



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

Telefax: (016) 3351-8305

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Home page : <http://www.ufscar.br/~ppgern/>

E-mail : ppgern@power.ufscar.br



Efeito do alimento contaminado com cobre sobre o ciclo de vida e produção secundária de *Daphnia laevis*

Giseli Swerts Rocha

SÃO CARLOS

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676
Telefax: (016) 3351-8305
CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil
Home page : <http://www.ufscar.br/~ppgern/>
E-mail : ppgern@power.ufscar.br



Efeito do alimento contaminado com cobre sobre o ciclo de vida e produção secundária de *Daphnia laevis*

Giseli Swerts Rocha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS
2009

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

R672ea

Rocha, Giseli Swerts.

Efeito do alimento contaminado com cobre sobre o ciclo de vida e produção secundária de *Daphnia laevis* / Giseli Swerts Rocha. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia. 3. Produção secundária (Biologia). 4. Cobre. 5. *Pseudokirchneriella subcapitata*. I. Título.

CDD: 574.5263 (20^a)

Giseli Swerts Rocha

Efeito do alimento contanunado com cobre sobre o ciclo de vida e produção secundária de *Daphnia laevis*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 10 de junho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Presidente



Prof. Dra. Maria da Graça Gama Melão
(Orientadora)

1º Examinador



Prof. Dra. Odete Rocha
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski
UNIFAL/Alfenas-MG



Prof. Dra. Dávia Maria da Silva Matos
Coordenadora
PPGERN/UFSCar

“Fisicamente, habitamos um espaço, mas, sentimentalmente, somos habitados por uma memória. Memória que é a de um espaço e de um tempo, memória no interior da qual vivemos, como uma ilha entre dois mares: um que dizemos passado, outro que dizemos futuro. Podemos navegar no mar do passado próximo graças à memória pessoal que conservou a lembrança das suas rotas, mas para navegar no mar do passado remoto teremos de usar as memórias que o tempo acumulou, as memórias de um espaço continuamente transformado, tão fugidio como o próprio tempo. (...)

O que sabemos dos lugares é coincidirmos com eles durante um certo tempo no espaço que são. O lugar estava ali, a pessoa apareceu, depois a pessoa partiu, o lugar continuou, o lugar tinha feito a pessoa, a pessoa havia transformado o lugar.”

(José Saramago – Palavras para uma cidade)

“Não fuja de si mesmo. O grande encontro é com você. (...) Errar faz parte da vida. Por mais que sejamos competentes e queiramos acertar sempre, errar é uma característica de quem está no jogo. Lembre-se de que Deus está sempre com você, por mais angustiante que seja a situação pela qual estiver passando. Sentir a Sua presença é o primeiro passo para ser capaz de superar qualquer obstáculo” (Roberto Shinyashiki)

À minha mãe, Rachel, exemplo de perseverança e fé.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelas pessoas e oportunidades especiais que sempre aparecem em minha vida.

À minha família, em especial à minha mãe por entender os momentos de ausência e distância, e, principalmente, pelos ensinamentos de valores como fé, respeito e humildade; e ao meu irmão Vinícius por ter contribuído financeiramente para a realização deste sonho durante o período que estive sem bolsa. Aos meus irmãos, Rodrigo e Luciane, pelo apoio de sempre. Aos meus sobrinhos, Yuri, Mari, Pê, Lucas, Isa e João Vítor, por tornarem minha vida mais alegre com pequenos gestos.

À professora Dr.^a Maria da Graça Gama Melão, pela orientação, ensinamentos e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

À professora Dr.^a Ana Teresa Lombardi pela co-orientação e auxílio na parte de metais.

Às meninas do laboratório Jaqueline, Viviane, em especial à Irene pelas longas conversas e ajuda no crescimento profissional.

Às biólogas Dr.^a Patrícia Franklin Mayrink Nogueira e Dr.^a Suzelei Rodgher que sempre estavam dispostas a me ajudar quando não compreendia alguma etapa do trabalho, me ensinando e me esclarecendo várias dúvidas.

À doutoranda Alessandra Emanuelle Tonietto pelo auxílio nas análises de cobre total e pelos ensinamentos transmitidos.

Às minhas amigas da faculdade, Kelly e Sueli pela torcida e apoio incondicional, além da amizade que sobrevive apesar do tempo e da distância.

Aos meus amigos de São Carlos (não vou listar para não ser injusta), pelas inúmeras alegrias e provas de amizade proporcionadas nestes 2 anos aqui. Pelos inúmeros bate-papos descontraídos e pelo apoio incondicional nas horas de dificuldade, em especial ao Ricardo, com o qual passei várias noites maravilhosas e também pude compartilhar alguns momentos difíceis.

Aos técnicos Luís e Airton pelo auxílio nas coletas e pelas longas conversas nas saídas de campo.

Às professoras Dr.^a Mirna Helena Regali Seleguin e Dr.^a Alaíde Fonseca Gessner, pelas sugestões fornecidas no Exame de Qualificação.

Às professoras Dr.^a Maria José dos Santos Wisniewski e Dr.^a Odete Rocha por aceitarem prontamente fazer parte da banca de defesa da presente dissertação.

A todos que sempre estiveram dispostos a me ajudar nas coletas e nos ensinamentos acerca de Limnologia e Ecologia.

Ao PPG ERN/UFSCar pelo apoio e estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto (Processo 2007/02073-4) e pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2007/02680-8).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	
Principais	23
Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
Os organismos estudados	24
Origem dos organismos	24
Manutenção dos organismos	25
Teste de toxicidade aguda	25
Análise de clorofila	26
Análise de cobre na alga	27
Exposição do cladóceros <i>Daphnia laevis</i> às células algais contaminadas com cobre	
Teste de toxicidade crônica	29
Efeitos sobre a bionomia	29
Efeitos sobre a produção secundária	30
Determinação da concentração de cobre livre	31
Efeitos sobre a atividade alimentar de <i>Daphnia laevis</i>	32
Análise de cobre em <i>Daphnia laevis</i>	33
Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES GERAIS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

Com o avanço da industrialização, houve um aumento na quantidade de substâncias despejadas sem tratamento na natureza. Muitas destas substâncias são tóxicas e podem causar efeitos adversos à biota aquática, podendo atingir o resto da cadeia trófica, incluindo o homem. Para a melhor compreensão dos efeitos da contaminação, há um crescente avanço no estudo da exposição de organismos de diferentes níveis tróficos ao contaminante e o acompanhamento de mudanças no seu desenvolvimento e reprodução. O cobre, elemento essencial em baixas concentrações, pode causar efeitos negativos em concentrações mais elevadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar as mudanças ocorridas em uma espécie zooplanctônica, *Daphnia laevis* (Crustacea, Cladocera), alimentada com algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) previamente expostas a diferentes concentrações de cobre. O acúmulo de metal foi quantificado tanto na alga quanto no cladóceros. Os animais foram acompanhados durante todo o seu ciclo de vida através da realização de testes de toxicidade crônica e, através de parâmetros bionômicos e cálculo de sua produção secundária, os tratamentos foram comparados a um controle. Os resultados encontrados sugerem que a exposição ao alimento contaminado influenciou diretamente na reprodução dos animais, sendo encontradas diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) no número total de ovos e de neonatos produzidos ao longo da vida do animal. Outro parâmetro que foi afetado significativamente foi a produção secundária dos animais, onde foram observadas mudanças principalmente no investimento destinado à reprodução, afetando a produção secundária total. Através dos resultados obtidos, consideramos a importância da captura do cobre através do alimento e de como a produção secundária, embora muito importante, é pouco explorada nos trabalhos ecotoxicológicos.

Palavras chave: *Daphnia laevis*; *Pseudokirchneriella subcapitata*; ecotoxicologia aquática; produção secundária; cobre

ABSTRACT

With the advance of industrialization, there was an increase in the quantity of substances discharged in nature without treatment. Many of these substances are toxic and can cause adverse effects to aquatic biota, and may affect the rest of the food chain, including humans. For better understanding of the effects of contamination, there is a growing progress in the study of exposure of organisms of different trophic levels of the contaminant and monitoring changes in their development and reproduction. Copper, an essential element at low concentrations, can cause adverse effects in higher concentrations. The aim of this study was to evaluate changes in a zooplankton species, *Daphnia laevis* (Crustacea, Cladocera) fed with algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) previously exposed to different concentrations of copper. The accumulation of metal was measured both in algae and in cladoceran. The animals were monitored throughout its life cycle through the testing of chronic toxicity and through bionomic parameters and calculation of their secondary production, the treatments were compared to a control. The results suggest that exposure to contaminated food directly influence the reproduction of animals, and found significant statistical differences ($p < 0.05$) in the total number of eggs and neonates produced over the life of the animal. Another parameter that was affected significantly was the secondary production of animals, where changes were observed mainly in the investment to reproduction, affecting the total secondary production. Through the results, consider the importance of the capture of copper through the food and how the secondary production, although very important, is not explored in ecotoxicological studies.

Keywords: *Daphnia laevis*; *Pseudokirchneriella subcapitata*; aquatic ecotoxicology; secondary production; copper

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Curva de calibração do eletrodo seletivo ao íon cobre, com o uso de tampão metálico	32
Figura 2: Valores médios de acúmulo de cobre (g) por célula de <i>P. subcapitata</i> exposta aos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L ⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L ⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L ⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L ⁻¹) As barras indicam o desvio-padrão.	37
Figura 3: Valores médios de acúmulo de cobre (g) por indivíduo de <i>D.laevis</i> exposta aos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L ⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L ⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L ⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L ⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.	38
Figura 4: Curva de crescimento médio individual de <i>Daphnia laevis</i> , cultivada em laboratório a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, alimentada com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (10^5 cél/mL), nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L ⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L ⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L ⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L ⁻¹).	39
Figura 5: Longevidade média para os tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L ⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L ⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L ⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L ⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.	40
Figura 6: Comprimento máximo para o Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L ⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L ⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L ⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L ⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.	41
Figura 7: Comprimento primípara para o Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L ⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L ⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L ⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L ⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L ⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.	42

Figura 8: Número médio de ovos acumulados/fêmea de *Daphnia laevis*, cultivada em laboratório a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* (10^5 cél/mL), nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). 43

Figura 9: Número médio de neonatos acumulados/fêmea de *Daphnia laevis*, cultivada em laboratório a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* (10^5 cél/mL), nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). 44

Figura 10: Porcentagem de eclosão de ovos para o Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). 45

Figura 11: Número de ovos e neonatos para os animais do Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). 46

Figura 12: Regressão linear peso/comprimento para *Daphnia laevis* e a equação de regressão 48

Figura 13: Produção individual diária média para Crescimento (Pc), Reprodução (Pr) e Total ($P = Pc + Pr$) para o Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). 49

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1: Valores de cobre total adicionado (mol L^{-1}), densidade celular (células mL^{-1}), cobre acumulado pelas algas (g célula^{-1}) e concentração de clorofila <i>a</i> (mg L^{-1}) após 96 horas de exposição da alga <i>P. subcapitata</i> ao cobre.	36
Tabela 2: Tamanho corporal e taxas de filtração e ingestão de <i>D.laevis</i> exposta aos diferentes tratamentos	36
Tabela 3: Valores médios (\pm DP) de desenvolvimento de <i>Daphnia laevis</i> (Cladocera, Daphniidae) alimentadas com alga <i>P. subcapitata</i> nos tratamentos Controle, T1 ($5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T2 ($8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T3 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), T4 ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e T5 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).	47

1 - INTRODUÇÃO

A água é um elemento essencial à vida. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro de atividades humanas, onde se destacam o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica, além de atividades de lazer e recreação.

As principais fontes de água doce do planeta provêm do escoamento de águas de superfície. Estas apresentam distribuição desigual na Terra, sendo que o Brasil possui uma das maiores disponibilidades de água doce do mundo (SHIKLOMNOV, 1993 *apud* TUNDISI et al., 2002). Estas reservas apresentam importância ecológica, econômica e social, tendo um papel fundamental no desenvolvimento.

As águas que são utilizadas para o abastecimento humano são captadas principalmente dos rios. Apesar disso, esses ambientes têm sido alvo de despejos de esgotos domésticos e industriais. Também afetam os ecossistemas aquáticos atividades como a irrigação, desflorestamento na região marginal aos corpos de água, mineração, entre outras.

Essas atividades podem resultar em poluição e eutrofização dos corpos d'água. A poluição é caracterizada por alterações químicas, físicas e biológicas no ambiente natural, atingindo mais diretamente o ar, a água e o solo, podendo afetar também a flora e a fauna. A eutrofização é o resultado do aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo nos ambientes aquáticos, havendo um aumento da produção primária, afetando toda a cadeia trófica. Uma forma grave e freqüente de contaminação dos aquíferos é o despejo de metais pesados (ESTEVES, 1998).

Os processos que ocorrem nos ambientes aquáticos são interdependentes. A introdução de qualquer substância na água acarreta alterações na sua qualidade. Essas substâncias nem sempre são favoráveis ao desenvolvimento e à sobrevivência dos organismos aquáticos (SIPAÚBA-TAVARES, 1994).

Uma das maneiras de se avaliar e detectar possíveis mudanças no corpo receptor, em consequência do lançamento de substâncias poluidoras, é o estudo de sua biota, já que os organismos aquáticos respondem rapidamente às variações do ambiente (BOZZELLI; HUSZAR, 2003).

A biota das águas interiores está sujeita a uma série de impactos decorrentes das atividades humanas tais como poluição, contaminação, introdução de substâncias tóxicas e remoção da vegetação ciliar nas proximidades dos corpos de água (TUNDISI et al., 2002).

A biota reflete a integridade ecológica dos ecossistemas (integridade física, química e biológica), evidenciando os efeitos dos diferentes agentes estressores e fornecendo uma medida agregada dos impactos (BARBOUR et al., 1999). As comunidades biológicas de ecossistemas aquáticos apresentam adaptações evolutivas a condições ambientais e apresentam limites de tolerância a diferentes alterações das mesmas (ALBA-TERCEDOR, 1996).

