHINS, D.A. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnology and Oceanography**, v. 36, p. 1555-1577, 1991.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O.; MARTINEZ-JERÓNIMO, F.; ESPINOSA-CHAVES, F. Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn, and a mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 160-164, 2000.

CARRASCHI, S.P. et al. Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe matogrosso (*Hyphessobrycon eques*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, p. 191-196, 2011.

CARR, H.P. et al. Characterization of cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 433-440, 1998.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo - Séries Relatórios - Apêndice A: Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem**. São Paulo, 2009. 44 p.

CHASIN, A.M.M.; CARDOSO, L.M.N. Cádmio. In: ____ . **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 263-298.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/pot/conama>>. Acesso 09 set. 2010.

COSTA, C.R. et al. Toxicity in aquatic environments and evaluation methods. **Quimica Nova** v. 31, p. 1820-1830, 2008.

CREIGHTON, N.; TWINING, J. Bioaccumulation from food and water of cadmium, selenium and zinc in an estuarine fish, *Ambassis jacksoniensis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1845-1821, 2010.

CRUZ, C. et al. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.3, p. 53-55, 2008.

DALLINGER R.; RAINBOW P.S. Metal: uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrate. In: ____ . **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. USA: Boca Raton, FL: Lewis publishers, 1993, p.119-131.

DEKKER, T.; KRIPS, O.E.; ADMIRAAL, W. Life history changes in the benthic cladoceran *Chydorus piger* induced by low concentrations of sediment-bound cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 56, p. 93-101, 2002.

De SCHAMPHELAERE, K.A.C. et al. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 233-244, 2004.

De SCHAMPHELAERE, K.A.C. et al. Chronic toxicity dietary copper to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 409-418, 2007.

DUTTON, J.; FISHER, N. Bioaccumulation of As, Cd, Cr, Hg(II), and MeHg in killifish (*Fundulus heteroclitus*) from amphipod and worm prey. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 3438-3447, 2011.

FARGASOVÁ, A.; BUMBÁLOVÁ, A.; HAVRÁNEK, E. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Mo^{+6} , Ni^{+2} , V^{+5}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. **Chemosphere**, v. 38, p. 1165-1173, 1999.

FISHER, N. S.; HOOK, S. E. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. **Toxicology**, v. 181-182, p. 531-536, 2002.

FRAYSSE, B. et al. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 144, p. 286-293, 2006.

FREITAS, E.C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: The importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 241-249, 2011.

GALEY, M.; RAINBOW, P.S. Uptake, accumulation and excretion by *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda) of zinc, cadmium and cobalt added to sewage sludge. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 47, p. 603-620, 1998.

GAVIS, J.; CHAMBERLIN, C.; LYSTAD, L. Coenobial cell number in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) as a function of growth rate in nitrate-limited chemostats. **Phycology**, v. 15, p. 273-275, 1979.

GORBI, G.; ZANNI, C.; CORRADI, M.G. Sulfur starvation and chromium tolerance in *Scenedesmus acutus*: A possible link between metal tolerance and the regulation of sulfur uptake/assimilation processes. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 457-464, 2007.

GOTO, D.; WALLACE, W.G. Relevance of intracellular partitioning of metals in prey to differential metal bioaccumulation among populations of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). **Marine Environmental Research**, v. 68, p. 257-267, 2009.

GOULET, R.R. et al. Dynamic multipathway modeling of Cd bioaccumulation in *Daphnia magna* using waterborne and dietborne exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 117-125, 2007.

GUAN, R.; WANG, W.X. Dietary assimilation and elimination of Cd, Se, and Zn by *Daphnia magna* at different metal concentrations. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 23, p. 2689-2698, 2004.

GUAN, R.; WANG, W.X. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. **Aquatic Toxicology**, v. 86, p. 217-229, 2006.

GUANZON, N.G.; NAKAHARA, H.; YOSHIDA, Y. Inhibitory effects of heavy-metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. **Fish Science**, v. 60, p. 379-384, 1994.

GUSSO-CHOUERI, P. K. et al. Effects of dietary copper on life-history traits of a tropical freshwater cladoceran. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Article in Press, 2011.