O plâncton é constituído pelo fitoplâncton e pelo zooplâncton. As microalgas fitoplanctônicas são os produtores primários que constituem a base da cadeia alimentar de herbivoria em ecossistemas aquáticos. Esses organismos servem como via de entrada de substâncias tóxicas nas cadeias alimentares aquáticas, por adsorção ou absorção dos íons metálicos (NOGUEIRA et al, 2005; LOMBARDI et al., 2002).

O zooplâncton compreende os animais que vivem em suspensão na água e apresentam capacidade de locomoção limitada. Na água doce, é composto por quatro grupos principais: Protozoa, Rotifera e duas subclasses de Crustacea, a dos Copepoda e a dos Cladocera. Estes animais estão sujeitos à dispersão por turbulência e outros movimentos da água, embora rotíferos, microcrustáceos e larvas de insetos possam percorrer distâncias consideráveis em águas calmas (WETZEL, 1993).

A comunidade zooplanctônica é composta por organismos com grande sensibilidade ambiental, que responde a diversos tipos de impactos, tanto pela alteração na quantidade dos organismos quanto na composição e diversidade da comunidade (COELHO-BOTELHO, 2004). Os organismos zooplanctônicos são comumente utilizados em testes de toxicidade principalmente pelo fato de serem espécies-chave em ecossistemas lacustres, assumindo a importante função de elo de transferência ao longo de cadeias alimentares aquáticas.

Os cladóceros apresentam várias adaptações ecológicas e eficientes mecanismos de dispersão, sendo encontrados em diferentes ambientes aquáticos, desde pequenas poças de água a grandes lagos (PAGGI, 1995). A maioria das espécies de Cladocera alimenta-se através da filtração de

partículas alimentares em suspensão na água, constituídas principalmente por bactérias, algas unicelulares, fungos e detritos.

Estes microcrustáceos são muito importantes na transferência de energia através da cadeia alimentar em ambientes aquáticos, já que possuem curto tempo de geração e alta eficiência reprodutiva, sendo as presas mais visadas do zooplâncton, tanto por vertebrados quanto por invertebrados (BERNARDI et al.,1987). Esses autores também ressaltam a importância da filtração herbívora realizada pelos cladóceros.

As espécies do gênero *Daphnia* são utilizadas como organismos-teste para a avaliação da toxicidade de várias substâncias. Algumas espécies, como *D. magna* e *D. similis* são padronizadas em organizações de regulamentação nacionais, como a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) e CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), e internacionais como a OECD (“Organization for Economic Cooperation and Development”).

A sensibilidade às substâncias tóxicas, facilidade de manutenção e sua ampla distribuição geográfica são alguns dos fatores que determinam a utilização de *Daphnia* sp como organismos-teste (APHA, 2005).

A observação e o acompanhamento da história de vida destes animais, como o crescimento corporal, desenvolvimento embrionário, fecundidade e longevidade, entre outras características, na presença ou não de contaminantes, podem fornecer importantes informações acerca de suas estratégias de desenvolvimento nos ambientes e respostas a situações de perturbação.

A partir dos dados de incremento em peso e formação de produtos reprodutivos de cada animal, é possível estimar a produção secundária individual, como o investimento em crescimento e reprodução. Segundo Bottrell et al (1976), os valores de peso individual e tempo de desenvolvimento embrionário são variáveis básicas para o cálculo da produção secundária das populações.

O crescimento e reprodução do zooplâncton são afetados não apenas pela quantidade, mas também pela qualidade do recurso alimentar (LEWIS, 1979). Baseado em tal afirmação, é interessante avaliar se há diferenças significativas na produção secundária de animais que recebem uma

alimentação na concentração recomendada para um bom desenvolvimento, porém expostos a substâncias tóxicas, comparados a um controle, onde o alimento não foi contaminado.

Segundo Rainbow (2002), a acumulação de metais por um invertebrado pode ser definido como a captura do elemento menos a sua eliminação, e este processo é constituído por três etapas: a captura; o transporte e distribuição e a excreção do metal pelo organismo. De acordo com a interação entre estes processos, cada invertebrado apresentará uma estratégia diferente de acumulação, sendo que alguns animais são mais sensíveis que outros a determinadas concentrações (RAINBOW; WANG, 2001).

Os invertebrados aquáticos podem apresentar diferentes estratégias em contato com os metais. O animal pode regular a concentração do metal, sendo que a captura e a excreção do metal são equivalentes, mantendo a concentração corporal constante; podem acumular sem excretar, porém quando a capacidade de estocagem é atingida, o metal passa a exercer efeitos tóxicos; e podem, ainda, acumular e excretar, quando os níveis são mais elevados do que a necessidade do organismo (RAINBOW, 2002).

Dentro dos ecossistemas aquáticos, um metal pode seguir diversos caminhos: interações iônicas, precipitação e acúmulo no sedimento, adsorção e absorção por microrganismos dentro da cadeia alimentar (SIGG; BEHRA, 2005). As principais causas de preocupações em relação à presença de metais no ambiente são sua persistência e toxicidade, uma vez que, no interior dos organismos, podem competir com nutrientes e, tendo afinidade por certas moléculas biologicamente importantes, tais como proteínas, poderão exercer efeitos tóxicos. Os metais não são degradáveis, fato que permite a sua acumulação tanto nos ambientes quanto nos organismos (BAIRD, 2002). Talvez os mais conhecidos relatos de contaminação por metal que afetaram o homem e causaram várias vítimas foram a Doença de Minamata e a Doença de Itai-Itai, ambas no Japão. A primeira foi causada pela contaminação de peixes por mercúrio e seu posterior consumo pelos habitantes de aldeias nas proximidades da baía de Minamata, nas décadas de 1950 e 1960. A contaminação foi oriunda de despejos de uma fábrica de PVC. A doença se caracteriza por distúrbios neurológicos, e estima-se que mais de 1700 pessoas foram afetadas, sendo 900 vítimas fatais. Já a segunda, foi causada pelo

excesso de cádmio nos solos onde era cultivado arroz, em uma região próxima ao rio Jintsu, no ano de 1946. A doença se caracteriza pela perda de minerais dos ossos, tornando-os flexíveis e causando sintomas reumáticos, o que causava muita dor nos afetados, por isso o nome da doença, que significa “dói-dói”. O cádmio ficou concentrado nos grãos e, aproximadamente, 200 pessoas foram afetadas, sendo 100 casos fatais (WIKIPÉDIA).

Os metais-traço geralmente são persistentes, tóxicos e bioacumulativos. Estes elementos se encontram no ambiente aquático na forma de íons hidratados livres ou complexados a ligantes orgânicos e inorgânicos, ou na forma sólida associado ao material particulado suspenso ou ao sedimento (STUMM; MORGAN, 1996).

O cobre é um elemento necessário para toda a biota, fundamental para o crescimento ótimo de plantas e animais. É um micronutriente essencial em ambientes aquáticos, podendo ser tóxico quando presente em concentrações mais elevadas do que a necessária para os organismos. A maioria dos crustáceos e moluscos, por exemplo, apresenta hemocianina, pigmento que contém cobre como principal carreador de oxigênio. Este metal é encontrado na crosta terrestre, sendo as poeiras a sua principal fonte natural, além dos vulcões, processos biogênicos, incêndios florestais, névoas aquáticas, precipitação e fluxo das águas que transportam as partículas, as quais podem se depositar e formar os sedimentos. Por ser um constituinte natural do solo, o cobre pode atingir as águas ribeirinhas por ação das chuvas ou pela movimentação do solo (PEDROZO; LIMA, 2001).

Estima-se que apenas 25% do total de cobre liberado para o ambiente seja de origem natural e o restante é oriundo de atividades antrópicas, como por exemplo, a queima do carvão utilizado como fonte de energia, além de processos da mineração e fundição (MOORE et al., 1997). Vários processos influenciam a disponibilidade de cobre no sistema aquático, tais como a complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, a bioacumulação e a troca entre sedimentos e água (WHO, 1998).

Alguns metais, denominados elementos-traço, são envolvidos em processos metabólicos fundamentais para a sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos. Esses elementos são necessários em concentrações diminutas aos organismos, acima das quais passa a ser tóxico.

Quando as concentrações ambientais extrapolam os valores ótimos para o funcionamento do organismo, começam a ocorrer os efeitos tóxicos (KATZ, 1975). O cobre é essencial em concentrações relativamente baixas e, além desta faixa, pode ser tóxico devido à sua alta reatividade com ligantes, incluindo grupos funcionais em biomoléculas essenciais dos organismos (MASON; JENKINS, 1995). Timmermans (1993) afirma que exposições a concentrações sub-letais dos metais traço, a longo prazo, podem causar mudanças no crescimento, ciclo de vida e na reprodução de invertebrados de água doce.

Cada espécie apresenta, para cada elemento-traço, uma faixa de concentração ótima, na qual as suas necessidades metabólicas são satisfeitas, assim como seu desenvolvimento ótimo é atingido (HOPKIN, 1989 *apud* DE SCHAMPHELAERE, 2003). Quando a concentração externa do elemento se torna muito alta ou muito baixa, a regulação homeostática pode não ser suficiente e a toxicidade ou a deficiência, respectivamente, podem ocorrer.

A toxicidade do metal para os organismos aquáticos é variável, sendo o cobre iônico livre uma das formas mais tóxicas do metal para o fitoplâncton (LOMBARDI et al., 2002) e para o zooplâncton (NOGUEIRA et al., 2005; SANTOS et al., 2008), já que são biodisponíveis, enquanto o cobre complexado à matéria orgânica, muitas vezes não causa danos aos organismos. Assim, a quantificação do metal em sua concentração total presente no ambiente não é um bom indicador para avaliar a toxicidade do elemento (Lombardi, 2000), sendo necessária a determinação do cobre livre para o estudo da biodisponibilidade do metal (TWISS, 2001).

O cobre tem alta afinidade por ácidos orgânicos, os quais provavelmente constituem parte da matéria orgânica dissolvida natural. A consequência desta alta afinidade é a formação de complexos inertes que, por sua vez, causam redução nas concentrações de cobre livre (LOMBARDI; VIEIRA, 1998).

O termo Ecotoxicologia foi sugerido por René Truhaut em 1969, porém sua definição aconteceu em 1976 como a ciência que estuda os efeitos das substâncias sobre os organismos vivos, incluindo a interação destas substâncias com o meio que estão inseridas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A partir de então, iniciaram-se pesquisas com o intuito de avaliar as relações entre contaminantes e a biota nos ambientes afetados. Devido à dificuldade de

compreensão e quantificação dos processos envolvendo a interação de substâncias tóxicas no ambiente aquático e a biota, os testes de toxicidade são importantes para o entendimento dos efeitos dos poluentes neste ambiente (RAND, 1995).

Muitos estudos ecotoxicológicos aquáticos envolvendo metais visam compreender a interação destes com os componentes do sistema, como a matéria orgânica natural (TONIETTO, 2006; NOGUEIRA, 2007; LOMBARDI; JARDIM, 1997; LORES et al., 1999; SANTOS, 2004) e os exopolissacarídeos produzidos pelo fitoplâncton (GOUVÊA et al., 2005; CHOUERI et al., 2007) e, conhecendo estas associações, pode-se inferir sobre como os metais ficam disponíveis para a biota.

Os organismos podem apresentar respostas diferentes quando expostos a agentes tóxicos, como morte precoce ou diminuição na reprodução ou crescimento. Independente da resposta, o ambiente será afetado como um todo, interferindo no tamanho da população e nas relações existentes no ecossistema afetado (CONIGLIO; BAUDO, 1989).

A concentração interna do metal em alguns organismos pode ser regulada por diminuição da entrada, ficando adsorvido na superfície corporal, ou pela excreção através de sistemas especializados (ALBERGONI et al., 1980). Estes processos não são raros em invertebrados, porém são restritos a alguns metais essenciais como o zinco e o cobre (RAINBOW; DALLINGER, 1993).

Os organismos podem ser submetidos a teste de toxicidade aguda ou crônica. Os testes agudos são de curta duração, geralmente entre 24 e 96 horas de exposição ao agente tóxico, sendo geralmente utilizados como parâmetros os valores de imobilidade ou mortalidade (VAN LEEUWEN, 1988). Nos testes crônicos, os organismos são expostos ao contaminante durante todo o seu ciclo de vida ou por um período significativo deste, no mínimo 10% do total, a fim de se avaliar os efeitos sub-letais na reprodução, desenvolvimento e comportamento (ADAMS; ROWLAND, 2002). Quando se analisam os efeitos tóxicos no ciclo de vida completo, é possível determinar as concentrações da substância que causam efeitos adversos significativos na sobrevivência, crescimento e reprodução, quando comparados a um controle (COONEY, 1995). Os ensaios de toxicidade crônica mais difundidos em escala

mundial são com *Daphnia* (21 dias) e *Ceriodaphnia* (7 dias) (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

Já foram realizados estudos para a avaliação dos contaminantes nos sedimentos e na água (RODGHER, 2001; JARDIM, 2004; CAMPAGNA, 2005; BOSTELMANN, 2006) e os efeitos dos metais em mesocosmos (GUSMÃO, 2004). Alguns autores analisam os resultados apresentados pelas algas na exposição ao agente contaminante e como o metal pode ficar biodisponível para a biota após ser absorvido e/ou adsorvido aos representantes do fitoplâncton (PETERSEN, 1982; JARDIM; PEARSON, 1984; LOMBARDI; VIEIRA, 1998a, LOMBARDI; VIEIRA, 1998b; LOMBARDI; VIEIRA, 1999; LOMBARDI et al., 2002; BOSSUYT; JANSSEN, 2004; LOMBARDI et al., 2005; DE SCHAMPHELAERE; JANSSEN, 2006; PERALES-VELA et al., 2007). Outros autores analisam o efeito do metal na produtividade fitoplanctônica (BRULAND et al., 1991; TWISS et al., 2006).

Em pesquisas com os cladóceros, as respostas observadas nos animais quando expostos aos metais podem fornecer informações sobre os mecanismos de resposta, podendo afetar variáveis relacionadas ao seu ciclo de vida, tais como longevidade e fecundidade (DE SCHAMPHELAERE et al., 2004; MUYSSSEN; JANSSEN, 2005; RODGHER, 2005; BOSSUYT; JANSSEN, 2005; DE SCHAMPHELAERE et al., 2007; MUYSSSEN; JANSSEN, 2007; RODGHER et al., 2008; RODGHER et al., 2009).

Em virtude da estreita relação dos organismos aquáticos com o meio circundante, a bioacumulação e a biomagnificação dos metais nas cadeias tróficas pode levar à toxicidade para a biota, inclusive ao homem. Portanto, estudos ecofisiológicos envolvendo indivíduos dos primeiros níveis tróficos, base das cadeias alimentares aquáticas, fornecem indicações sobre os efeitos desse agente estressor no ambiente, uma vez que atuam como via de entrada de metais tóxicos nas mesmas. Nesse contexto, estudos ecotoxicológicos são importantes para se tentar compreender os efeitos destas substâncias nos corpos de água e como a biota é afetada.

Os testes de toxicidade têm sido cada vez mais utilizados em programas de monitoramento ambiental, sendo ferramentas importantes para a avaliação dos impactos antrópicos sobre os ecossistemas, complementando as informações fornecidas pelos dados físicos e químicos. No entanto, são poucos

os exemplos na literatura de estudos de intoxicação de cladóceros via ingestão alimentar (RODGHER et al., 2008). Mais raros ainda são os estudos que avaliam os efeitos crônicos de um tóxico ao longo de todo o ciclo de vida do animal como realizado por Rodgher et al. (2009) uma vez que, segundo os protocolos para testes crônicos com cladóceros, os experimentos são conduzidos até a segunda postura de ovos. Efeitos sobre a produção secundária desses animais são praticamente desconhecidos.

Esta pesquisa analisou o efeito do cobre sobre o crescimento e bionomia de uma espécie de Cladocera (*Daphnia laevis*) e sobre sua fonte alimentar, representada por uma Chlorophyceae (*Pseudokirchneriella subcapitata*), considerando-se o ciclo de vida completo do animal. Este é um dos fatores diferenciais do presente estudo, além do cálculo da produção secundária para os animais expostos ao alimento contaminado, a fim de saber se há mudanças na alocação de energia, o que poderia alterar o funcionamento da comunidade.

2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a transferência de cobre numa cadeia alimentar de herbivoria, utilizando um produtor primário (a clorófitica *Pseudokirchneriella subcapitata*) contaminado com cobre e fornecido como alimento para *Daphnia laevis*, cladóceros usados como consumidores primários. Foi investigada a capacidade de acúmulo do metal, tanto na microalga, quanto no cladóceros, avaliando seus efeitos sobre o ciclo de vida do animal.

Objetivos específicos

- Cultivar, em condições controladas de laboratório, a microalga e o cladóceros utilizados nos experimentos de herbivoria;
- Determinar a concentração de cobre nos dois elos da cadeia (fitoplâncton e zooplâncton) antes e após os experimentos de herbivoria;
- Determinar a concentração de íons cobre livre no meio de cultivo de cada organismo;
- Avaliar a toxicidade do cobre para o cladóceros, via exposição alimentar, considerando os efeitos do metal sobre a produção secundária e bionomia dos animais.

3 - Materiais e métodos

Os organismos estudados

O produtor primário utilizado neste estudo foi a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Esta espécie de microalga é uma Chlorophyta unicelular, presente em massas de água doce e abundante em ambientes ricos em nutrientes. A escolha se deu em virtude da alta qualidade dessa espécie como fonte alimentar para o zooplâncton, sendo indicada pela norma brasileira para a alimentação dos dafinídeos (ABNT, 2004).

Para a escolha do cladóceros a ser estudado, foram realizados cultivos, em condições controladas de laboratório, de algumas espécies coletadas em corpos d'água da região de São Carlos, tais como *Daphnia gessneri*, *Daphnia laevis* e *Moina minuta*. No entanto, *D. laevis* foi considerada a mais adequada para o estudo, uma vez que foi de fácil manutenção e rápida aclimação ao laboratório, além de seu tamanho adequado para as análises de metais totais. *Daphnia laevis* possui uma forma geral alongada, com espinho da carapaça longo e comprimento entre 1,0 e 2,0 mm (ELMOOR-LOUREIRO, 1997); ocorrendo em ambientes naturais brasileiros, na região limnética e litorânea dos ecossistemas aquáticos dulcícolas.

Origem dos organismos estudados

O inóculo de *P. subcapitata* foi obtido no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

As populações do cladóceros produzidas em laboratório foram iniciadas a partir de animais coletados nos tanques de cultivo mantidos na Reserva Experimental do DEBE / UFSCar (*campus* UFSCar/São Carlos). As coletas foram realizadas com o auxílio de rede de plâncton de 68µm de abertura de malha, com arrastos horizontais e verticais. No laboratório, os organismos foram triados e aclimatados. Inicialmente os animais foram cultivados em água de seu ambiente de origem, a qual foi, aos poucos, substituída por água reconstituída. O uso de populações monoclonais foi evitado, procurando-se sempre cultivar uma amostra representativa da população e com coletas

constantes para manter sempre organismos novos na cultura estoque. Para os cultivos, foram seguidas as recomendações feitas por Vijverberg (1989).

Manutenção dos organismos em laboratório

A clorofícea *P. subcapitata* foi cultivada em meio de cultura L.C. Oligo (AFNOR, 1980), autoclavado por 20 minutos a 121°C em Erlenmeyer de 2000 mL de capacidade contendo 1000 mL de meio. Após a inoculação, que partiu de uma concentração estimada 1×10^4 células mL⁻¹, a cultura ficou sob iluminação de $100 \mu\text{E}^{-1}\text{m}^{-2} \text{ s}^{-2}$, fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e temperatura controlada em $23^\circ\text{C} \pm 2$ (APHA, 1995).

O cladóceros *D. laevis* foi mantido em condições controladas: temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro, usando água reconstituída como meio de cultivo (pH de 7,2, condutividade elétrica igual a $160 \mu\text{S cm}^{-1}$ e dureza de 42 mg L^{-1} de CaCO_3). A fonte alimentar do zooplâncton foi constituída por *P. subcapitata* à concentração de 10^5 cél.mL⁻¹ em fase exponencial de crescimento (ABNT, 2004). Para a análise do ciclo de vida, os animais foram individualizados em béqueres de polipropileno contendo 50 mL de água reconstituída e alga *P. subcapitata* na concentração de 10^5 cél.mL⁻¹, sendo mantidos em câmara incubadora (Nova Ética modelo 411-D), nas condições supracitadas. Diariamente, após a análise das características bionômicas e tomada de medidas dos animais, era feita a troca da água dos recipientes experimentais.

Testes de toxicidade aguda

Células de *P. subcapitata* em fase exponencial de crescimento foram expostas, por um período de 96 horas, à concentração nominal (total adicionado) de cobre de 5×10^{-7} , 8×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} e 10^{-5} mol.L⁻¹ de cobre. As soluções-teste de cobre foram feitas a partir de uma solução-estoque de $1,6354 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de CuCl_2 (Titrisol® Merck). A solução-estoque foi preparada utilizando-se água deionizada e filtrada em filtros de membrana de $0,22 \mu\text{m}$ de abertura de poro (Schleider & Schüll). Controles foram realizados

usando uma concentração nominal de cobre de 10^{-8} mol L⁻¹, a qual está originalmente presente no Meio L.C. Oligo. Células em fase exponencial de crescimento foram inoculadas dentro de cada frasco para fornecer uma densidade celular de aproximadamente 5×10^4 céls.mL⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicatas usando frascos de policarbonato. Os materiais envolvidos na manutenção da alga e nos testes de toxicidade foram previamente lavados com detergente neutro e deixados em solução de HNO₃ 1,0 mol L⁻¹ por 7 dias para a descontaminação.

Decorrido o período de 96 h de exposição da alga ao metal, as amostras foram coletadas e as células algais lavadas por meio de centrifugação (1000 rpm, por 10 minutos – Eppendorf Centrifuge 5702R) com meio de cultivo (L.C. Oligo) e ressuspendidas em água reconstituída, sendo repetido este procedimento por 3 vezes. A determinação da densidade celular foi realizada através de contagem de células ao microscópio óptico (Leica, DMLS) utilizando-se um hemocitômetro Improved Neubauer-Bright Line. Após a contagem do número de células, as suspensões algais expostas aos metais foram utilizadas como alimento para *D. laevis* na concentração de 10^5 células.mL⁻¹.

Análise de Clorofila a

Após o período de exposição ao metal, foram filtrados 25 mL de cada tratamento para a análise de clorofila. As amostras foram filtradas no escuro em filtro de fibra de vidro, com 0,7 µm de poro. Cada filtro foi dobrado ao meio, envolto em papel alumínio e levado ao freezer em um recipiente escuro com sílica gel, onde permaneceu até o momento da extração. Para a extração da clorofila, cada filtro foi colocado em um tubo de centrifuga com tampa, sendo acrescentada acetona 90% e, com o auxílio de um bastão de vidro, o mesmo foi macerado. Este procedimento foi realizado no escuro. Após este processo, as amostras foram levadas para o freezer, onde permaneceram por 24 horas.

Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 2800 rpm por 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5702R) e então transferidas para tubos limpos e o volume completado para 10 mL com acetona 90%. As amostras foram lidas em 2 comprimentos de onda (665 e 750 nm) em cubetas de 1 cm

de caminho óptico, sendo o branco constituído pela acetona 90%. Logo após, as amostras foram acidificadas com 2 gotas de HCl (0,1 N) e lidas novamente. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro HACH DR5000. Com os valores obtidos, foi calculada a concentração de clorofila *a*, segundo a fórmula (TALLING; DRIVER, 1963):

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 26,73 (E_b - E_a) \cdot V$$

Onde: E_b = diferença 665 nm – 750 nm sem acidificação

E_a = diferença 665 nm – 750 nm com acidificação

$$V = \frac{\text{Volume Extrato (mL)}}{\text{Volume Filtrado (L)} \cdot x1^*}$$

* Diâmetro da cubeta

Peso seco das algas

Para a determinação do peso seco das algas, foram filtrados 25 mL de cada tratamento (controle mais as cinco concentrações de cobre a que a alga foi exposta), em filtros de fibra de vidro, previamente secos e pesados, e levados à estufa por 72 horas à 65°C. Após resfriamento em dessecador, os filtros foram pesados em balança microanalítica Sartorius MC21S (1µg de precisão), sendo as determinações realizadas em trélicas para cada experimento. O peso seco foi calculado a partir da diferença do peso final e inicial dividido pelo número de células contidas no volume que foi filtrado. O resultado foi expresso em µg de peso seco por célula.

Análise de cobre na alga

Ao final dos experimentos com *P. subcapitata*, amostras de 5 mL foram coletadas dos erlenmeyers contendo as células algais contaminadas com metal e, posteriormente, filtradas em filtros de membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de porosidade e 22 mm de diâmetro, previamente lavados com ácido nítrico 1 mol.L⁻¹ por 24 horas. Os filtros foram secos a 65°C, durante 24 horas, dentro de frascos cilíndricos de teflon com tampa de rosca. A extração do cobre

foi feita adicionando-se, a cada filtro seco dentro dos frascos de teflon, 2 mL de $3 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3/1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HCl}$ (ácidos ultra-puros J.T. Baker) de modo que os filtros ficassem completamente cobertos pelo ácido. A digestão ocorreu por 48 horas a 65°C , como descrito em Lombardi et al (2002). Ao final deste período, todas as amostras tiveram o pH ajustado para 2 com solução de hidróxido de sódio e foram analisadas para a determinação de cobre total usando-se um polarógrafo EG&G PAR.

A concentração de cobre nas células algais foi determinada em 10 mL de amostra, utilizando voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV) através de adições de padrão de cobre. A solução padrão de metal utilizada foi preparada a partir de diluições da solução estoque comercial 1000 mg L^{-1} (Titrisol, Merck). As análises voltamétricas foram realizadas em um polarógrafo EG&G PAR M394 e um módulo de eletrodo de mercúrio HMDE EG&G PAR M303A. Os parâmetros da análise voltamétrica foram:

- potencial de deposição: $-1,2\text{V}$ (vs. Ag/AgCl);
- potencial inicial (E_i): -0.6V ;
- potencial final (E_f): $+0.1 \text{ V}$;
- velocidade de varredura de 8 m Vs^{-1} ;
- amplitude do pulso: 50 mV ;
- tempo de deposição: 300 segundos;
- purga inicial com nitrogênio ultra puro: 600 segundos
- purga entre as adições: 180 segundos.

Três filtros previamente lavados foram digeridos e analisados como brancos. O valor médio do branco foi subtraído do valor médio das amostras. Os valores de metal total foram expressos como $\text{g Cu. } \mu\text{g PS}^{-1}$ e g Cu por célula .

Exposição do cladóceros *D. laevis* às células algais contaminadas com cobre

Testes de toxicidade crônica

Neonatas com menos de 24 horas de vida foram isoladas em béqueres de policarbonato com 50 mL de meio de cultivo (água reconstituída + alimento contaminado) e transferidos para incubadora (Nova Ética modelo 411-D) a 25°C e fotoperíodo 12/12h luz/escuro. Os animais foram acompanhados até a morte, sendo realizadas observações diárias para o acompanhamento de suas fases de desenvolvimento, dos aspectos reprodutivos e de sobrevivência. Medidas diárias do comprimento do corpo foram feitas com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Leica MZ6), munido de uma ocular micrometrada. Dez réplicas foram utilizadas em cada experimento, sendo o meio substituído todos os dias após a observação.