HANAZATO, T.; YASUNO, M. Influence of persistence period of an insecticide on recovery patterns of a zooplankton community in experimental ponds. **Environmental Pollution**, v. 67, p. 109-122, 1990.

HARRISON, S.E.; CURTIS, P.J. Comparative accumulation efficiency of ¹⁰⁹cadmium from natural food (*Hyallela azteca*) and artificial diet by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, p. 757-764, 1992.

HAURI, J.F.; HORNE, A.J. Reduction in labile copper in 7-day *Ceriodaphnia dubia* toxicity test due to the interaction with zooplankton food. **Chemosphere**, v.56, p.717-723, 2004.

HOFFMAN, D.J. et al. **Handbook of Ecotoxicology**. 2. ed. Florida, USA: Lewis Publishers, 1995. p. 755.

HOOK, S.E.; FISHER, N.S. Exposure to silver via food reduces egg production and viability in herbivorous copepods and cladocerans. **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 545-552, 2000.

HOOK, S.E.; FISHER, N.S. Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 20, p. 568-574, 2001.

HOOK, S.E.; FISHER, N.S. Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. **Marine Environmental Research**, v.53, p. 161-174, 2002.

HUANG, Z. et al. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. **Aquatic Toxicology**, v. 91, p.54-61, 2009.

HÜLSMANN, S. Reproductive potential of *Daphnia galeata* in relation to food conditions: implications for a changing size-structure of the populations. **Hydrobiologia**, v. 491, p. 35-46, 2001.

KNOPS, M.; ALTENBURGER, R.; SEGER, H. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 53, p. 79-90, 2001.

KOBAYASHI, I. et al. Relief of arsenate toxicity by Cd-stimulated phytochelatin synthesis in the green alga *Clamydomonas reinhardtii*. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 94-101, 2006.

KRUMSCHNABEL, G. et al. Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 73-85, 2010.

LANGSTON, W.J.; BEBIANNO, M.J.; BURT, G.R. Metal handling strategies in mollusks. In: ____ **Metal metabolism in aquatic environments**. London: Chapman and Hall, 1998, p. 219-283.

LARINI, L. **Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Manole, 1993, 281 p.

LAWS, A. E. Metals. In: ____ **Aquatic pollution: an introductory text**. 3. ed. University of Hawaii: An interscience publishers, 2000, p. 351-451.

LEBORANS, G.F.; NOVILLO, A. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Olithodiscus luteus*. **Water Resources**, v.30, p.57-62, 1996.

LIAO, C.M. et al. Assessing the impact of waterborne and dietborne cadmium toxicity on susceptibility risk for rainbow trout. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 503-513, 2011.

LIU, X.J.; NI, I.H.; WANG, W.X. Trophic transfer of heavy metals from freshwater zooplankton *Daphnia magna* to zebrafish *Danio rerio*. **Water Research**, v. 36, p. 4563-4569, 2002.

LIU, X.J. et al. Antioxidant responses, hepatic intermediary metabolism, histology and ultrastructure in *Synechogobius hasta* exposed to water cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1156-1163, 2011.

LOMBARDI, A.T. et al. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, p. 74-78, 2007.

MACEK, J.K. Aquatic Toxicology: Fact or Fiction? **Environ Health Perspectives**, v. 34, p.159-163, 1980.

MALUF, J.C.C. Estudo dos metais traço (zinco, cádmio e chumbo) em duas regiões do complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape (SP) sob diferentes pressões antrópicas. 2009. 145 p. Dissertação (Ciências area de Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MANGAS-RAMÍREZ, E.; SARMA, S.S.S.; NANDINI, S. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) density and ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.216-222, 2004.

MASON, C. F. Biology of freshwater pollution. 2. ed. New York: John Willey and Sons, 1991, 351 p.

MASSON, A.Z.; JENKINS, K.D. Metal detoxification in aquatic organisms. In: ____ **Metal speciation and bioavailability in aquatic systems**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1995, p. 479-608.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; CRUZ-CISNEROS, J.L.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, L. A comparison of the response of *Simocephalus mixtus* (Cladocera) and *Daphnia magna* to contaminated freshwater sediments. **Ecology and Environmental Safety**, v. 71, p. 26-31, 2008.

MATHEUS, F.E. **Balço energético e seletividade alimentar de *Hyphessobrycon eques* e *Serrapinnus notomelas* (Pises, Characiformes)**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MATZ, C.J.; TREBLE, R.G.; KRONE, P.H. Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 44-48, 2007.

MIHUC, T.B.; MINSHALL, G.W. Trophic generalists vs. trophic specialists: implications for food web dynamics in post-fire streams. **Ecology**, v. 76, p. 2361-2372, 1995.

MINEQL+ version 4.62.3 Chemical equilibrium modeling system for windows environmental research software. Disponível em: <http://www.mineql.com/frames/index.html>. Acesso em 11 de maio de 2012.

MOREL, F.M.M.; HERING, J.G. **Principles and Applications of Aquatic Chemistry. A**. 2. ed. New York: Wiley-Interscience Publication, 1993, p. 588.

MUSCATELLO, J.R.; LIBER, K. Uranium uptake and depuration in the invertebrate *Chironomus tentans*. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1696-1701, 2010.

MUYSSSEN, B.T.A.; BOSSUYT, B.T.A.; JANSSEN, C.R. Inter- and intra-species variation in acute zinc tolerance of field-collected cladoceran populations. **Chemosphere**, v. 61, p. 1159-1167, 2005.

- NASSIRI, Y. et al. Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: an electron energy loss spectroscopy study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, p. 156-161, 1997.
- NG, T.Y.T.; WOOD, C.M. Trophic transfer and dietary toxicity of Cd from the oligochaete to the rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 87, p. 47-59, 2008.
- NOGUEIRA, P.F.M. et al. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) expolysaccharidae on copper toxicity to *Simocephalus seerulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater Biology**, v. 50, p. 1560-1567, 2005.
- ORCHARD, S.J. et al. A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran *Moinodaphnia macleayi*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 12-19, 2002.
- PEÑA-CASTRO, J.M. et al. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. **Chemosphere**, v. 57, p. 1629-1636, 2004.
- PERALES-VELA, H.V. et al. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**, v. 67, p. 2274-2281, 2007.
- PESTANA, J.L.T.; Ré, A.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. Effects of Cadmium and Zinco on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). **Chemosphere**, v. 68, p. 1556-1562, 2007.
- PRASSAD, M.N. et al. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type (WT 2137) and cell wall deficient mutant strain (CW 15). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 306-311, 1998.
- PRATAP, H.B. et al. Effects of waterborn and dietary cadmium on plasma ions of teleost *Oreochromis mossambicus* in relation to water calcium levels. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, p. 568-575, 1989.
- PRINCE, N.M.; MOREL, F.M.M. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. **Nature**, v. 344, p. 658-660.

RAINBOW, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, p. 497-507, 2002.

RAINBOW, P.S.; SMITH, B.D. Trophic transfer of trace metals: Subcellular compartmentalisation in bivalve prey and comparative assimilation efficiencies of two invertebrate predators. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 390, p. 143-148, 2010.

RAINBOW, P.S.; LUOMA, S.N.; WANG, W.X. Trophically available metal – A variable feast. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2347-2349, 2011.

RAND, G.M. Introduction to aquatic toxicology. In: ____ **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. Palm Beach, Florida: Taylor and Francis Publishers, 1995, p. 3-66 p.

REICHMUTH J.M.; WEIS, P.; WEIS, J.S. Bioaccumulation and depuration of metals in blue crabs (*Callinectes sapidus*) from a contaminated and clean estuary. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 361-368, 2010)

REINFELDER, J.R. et al. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Science of the Total Environment**, v. 219, p. 117-135, 1998.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Effects of interaction between algal densities and cadmium concentration on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 765-773, 2008.

RODGHER, S. et al. Change in life parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 826-833, 2008.

RODGHER, S.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G. Evaluation onto life cycle parameters of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to 36 days dietary copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1748-1753, 2009.

ROSINI, F. et al. Resolução CONAMA nº 357 e técnicas espectroanalíticas: meios adequados aos fins? **Revista Analítica**, v. 22, p. 74-85, 2006.

RUANGSOMBOON, S.; WONGRAT, L. Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 15-20, 2006.