Nos testes de toxicidade crônica, os cladóceros foram alimentados exclusivamente com células algais contaminadas com cobre. A cada 24 horas eram observados os mesmos parâmetros descritos acima, além da determinação de cobre livre no meio de cultivo. Para o controle, foram acompanhadas 10 réplicas em condições alimentares isentas de contaminação, até a morte dos indivíduos, tendo também sido feita a medida de cobre livre no meio.

Efeitos sobre a bionomia

A partir de vinte neonatos, inicialmente acompanhados, obteve-se, pelo menos, dez réplicas completas. Os neonatos de *D. laevis*, individualizados em béqueres de policarbonato contendo 50 mL de água reconstituída, foram alimentados diariamente com uma densidade 10^5 céls mL⁻¹ da alga *P. subcapitata* previamente exposta às concentrações de cobre total (cobre adicionado) de 5×10^{-7} , 8×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} e 10^{-5} mol.L⁻¹. Dados bionômicos de *D. laevis*, tais como o período de desenvolvimento embrionário, idade e comprimento da primípara (primeira postura dos ovos), comprimento máximo, fecundidade, intervalo na produção de ovos (intervalo de tempo entre uma

dada postura de ovos e a seguinte) e longevidade, foram obtidos durante o ciclo de vida dos indivíduos.

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo supracitadas. As variáveis bionômicas foram observadas em intervalos de 24 horas, evitando-se ao máximo as condições de estresse dos indivíduos. O acompanhamento das fases de desenvolvimento, bem como do comprimento do corpo dos indivíduos, foi feito com auxílio de um microscópio estereoscópio (Leica MZ6), com uma ocular milimetrada. Foram realizadas medidas diárias do comprimento do corpo. Trocas do meio e fornecimento de alimento foram efetuados a cada 24 horas. Um controle foi conduzido nas mesmas condições experimentais com células de alga *P. subcapitata* sem contaminação.

Efeito sobre a produção secundária

A biomassa individual dos cladóceros foi calculada a partir de equação matemática relacionando peso e comprimento, obtida através de medidas e pesagens de animais não fixados (secos a 60°C por 24 horas) em balança microanalítica Sartorius MC21S (legibilidade de 1µg). Para a construção da regressão linear relacionando peso e comprimento de *D. laevis*, foram utilizados dados de peso e comprimento de 150 neonatas (divididas em 5 réplicas), 40 jovens (divididos em 2 réplicas) e 50 adultos sem ovos (divididos em 5 réplicas), em um total de 240 animais, além de fêmeas ovadas, que possuíam um total de 89 ovos.

Para o cladóceros *D. laevis*, o cálculo da produtividade secundária foi feito pelo método descrito por Edmondson e Winberg (1971). A produção secundária individual total (P) foi calculada pela soma da produção relacionada ao crescimento (Pc) e da produção relacionada à reprodução (Pr). Os valores diários de Pc para cada indivíduo foram estimados pela conversão das medidas diárias do comprimento do animal em peso seco, por meio da relação matemática supracitada e, posteriormente, pelo cálculo do incremento diário em biomassa (peso final – peso inicial). Pc para todo o ciclo de vida corresponde à soma dos valores diários de Pc. Os valores de Pr foram obtidos pela multiplicação do número total de ovos produzido por cada fêmea, ao longo

de todo o seu ciclo de vida, pelo peso médio de cada ovo (Choueri et al, 2007). Todos os valores de produção foram expressos em mg ou μg de peso seco por indivíduo por dia ($\text{mgPS ind.}^{-1} \text{d}^{-1}$ ou $\mu\text{gPS ind.}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Determinação da concentração de cobre livre

O cobre foi analisado na forma iônica livre (Cu^{+2}) de acordo com metodologia descrita em Nogueira et al (2005). O cobre livre foi determinado no meio de cultivo do zooplâncton para acompanhamento da concentração de cobre que poderia ser ingerida pelos animais. A determinação foi feita através da técnica de potenciometria, usando-se eletrodos seletivos ao íon cobre (ISE). O tempo de equilíbrio foi determinado de acordo com a resposta do eletrodo. O eletrodo seletivo ao íon cobre (ORION) foi utilizado conjuntamente com um eletrodo de referência Ag/AgCl (ANALION). Temperatura constante foi mantida durante toda leitura.

A força iônica das amostras foi ajustada para 10^{-1} M com NaNO_3 ultrapuro (MicroSelect, Fluka, Switzerland). Para aumentar o limite de detecção do ISE para 10^{-12} M, a metodologia empregada no presente estudo fez uso de tampões metálicos. Os tampões metálicos foram utilizados para a confecção da curva de calibração (Figura 1). A solução de tampão metálico foi preparada conforme descrito em Jardim et al (1986) e modificado por Lombardi et al (2007). Para a estabilização da leitura, o tampão foi deixado por um período de aproximadamente 24 horas.

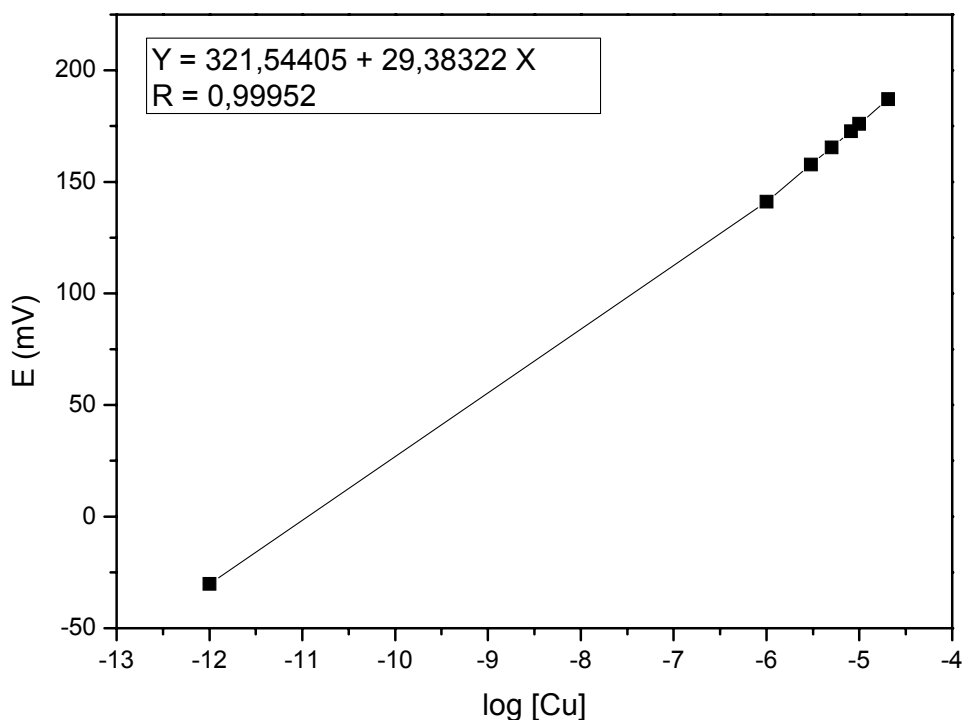


Figura 1: Curva de calibração do eletrodo seletivo ao íon cobre, com o uso de tampão metálico

Efeitos sobre a atividade alimentar de Daphnia laevis

Grupos de 2 juvenis de *D. laevis* (idade entre 4 e 5 dias), em oito réplicas, foram colocados em frascos testes contendo 100 mL água reconstituída e alimentados com uma densidade de 10^5 cel mL⁻¹ de *P. subcapitata* exposta anteriormente ao cobre. Alíquotas de 2 mL provenientes de cada tratamento foram coletadas após 24 h de exposição do zooplâncton ao alimento contendo metal. As amostras foram fixadas com lugol acético para contagem das células algais em microscópio ótico utilizando hemocitômetro Improved Neubauer-Bright Line. A concentração média de *P. subcapitata* foi obtida para as quatro réplicas e usadas para calcular a taxa de filtração (F : μl^{-1} ind⁻¹ h⁻¹) e taxa de ingestão (I : $\text{cél}^{-1}\text{ind}^{-1}\text{h}^{-1}$) usando-se a equação de Gauld (1951).

$$F = \frac{V}{n} \cdot \frac{(\ln C_0 - \ln C_t)}{t} - A$$

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

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

onde C_0 e C_t são as concentrações iniciais e finais de células algais (céls mL⁻¹), respectivamente. O tempo t representa a duração do experimento em horas, n é o número de organismos (ind) em volume V (mL) e A é o fator de correção para mudanças no controle com concentração final C_t após o tempo t . A expressão $\sqrt{C_0 \cdot C_t}$ expressa a média geométrica da concentração de células algais durante o tempo t .

Foi feito um branco para cada concentração, constituído apenas da solução algal, sem a presença de animais, a fim de se verificar se ocorrem mudanças nas concentrações celulares. Em caso positivo, a mudança observada seria descontada dos valores observados nas réplicas.

Análise de cobre em Daphnia laevis

Para a determinação da concentração de cobre nos animais, foram utilizados filtros de membrana de acetato de celulose, lavados em 1 mol.L⁻¹ HNO₃ por 24h. Os organismos foram secos a 60°C, por 48 horas nos filtros de membrana. Decorrido este período, os animais secos foram submetidos à digestão ácida em frascos de Teflon® com tampas rosqueadas e adicionado 2 mL de HNO₃ concentrado ultra-puro (J.T. Baker), de modo que o filtro ficasse encoberto pelo ácido e, posteriormente, incubado a 90°C por 48 h (modificado de Lores et al., 1999). Depois de retiradas da estufa, as amostras, resfriadas naturalmente até a temperatura ambiente, tiveram o pH ajustado para 2 com solução de hidróxido de sódio e foram levadas para a análise no polarógrafo. A concentração de cobre nos animais foi determinada em 10 mL de amostra, utilizando voltametria de redissolução anódica com pulso diferencial (DPASV) através de adições de padrão de cobre. A metodologia e condições de ajuste do aparelho foram as mesmas descritas para a microalga. Três filtros previamente lavados foram digeridos e analisados como brancos.

Análises estatísticas

Os resultados dos parâmetros de bionomia e de produção secundária foram submetidos ao teste de Tukey para verificar a ocorrência de diferenças estatisticamente significante entre os tratamentos e o controle. Para a aplicação deste teste foi utilizado o programa computacional “Graph Pad InStat versão 3.00”.

4 - Resultados

Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações de cobre total adicionado aos tratamentos referentes às algas, as densidades de células algais, o cobre acumulado pelas algas e os valores de clorofila *a* em cada tratamento. O cobre presente no controle representa aquele existente na composição do meio de cultivo.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de tamanho corporal médio e taxas de filtração e ingestão de *Daphnia laevis* nos diferentes tratamentos.

Tabela 1: Valores de cobre total adicionado (mol L^{-1}), íons cobre livre (mol.L^{-1}) no meio do zooplâncton, densidade celular (células mL^{-1}), cobre acumulado pelas algas (g célula^{-1}) e concentração de clorofila a (mg L^{-1}) após 96 horas de exposição da alga *P. subcapitata* ao cobre.

Tratamento	Cobre total adicionado	Íons cobre livre(M)	Densidade celular	Cobre acumulado	Clorofila a
Controle	0.8×10^{-7}	4.21×10^{-11}	8.7×10^6	5.82×10^{-16}	74,84 ($\pm 10,69$)
T1	5×10^{-7}	3.89×10^{-11}	5.52×10^6	$1,28 \times 10^{-15}$	167,51 ($\pm 50,52$)
T2	8×10^{-7}	1.38×10^{-9}	7.94×10^6	$7,04 \times 10^{-16}$	242,35 ($\pm 15,43$)
T3	1×10^{-6}	4.26×10^{-11}	19.5×10^6	$1,28 \times 10^{-15}$	192,46 ($\pm 28,29$)
T4	5×10^{-6}	3.21×10^{-10}	7.13×10^6	$2,74 \times 10^{-15}$	96,23 ($\pm 10,69$)
T5	1×10^{-5}	8.12×10^{-9}	7.25×10^6	$1,16 \times 10^{-14}$	35,64 ($\pm 6,17$)

Tabela 2: Cobre acumulado, Tamanho corporal (mm), Taxa de filtração ($\mu\text{l}^{-1} \text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) e Taxa de ingestão ($\text{l: cél}^{-1} \text{ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) de *D.laevis* exposta aos diferentes tratamentos

Tratamento	Cobre acumulado	Comprimento corporal*	Taxa filtração**	Taxa de ingestão**
Controle	$1,82 \times 10^{-9}$	1,33 ($\pm 0,41$)	1283,30	$10,68 \times 10^4$
T1	$2,77 \times 10^{-9}$	1,41 ($\pm 0,30$)	456,67	$4,93 \times 10^4$
T2	$1,88 \times 10^{-9}$	1,36 ($\pm 0,29$)	1714,00	$34,46 \times 10^4$
T3	$1,98 \times 10^{-9}$	1,28 ($\pm 0,34$)	587,50	$7,46 \times 10^4$
T4	$2,13 \times 10^{-9}$	1,38 ($\pm 0,32$)	2875,00	$36,60 \times 10^4$
T5	$1,91 \times 10^{-9}$	1,17 ($\pm 0,31$)	4050,00	$46,08 \times 10^4$

* n = 10; ** n = 3

Na figura 2 estão apresentados os valores médios do acúmulo do cobre por célula algal.

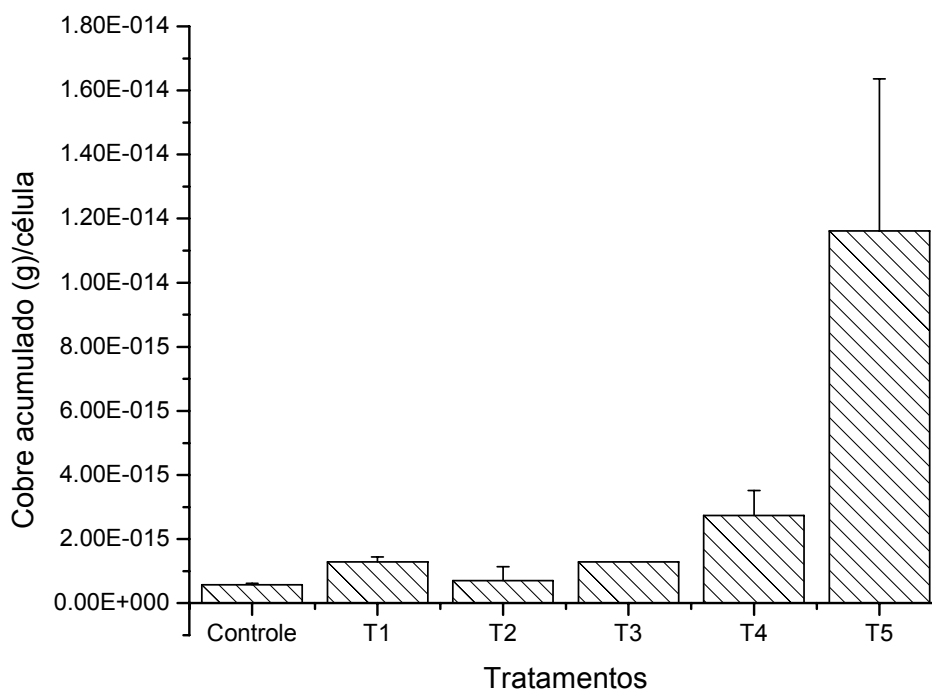


Figura 2: Valores médios de acúmulo de cobre (g) por célula de *P. subcapitata* exposta aos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.

Na figura 3 estão apresentados os valores acumulados médios por animal.

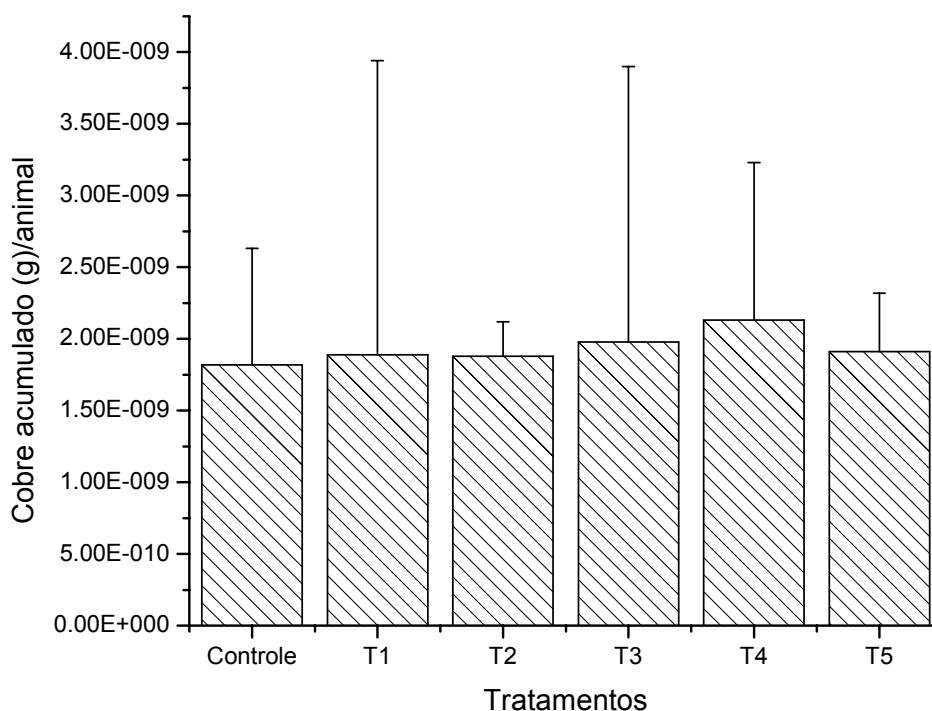


Figura 3: Valores médios de acúmulo de cobre (g) por indivíduo de *D.laevis* exposta aos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.

Na figura 4 estão apresentadas as curvas de crescimento médio individual de *D. laevis* alimentada com *P. subcapitata* no controle e nos tratamentos experimentais.

Observa-se que as curvas apresentam um padrão semelhante, ou seja, os animais em contínuo crescimento ao longo do ciclo de vida, sendo os maiores valores observados para o controle. Também pode-se notar a maior longevidade dos animais dos tratamentos T1 e T2 (31 dias), seguidos pelos tratamentos T3 e T4 (29 dias), controle (28 dias) e a menor para o T5 (24 dias).

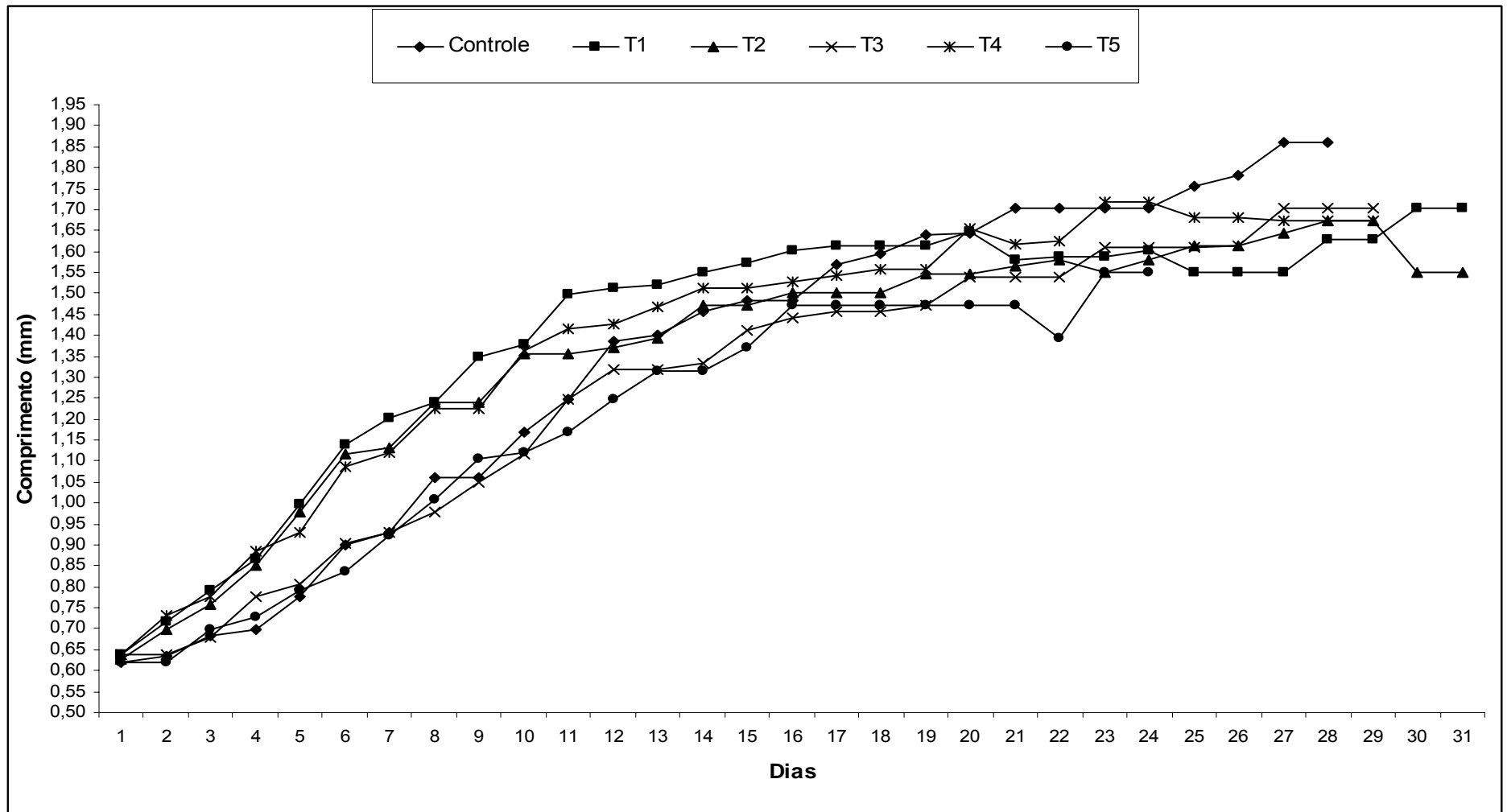


Figura 4: Curva de crescimento médio individual de *Daphnia laevis*, cultivada em laboratório a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* (10^5 cél/mL), nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L $^{-1}$), T2 (8×10^{-7} mol.L $^{-1}$), T3 (1×10^{-6} mol.L $^{-1}$), T4 (5×10^{-6} mol.L $^{-1}$) e T5 (1×10^{-5} mol.L $^{-1}$).

Na figura 5 são apresentados os dados de longevidade média para o controle e os demais tratamentos. A maior média de longevidade foi observada para o controle, seguidas pelos tratamentos T2, T3, T5, T4 e T1. Embora a longevidade máxima (dias) tenha sido observada para os representantes dos tratamentos T1 e T2, um maior número de indivíduos do tratamento controle sobreviveu até os 28 dias, aumentando a média deste tratamento.

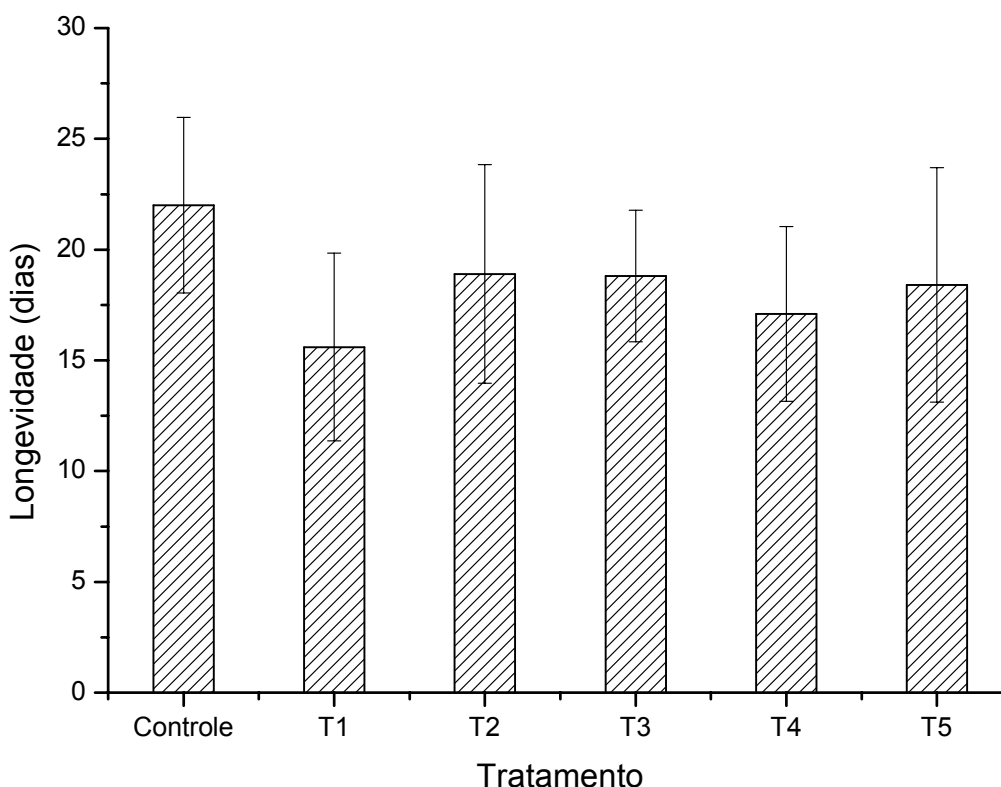


Figura 5: Longevidade média para os tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.

Na figura 6 são apresentadas as médias de comprimento máximo para o controle e para os tratamentos experimentais T1, T2, T3, T4 e T5. Pela figura, pode-se observar que os animais do tratamento T1 tiveram o maior valor, seguido pelo T2, enquanto T4 e controle apresentaram o mesmo valor. Em seguida, estão os animais do tratamento T3 e os do T5, que apresentaram os menores valores.

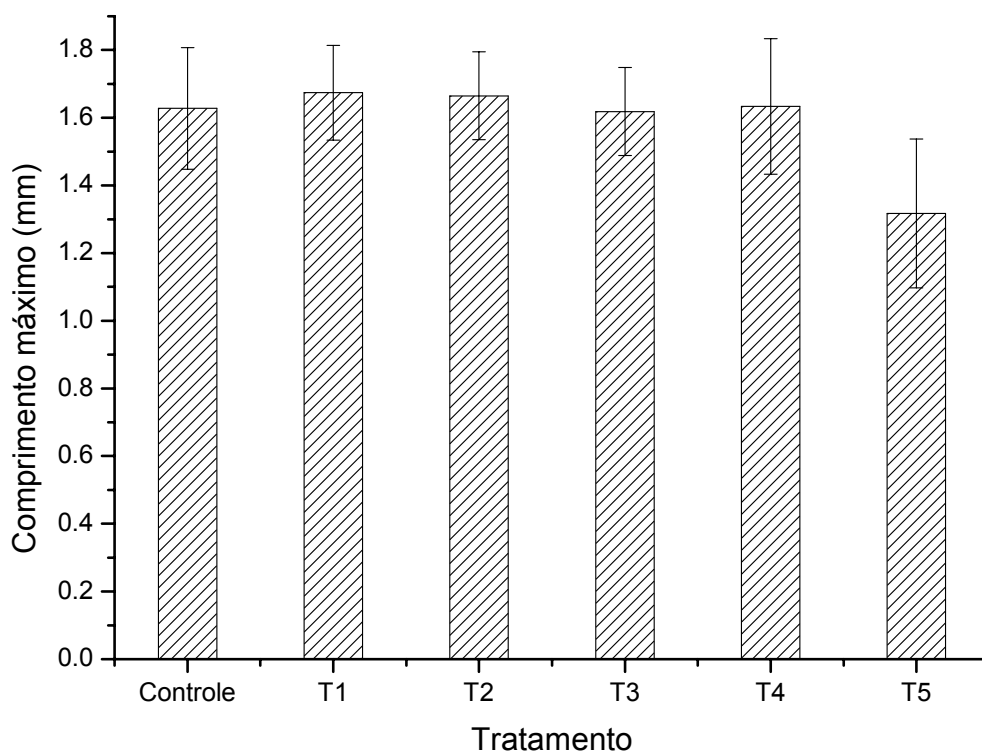


Figura 6: Comprimento máximo para o Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹). As barras indicam o desvio-padrão.