SHAMIK, J.B.B. Dose-dependent uptake and *Eichornia*-induced elimination of cadmium in various organs of the freshwater mussel, *Lamellidens marginalis* (Linn.). **Ecological Engineering**, v. 12, p. 207-229, 1999.

SOFYAN, A.; SHAW, J.R.; BIRGE, W.J. Metal transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 25, p. 1034-1041, 2006.

SOFYAN, A.; PRICE, D.J.; BIRGE, W.J. Effects of aqueous, dietary and combined exposure of cadmium to *Ceriodaphnia dubia*. **Science of the Total Environment**, v. 385, p. 108-116, 2007.

SOTERO-SANTOS, R.B.; ROCHA, O.; POVINELLI, J. Toxicity of ferric chloride to aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 68, p. 628-636, 2007.

TAYLOR, G.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V. Surface binding contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 412-419, 1998.

TERRY, P.A.; STONE, W. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. **Chemosphere**, v. 47, p. 249-255, 2002.

TIMMERMANS, K.R. et al. Trace metals in a littoral food web. Concentrations in organisms, sediment and water. **Science of the Total Environment**, v. 87-88, p. 477-494, 1989.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151-173, 1977.

TSUJI, N. et al. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine alga, *Dunaliella tertiolecta*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 453-459, 2003.

TWISS, M.R. et al. Coupling the use of the computer chemical speciation models and cultures techniques in laboratory investigations of trace metals toxicity. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 13, p. 9-24, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.EPA). **EPA 821/R-96-008**. Method 1669. Sampling ambient water for determination of trace metals at EPA water quality criteria level. Washington, DC, 1996.

Van GESTEL, C.A.M.; BREEMEN, D.E.M.; BAERSELMAN, R. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia Andrei* (Oligochaeta, Annelida). **Science of the Total Environment, Supplement 1**, v. 134, p. 585-597, 1993.

VILLARROEL, M.J. et al. *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 40-46, 1999.

WALLACE, W.G.; LEE, B.G.; LUOMA, N.S. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. 1. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). **Marine Ecology Progress Series**, v. 249, p. 183-197, 2003.

WANG, W.X.; KE, C. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. **Aquatic Toxicology**, v. 52, p. 153-165, 2002.

WANG, Z.; YAN, C.; ZHANG, X. Acute and chronic cadmium toxicity to a saltwater cladoceran *Moina monogolica* Daday and its relative importance. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 47-54, 2009.

WANGSONGSAK, A. et al. Alterations of organ histopathology and metallothionein mRNA expression in silver barb, *Puntius gonionotus* during subchronic exposure. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1341-1348, 2007.

WEITZMAN, S.H.; PALMER, L. A new species of *Hyphessobrycon* (Teleostei: Characidae) from Neblina region of Venezuela and Brazil, with comments on the putative 'rosy tetra clade'. **Ichthyology Exploration of Freshwater**, v. 7, p. 209-242, 1997.

WREN, C.D., HARRIS, S., HARTTRUP, N. Ecotoxicology of Mercury and Cadmium. In: ____ **Handbook of Ecotoxicology**. Florida, USA: Lewis Publishers, 1995, p. 392-423

XIE, L.; FUNK, D.H.; BUCHWALTER, B. Trophic transfer of Cd from natural periphyton to the grazing mayfly *Centroptilum triangulifer* in a life cycle test. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 272-277, 2010.

YU, R.Q.; WANG, W.X. Bioaccumulation of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 129, p. 443-456, 2004.

YU, Y. et al. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 49-56, 2007.

YU, R.Q.; FLEEGER, J.W. Effects of nutrient enrichment, depuration substrate, and body size on the trophic transfer of cadmium associated with microalgae to the benthic amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 3065-3072, 2006.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2006, 478 p.

ZBIGNIEW, T.; WOJCIECH, P. Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD isoforms in three *Scenedesmus* species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 323-331, 2006.

ZBIGNIEW, T. et al. Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 291-299, 2007.

ZHOU, W.; JUNEAU, P.; QIU, B. Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. **Chemosphere**, v. 65, p. 1738-1746, 2006.

ZIZEK, S. et al. Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining. **Science of the Total Environment**, v. 377, p. 407-415, 2007.