Na figura 7 são apresentados os dados de comprimento médio da primípara para o controle e os tratamentos experimentais. Os animais do tratamento T1 foram os que apresentaram os maiores valores de comprimento médio na primípara, seguidos pelo tratamento T4, controle, T3, T2 e T5, com os menores valores. Embora nos tratamentos controle, T1, T2 e T4 a primípara tenha sido, em média, no 6º dia, a do T3, no 7º e a do T5 no 8º dia, os animais não apresentaram comprimentos diferentes estatisticamente significantes relacionados à idade.

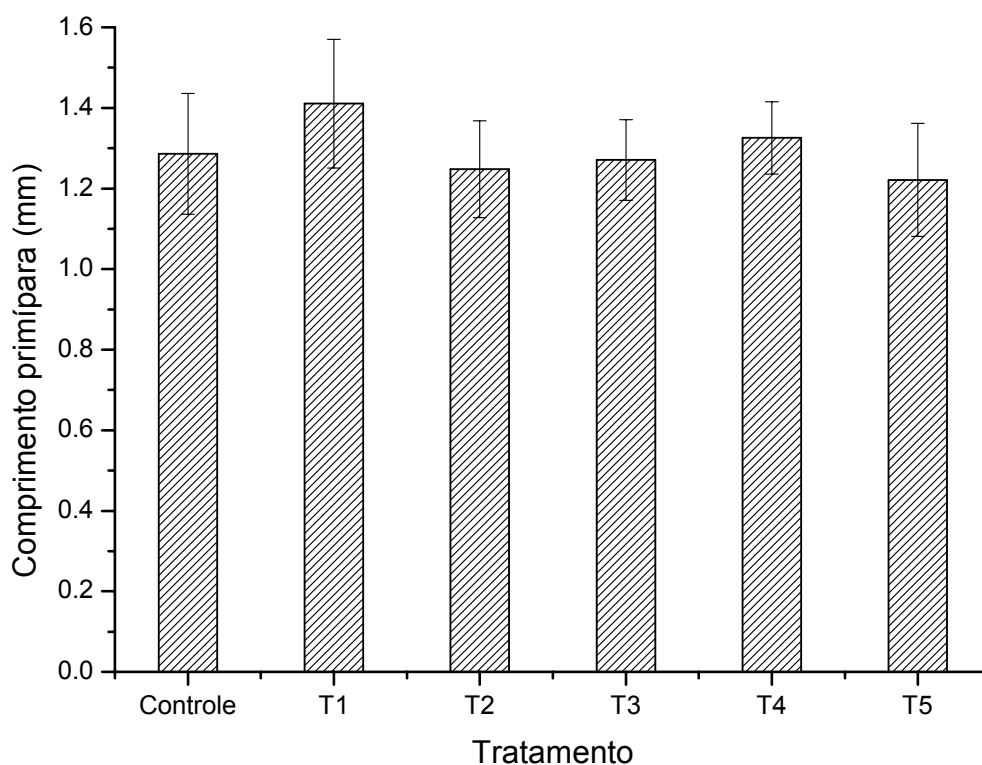


Figura 7: Comprimento primípara para o Controle, T1 ($5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T2 ($8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T3 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), T4 ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e T5 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). As barras indicam o desvio-padrão.

Na figura 8 são apresentadas curvas do número médio de ovos acumulados por fêmea de *D. laevis*, ao longo de todo o ciclo de vida dos animais, para o controle e para os tratamentos experimentais T1, T2, T3, T4 e T5. Nota-se um maior investimento na produção de ovos no tratamento T1 até o 19º dia, enquanto o controle, que apresentava menores valores, se igualou ao T1 no 20º dia, superando-o no 21º dia. Os animais do tratamento T4 foram os que apresentaram a terceira maior produção de ovos, seguida pelos animais dos tratamentos T2, T3 e T5, que apresentou os menores valores. A média de ovos acumulados apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os tratamentos T2, T3 e T5 comparados ao controle, e a mesma diferença foi observada entre os tratamentos T3 e T5 em relação ao T1, já o tratamento T2 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao T1.

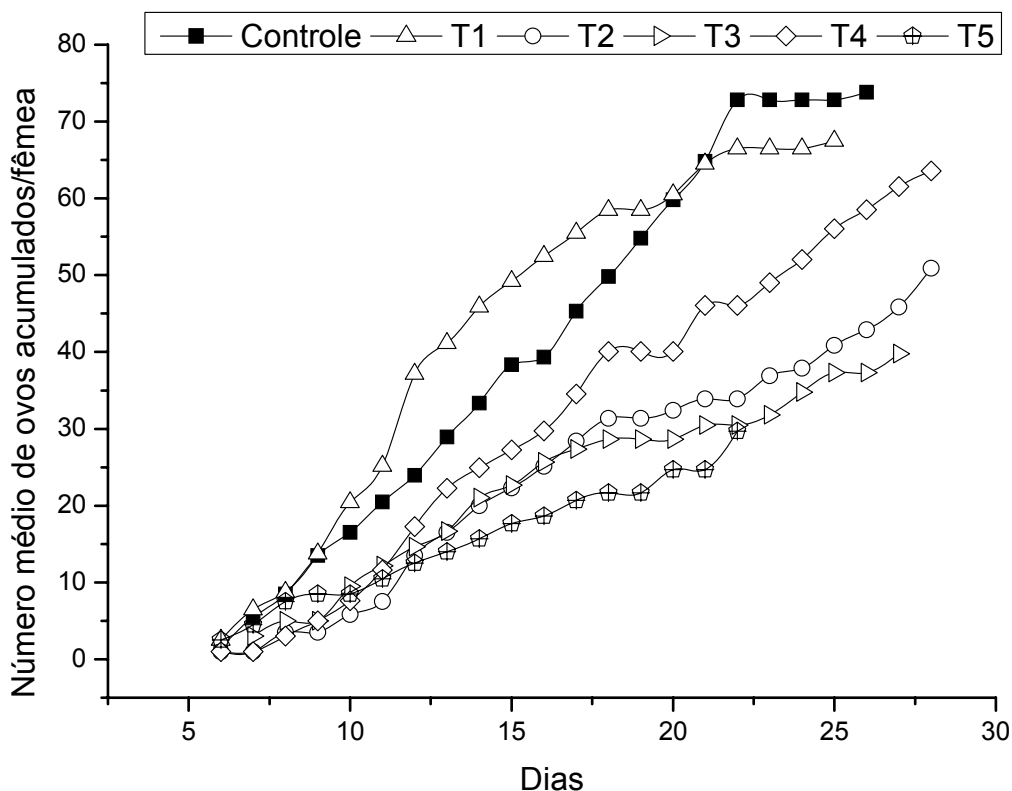


Figura 8: Número médio de ovos acumulados/fêmea de *Daphnia laevis*, cultivada em laboratório a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* (10^5 cél/mL), nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L $^{-1}$), T2 (8×10^{-7} mol.L $^{-1}$), T3 (1×10^{-6} mol.L $^{-1}$), T4 (5×10^{-6} mol.L $^{-1}$) e T5 (1×10^{-5} mol.L $^{-1}$).

Na figura 9 são apresentadas as curvas do número médio de neonatas acumulados por fêmea de *D. laevis*, ao longo de todo o ciclo de vida dos animais, para o controle e para os tratamentos experimentais T1, T2, T3, T4 e T5. Nota-se um maior número de descendentes no controle, seguido pelos animais do tratamento T4, T1, T2, T3 e T5, com a menor contribuição em neonatas. O número de neonatos acumulados por fêmea apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nos tratamentos T3 e T5 quando comparados ao controle e T1. Já o tratamento T3 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a T4, enquanto o T4 apresentou diferença significativa em relação ao T5 ($p < 0,05$).

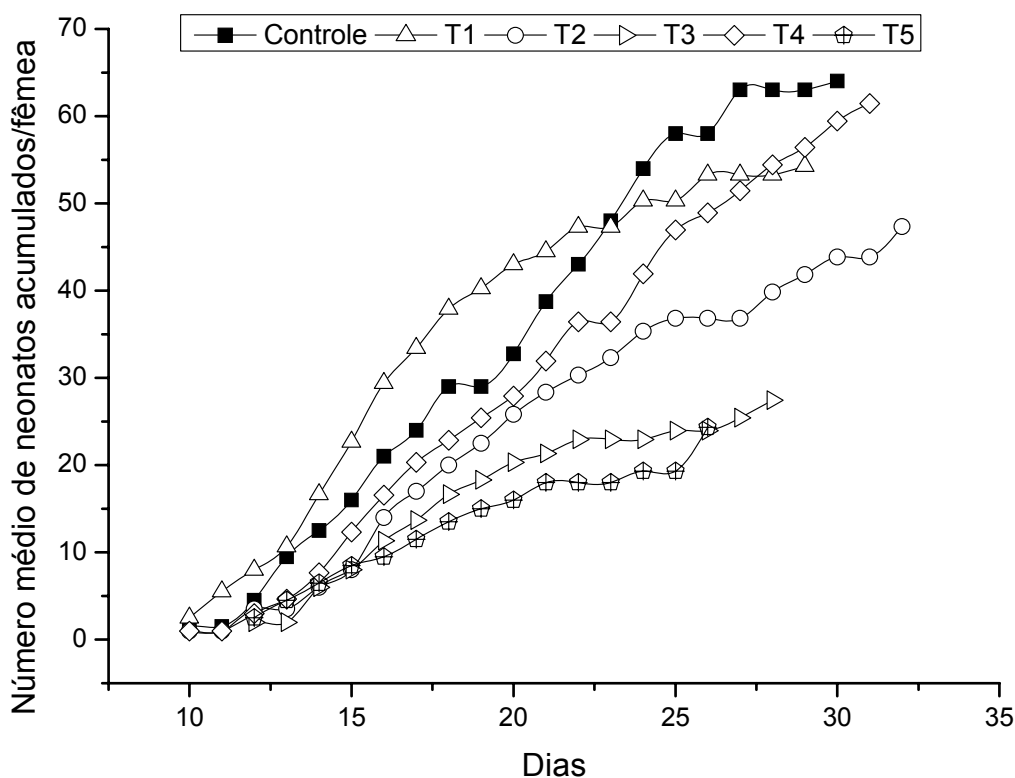


Figura 9: Número médio de neonatos acumulados/fêmea de *Daphnia laevis*, cultivada em laboratório a 25°C com fotoperíodo de 12h/12h luz/escuro, alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* (10^5 cél/mL), nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹).

Na figura 10 são apresentadas as médias de eclosão dos ovos produzidos por *Daphnia laevis* ao longo de todo o ciclo de vida dos animais, para o controle e para os tratamentos experimentais T1, T2, T3, T4 e T5. Nota-se a maior porcentagem de eclosão para o tratamento T5 e a menor para o controle. Embora T5 tenha uma maior porcentagem de eclosão, foi o tratamento que teve um menor número de ovos e neonatos acumulados ao longo do ciclo de vida em comparação com os outros tratamentos. Em relação à porcentagem de fêmeas que tiveram descendentes, no controle e T1, o valor foi 100%; para o T4, o índice foi 90%, enquanto nos tratamentos T2 e T3, foi de 80% e, T5 apresentou os menores valores, com 50% de sucesso.

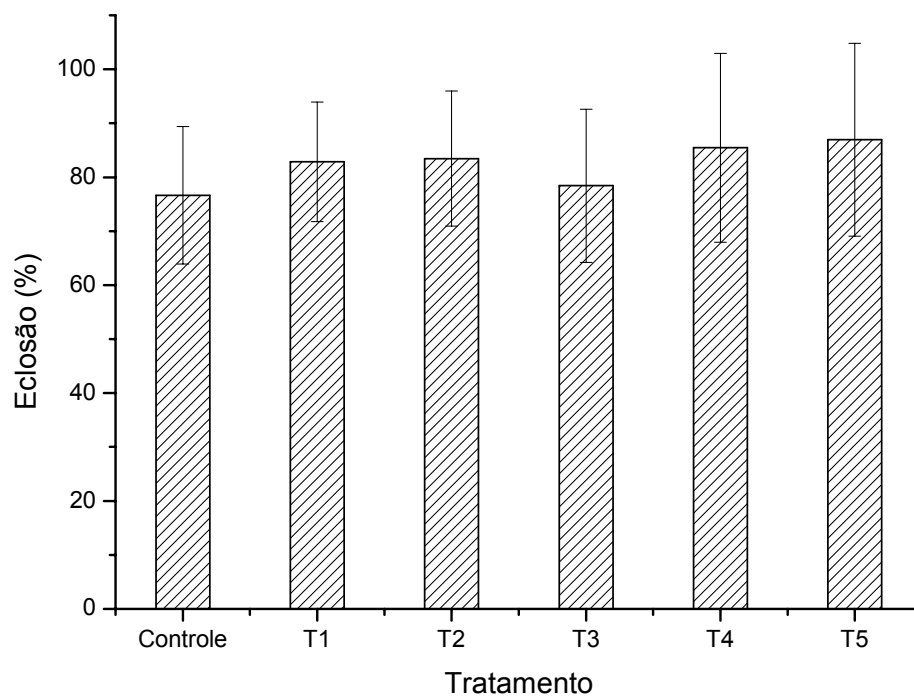


Figura 10: Porcentagem de eclosão de ovos para o Controle, T1 ($5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T2 ($8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T3 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), T4 ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e T5 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

Na figura 11 são apresentados os números médios de ovos e neonatos para os animais do controle e dos tratamentos experimentais.

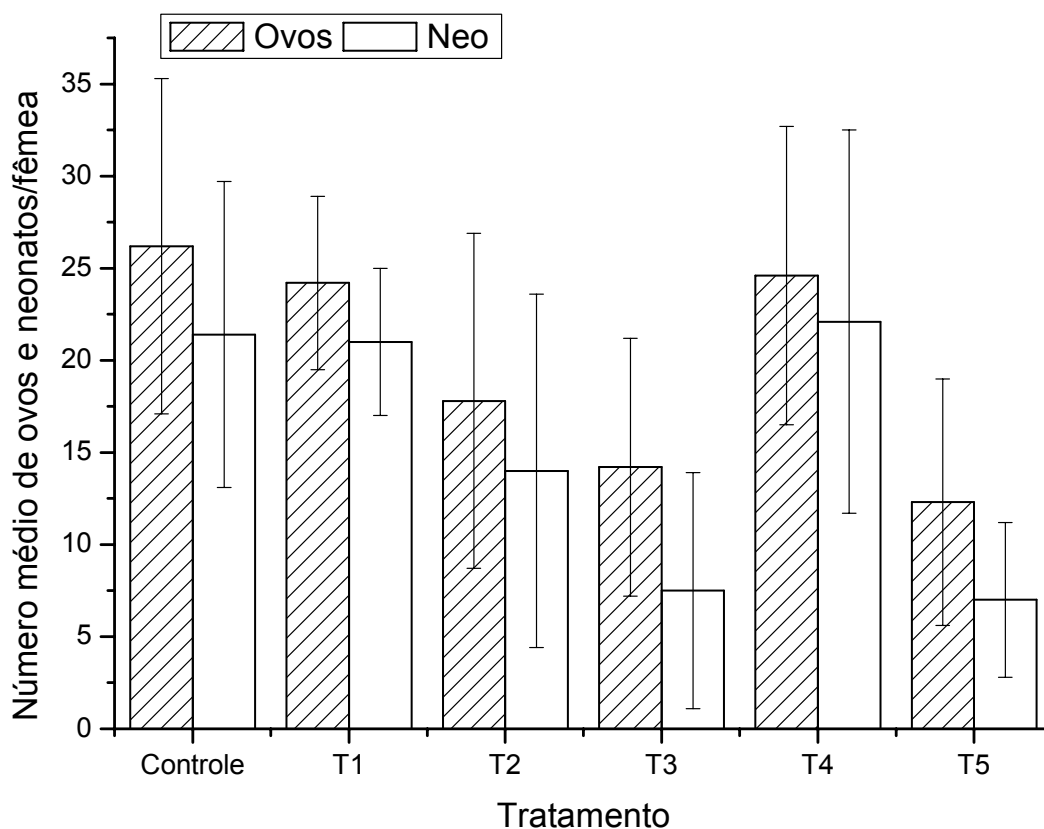


Figura 11: Número de ovos e neonatos para os animais do Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹).

Na tabela 3 são apresentados os valores médios para alguns parâmetros bionômicos avaliados em *Daphnia laevis* no controle e nos tratamentos experimentais.

Tabela 3: Valores médios (\pm DP) de desenvolvimento de *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphniidae) alimentadas com alga *P. subcapitata* nos tratamentos Controle, T1 (5×10^{-7} mol.L⁻¹), T2 (8×10^{-7} mol.L⁻¹), T3 (1×10^{-6} mol.L⁻¹), T4 (5×10^{-6} mol.L⁻¹) e T5 (1×10^{-5} mol.L⁻¹).

Característica	Controle	T1	T2	T3	T4	T5
Tamanho médio de neonato (mm)	0,6138 \pm 0,013	0,6386 \pm 0,029	0,6262 \pm 0,024	0,6386 \pm 0,029	0,6386 \pm 0,033	0,6045 \pm 0,026
Tamanho médio da primípara (mm)	1,286 \pm 0,147	1,41 \pm 0,157	1,248 \pm 0,119	1,271 \pm 0,102	1,326 \pm 0,094	1,221 \pm 0,1361
Idade primípara (dias)	10,2 \pm 3,01	8,9 \pm 2,96	9,25 \pm 3,73	11,75 \pm 3,2	9,78 \pm 2,17	9,2 \pm 1,3
Tempo de desenvolvimento embrionário médio (dias)	2	2	2	2	2	2
Fecundidade média (ovos/fêmea/ninhada)	3,71 \pm 1,55	3,56 \pm 1,61	2,46 \pm 1,11	2,29 \pm 1,00	3,35 \pm 1,12	2,03 \pm 0,64
Número médio de ovos em todo o ciclo de vida	15,56 \pm 12,63	17,11 \pm 9,57	13,25 \pm 9,38	11,25 \pm 6,43	20,33 \pm 12,06	10,2 \pm 7,12
Tamanho máximo do adulto (mm)	1,86	2,015	1,86	1,86	1,86	1,55
Longevidade média (dias)	22 \pm 3,97	15,6 \pm 4,25	18,9 \pm 4,93	18,8 \pm 2,97	17,7 \pm 3,96	18,4 \pm 5,29
Longevidade máxima (dias)	28	31	31	29	29	24
Tamanho mínimo da primípara (mm)	1,085	1,24	1,085	1,24	1,24	1,085

A equação de regressão linear para o cálculo do peso seco é apresentada na figura 12, com o valor de R^2 (0,9601).

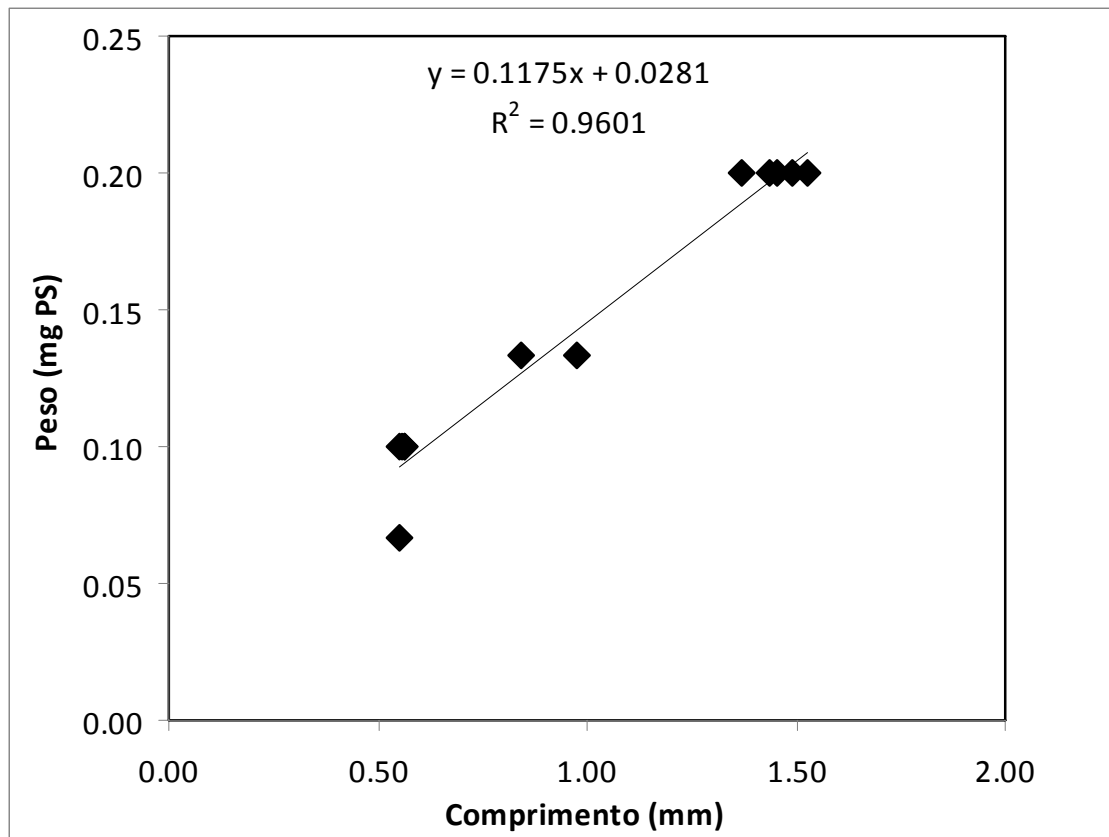


Figura 12: Regressão linear peso/comprimento para *Daphnia laevis* e a equação de regressão

Valores diários acumulados de produção individual para crescimento (P_c), para reprodução (P_r) e de produção total ($P = P_c + P_r$), para os tratamentos controle, T1, T2, T3, T4 e T5, estão apresentados na figura 13.

Os resultados mostram que, tanto no controle quanto nos tratamentos experimentais, os animais têm um investimento energético em reprodução bem superior ao crescimento. Os animais dos tratamentos T3 ($p < 0,05$), T4 e T5 ($p < 0,001$) apresentaram diferença estatisticamente significante quanto ao investimento em crescimento, quando comparados ao controle. Já para os tratamentos T1 e T2, não houve diferença estatisticamente significante em relação ao controle.

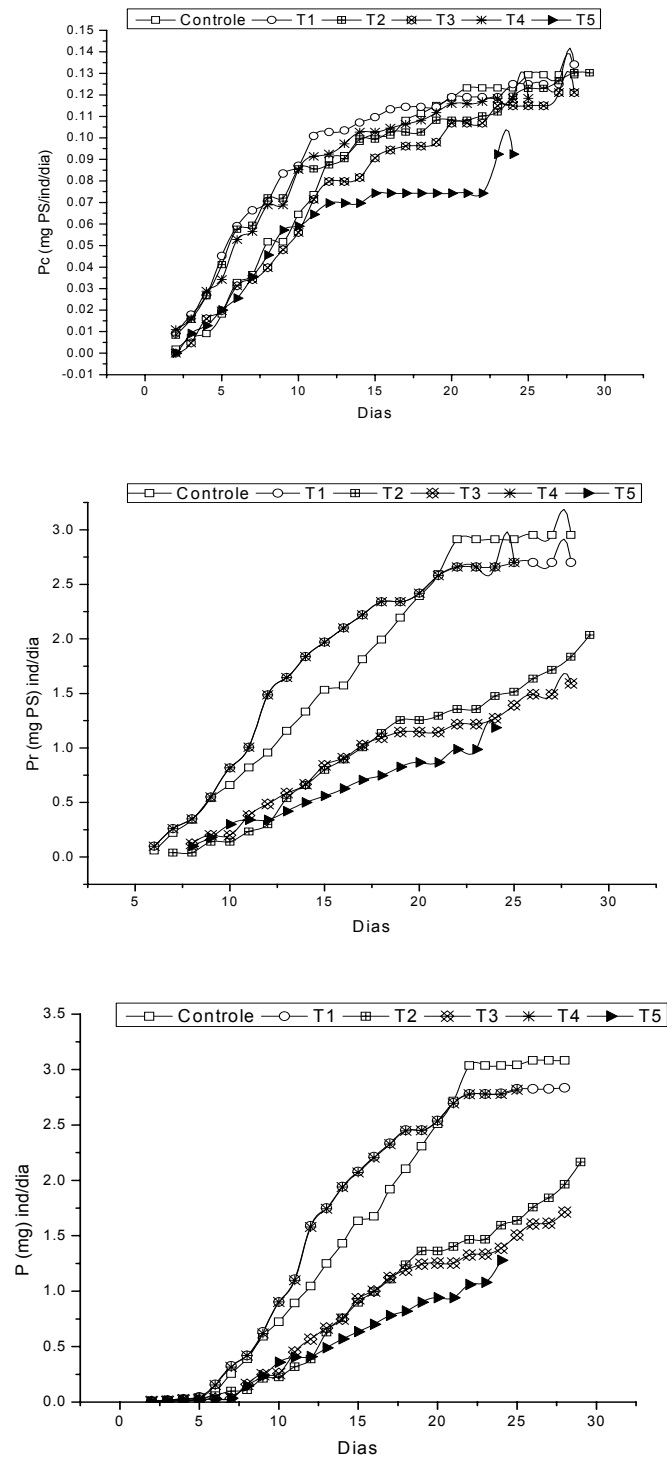


Figura 13: Produção individual diária média acumulada de *Daphnia laevis* para Crescimento (Pc), Reprodução (Pr) e Total ($P = Pc + Pr$) para o Controle, T1 ($5 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T2 ($8 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$), T3 ($1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$), T4 ($5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) e T5 ($1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$).

5 - Discussão

O cobre, apesar de ser um elemento essencial em concentrações baixas, pode ser tóxico em níveis mais elevados. Mesmo que os organismos não estejam expostos a concentrações letais, efeitos adversos já podem ser observados nas concentrações sub-letais, como efeitos negativos na reprodução e longevidade (VIVJEBERG, 1989)

Após a exposição da alga *P. subcapitata* às cinco concentrações de cobre durante 96 horas, foram medidas as concentrações de íons cobre livres no meio para verificar se o metal havia sido incorporado pelas algas ou retirado durante o processo de centrifugação realizado após o período de exposição. De acordo com Campbell (1995), o metal livre hidratado é mais tóxico do que quando o metal forma complexos inorgânicos e orgânicos. Estas medidas de íons livres são necessárias para avaliar se as possíveis mudanças nos animais alimentados com as algas contaminadas ocorrem em virtude da captura do metal somente pela ingestão e não pelo meio, já que a forma livre do cobre, por ser biodisponível, é uma das mais tóxicas para o zooplâncton (NOGUEIRA et al., 2005; SANTOS et al, 2008).

Os valores de cobre livre, medidos no meio de cultura do zooplâncton após adição das algas como alimento, encontram-se entre $3,89 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ a $8,2 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, indicando que esta forma do metal possa ter sido complexada ou assimilada pelas algas, as quais representam a única via de obtenção do metal pelos animais. Para o controle e os tratamentos T1 e T3, os dados de cobre livre no meio de cultura do zooplâncton variaram entre $3,89 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ para o tratamento T1 até $4,26 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ para o tratamento T3, sendo os mais baixos observados. O tratamento T4 apresentou uma ordem de grandeza maior, com $3,21 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$, enquanto os tratamentos T2, com $1,38 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ e o tratamento T5, com $8,12 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ de íons livre apresentaram os maiores valores. Estes dados são mais baixos do que os observados por Santos et al (2008), onde ocorreu efeito tóxico para *Ceriodaphnia silvestrii* em valores de $3 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de cobre livre no meio teste do zooplâncton.

Nas curvas de crescimento médio individual, pode-se observar um padrão semelhante entre o controle e os cinco tratamentos experimentais, onde os organismos continuam crescendo ao longo da vida, investindo tanto em reprodução quanto em crescimento corporal. Porém, na análise individual dos organismos, em especial nos tratamentos T2 e T3, foram observadas mudas que nem sempre foram acompanhadas de crescimento corporal. As fêmeas tinham duas ou três crias, acompanhadas de muda, mas não cresciam, embora ainda continuassem investindo na produção de ovos. Após esta ausência de crescimento, o que aparentemente poderia ser um indicativo de que os animais haviam atingido seu tamanho máximo, os mesmos voltavam a crescer. Houve indivíduos em que este fenômeno aconteceu mais de uma vez ao longo do ciclo, enquanto outros apresentaram este padrão apenas uma vez. Outra variação morfológica observada foi a ausência de espinho caudal em alguns indivíduos do tratamento T3. Estas mudanças morfológicas podem ser consequência de uma alocação energética diferenciada ou a resposta do animal ao estresse causado pelo alimento contaminado. Em estudo de Gusso (2004), a autora também observou algumas mudanças morfológicas em *Ceriodaphnia cornuta* exposta ao alimento contaminado com cobre, tais como a presença de pontos pretos na carapaça e a deformação da mesma.

Os dados de crescimento corporal máximo de *D. laevis* encontrados neste estudo, para o controle e para os tratamentos, estão abaixo daqueles encontrados por Rocha; Matsumura-Tundisi (1990) para esta mesma espécie, alimentada com *Scenedesmus bijugus* na concentração de 10^5 cél.mL⁻¹. No presente estudo, antes do acompanhamento do ciclo de vida em frascos de polipropileno, necessários para os bioensaios com metais, foram realizadas análises dos parâmetros bionômicos em frascos de vidro, mesmo recipiente utilizado pelos autores supracitados, com os animais do mesmo local e expostos às mesmas condições de cultivo, e os valores também diferiram daqueles dos frascos de polipropileno. Nestes frascos, o comprimento máximo observado foi de 1,86 mm, enquanto nos de vidro este valor foi 2,17 mm, e mais próximo do valor de 2,36mm descrito no trabalho de Rocha; Matsumura-Tundisi (1990). Nos frascos de vidro

também foi observada uma maior fecundidade média ($6,1 \pm 1,4$), e maiores longevidade média ($29,8 \pm 2,2$) e máxima (36). Esta maior fecundidade média, aliada à maior fecundidade foi responsável pelo maior número médio de ovos ao longo do ciclo de vida ($37,8 \pm 2,5$). Tais resultados, superiores aos encontrados nos frascos de polipropileno, para a mesma espécie e exposta às mesmas condições de cultivo (luminosidade, concentração do alimento e alimento), apontam para o uso de recipientes de vidro para a manutenção de culturas estoque no laboratório, onde os animais se desenvolverão melhor que em recipientes de polipropileno.

Entre os tratamentos do presente estudo, os tratamentos que não atingiram o valor de 1,86mm foram o T1, com valor máximo de 1,705 mm enquanto no T5, este valor foi 1,55 mm. Para o tratamento T1, o motivo poderia ser a menor longevidade média (15,6 dias), se o mesmo apresentasse o crescimento contínuo. Em relação ao tratamento T5, o resultado pode ser decorrente de uma mudança na alocação energética, pois apresentou valores de longevidade média (18,4 dias) bem próximas aos tratamentos T2 (18,9) e T3 (18,8). O tratamento T5 apresentou um indivíduo com comprimento máximo de 0,93 mm, o qual sobreviveu por 12 dias, sendo o indivíduo de menor longevidade no tratamento, abaixo da média de 18,4 dias. Entre os dias 1 e 8, este indivíduo não apresentou crescimento corporal, mantendo o tamanho com o qual foi separado para o início da exposição, e a primeira mudança no comprimento ocorreu apenas no nono dia de exposição, e a segunda no décimo primeiro dia. Gusso (2004) também observou a estagnação de crescimento de um indivíduo de *C. cornuta* que foi exposto ao alimento contaminado. A diferença, porém, foi que no presente estudo o animal não se desenvolveu no início e depois passou por duas alterações de comprimento, enquanto o indivíduo de *C. cornuta* se desenvolveu no início, até o oitavo dia, e estagnou a partir deste momento, porém sobreviveu até o 19º dia. Embora tenha produzido ovos por três vezes, não chegou a deixar descendentes, já que não havia a eclosão, enquanto *D. laevis* não apresentou sequer a formação de ovos.

Em testes crônicos, o sucesso reprodutivo é uma importante medida de toxicidade da substância para se verificar os efeitos ecológicos em populações e comunidades (DE SCHAMPHELAERE, 2003). Os efeitos dos tóxicos na reprodução podem ser diretos, como a probabilidade de sobrevivência dos ovos em desenvolvimento, ou indiretos, como os resultados de decréscimo da taxa de assimilação alimentar ou aumento dos custos energéticos para crescimento ou manutenção (KOOIJMAN, 2000 apud DE SCHAMPHELAERE et al, 2003).

A fecundidade média foi outro parâmetro reprodutivo afetado. Os animais do controle apresentaram uma fecundidade mais elevada (3,71 ovos/fêmea/ninhada), enquanto os animais do tratamento T5 foram os que apresentaram os menores valores, com 2,03 ovos/fêmea/ninhada.. As alterações na fecundidade nos leva a duas comparações distintas. Relembrando que a concentração de cobre adicionado nos tratamentos apresenta a seguinte ordem, do menor para o maior valor: Controle < T1 < T2 < T3 < T4 < T5. Comparando os valores do controle com os demais tratamentos, observa-se a diminuição dos valores médios (3,71 – controle até 2,03 – T5). Este decréscimo, de uma maneira geral, condiz com alguns trabalhos, como o de Sobral et al. (2001), onde os autores reportaram efeitos tóxicos do cobre sobre a reprodução de cladóceros, ocorrendo uma inibição no desenvolvimento de ovos em *D. magna* durante exposição à água contaminada com cobre. Hook; Fisher (2001b) também observaram efeitos deletérios na reprodução de cladóceros alimentados com algas verdes expostas à contaminação com prata. Sofyan et al (2006) observaram os efeitos negativos sobre a reprodução, comprimento do corpo e atividade alimentar em *Ceriodaphnia dubia* exposta ao alimento contaminado com cobre e cádmio. No estudo de Rodgher et al (2008), as autoras relatam que algumas variáveis bionômicas de *C. silvestrii*, tais como fecundidade, número médio de neonatos por fêmeas, tamanho da primípara e tamanho máximo, foram afetadas quando expostas à alimentação diária com células algais contaminadas com cobre. As autoras observaram que a exposição às concentrações sub-letais do cobre através da dieta alimentar afetou significativamente a reprodução daquela espécie.

Por outro lado, quando se compara os dados obtidos no presente estudo para a fecundidade média, tratamento a tratamento, observa-se um decréscimo a partir do controle, passando por T1, T2 e T3 (3,71 – controle a 2,29 – T3). Porém, o tratamento T4 apresenta um valor de fecundidade superior quando comparado aos de T2 e T3, e bem próximo de T1, o que poderia ser explicado como um efeito benéfico do metal para a reprodução dos cladóceros. De Schamphelaere e Janssen (2004) demonstraram um aumento na reprodução em *D. magna* alimentada com células de *P. subcapitata* exposta ao cobre. Concentrações de cobre como $3,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foram usadas pelos autores para a alimentação e eles sugeriram que o aumento na reprodução poderia estar relacionado a um estímulo da atividade de enzimas no processo digestivo em dafinídeos, supostamente causada pelo metal.

Os dados de fecundidade mais altos para os animais do tratamento T4 do presente trabalho também são coerentes com os obtidos por Gusso (2004) para a espécie *Ceriodaphnia cornuta*, onde a autora encontrou uma taxa de reprodução mais elevada em animais que foram alimentados com algas contaminadas, quando comparados aos animais do controle. A autora ressalva que este melhor resultado na reprodução não significa uma saúde melhor dos animais.

Outra característica observada no presente trabalho foi a presença de fêmeas que realizaram mudas, porém não atingiram a maturidade sexual. No presente estudo, tal fato ocorreu em quatro dos seis tratamentos acompanhados. Somente no controle e no tratamento T1, 100% das fêmeas produziram descendentes. No tratamento T4, este índice foi de 90%, enquanto para os tratamentos T2 e T3 foi de 80%. Já no tratamento T5, somente 50% das fêmeas produziram descendentes. O tamanho final alcançado pelas fêmeas que se reproduziram não foi diferente do tamanho daquelas que se reproduziram, dentro de cada tratamento. Comportamento semelhante foi observado por Chandini (1989) estudando a exposição de *Daphnia carinata* ao cádmio, onde as fêmeas tinham tamanhos semelhantes no final do seu ciclo de vida, independente de ter produzido neonatos ao longo da vida.

Gusso (2004) também observou fêmeas de *C. cornuta* que não atingiram a maturidade sexual. A autora sugere que o efeito tóxico do metal poderia ter afetado as gônadas dos indivíduos ou alterado as taxas de ingestão, de maneira que o alimento consumido produziria energia apenas para a manutenção basal do organismo, sendo a maturação afetada.

Os fatores que podem ser os responsáveis pela explicação de uma maior reprodução dos organismos alimentados com a alga exposta ao metal, talvez um melhor valor nutricional da alga ou mudanças na alocação de energia, favorecendo a reprodução em situações estressantes, só podem ser melhor compreendidos com mais estudos sobre a contaminação crônica do zooplâncton. Os estudos abordando as contaminações crônicas, especialmente envolvendo todo o ciclo de vida, ainda são escassos para se comparar os dados. Além da falta de estudos nessa área, a complexidade dos processos envolvendo a toxicidade crônica é provavelmente maior para os elementos essenciais (DE SCHAMPHELAERE, 2003).

Em relação ao número médio de ovos acumulados por fêmea, o controle foi o que apresentou os maiores valores médios (73,8), um pouco mais elevado que os obtidos por Rocha e Matsumura-Tundisi (1990), onde as autores encontraram média de 68,63 ovos por fêmea. O tratamento T1 apresentou um valor ligeiramente inferior ao do controle e do trabalho citado acima (67,5). Para os tratamentos T2 e T3, esta diferença foi maior, com médias de 50,9 e 39,8 ovos/fêmea, respectivamente. Já o tratamento T4 apresentou um valor médio de 63,55 ovos/fêmea, o que poderia ser considerado como um efeito benéfico da exposição ao cobre, como observado por Gusso (2004) e De Schampelaere (2004). Este resultado mais elevado também poderia ser consequência de uma mudança na estratégia de vida, investindo em reprodução quando o ambiente se encontra desfavorável. No tratamento T5 foi observado o menor valor médio de ovos/fêmea. Se a hipótese do benefício causado pelo aumento de cobre, sugerida para o T4, estiver correta, talvez a concentração fornecida para o T4 seja o valor limite ou bem próximo dele, para que o organismo se beneficie, já que com o acréscimo de cobre fornecido às algas (5×10^{-6} mol.L⁻¹ para T4 e 1×10^{-5} mol.L⁻¹

para T5), houve um decréscimo no número de ovos. Estes dados diferem dos de Rodgher et al (2009), onde o número de ovos de *C. silvestrii* foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de cobre, ou seja, quanto maior a concentração de cobre que as algas foram expostas, menor o número de ovos, sem a variação observada no presente estudo.

O número médio de neonatas por fêmea não seguiu a mesma ordem do número de ovos por fêmea, ou seja, não é porque a fêmea teve mais ovos em determinado tratamento, que ela produziu mais descendentes. Os animais do controle foram os que apresentaram as maiores médias de ovos e de neonatas produzidas, mas a sua taxa de eclosão foi a menor entre todos os tratamentos. Os tratamentos T1 e T4, que haviam obtido a segunda e a terceira média de número de ovos, respectivamente, sofreram uma mudança quanto ao número de neonatos, sendo que os animais do tratamento T4 produziu mais descendentes do que aqueles do T1. Tal fato pode ser evidenciado pela maior taxa de eclosão de T4 comparado a T1. Os tratamentos T2, T3 e T5, respectivamente, foram os que menos produziram descendentes. Quanto à porcentagem de eclosão, o T5 foi o que apresentou o maior valor médio, ligeiramente superior ao T4. Esta maior porcentagem de eclosão de T5 pode ser resultado de uma mudança na estratégia de reprodução, investindo pouco na produção de ovos, mas com um sucesso maior na eclosão dos mesmos.

D. laevis apresentou diferentes valores de produção secundária nos tratamentos experimentais. Em todos os tratamentos, a produção secundária foi determinada principalmente pela produção relativa à reprodução, ou seja, a utilização da energia alimentar na produção de biomassa de ovos. Todos os animais investiram mais energia na reprodução do que no crescimento, o que corrobora a tese de Lynch (1980) segundo a qual espécies maiores de *Daphnia* tendem a investir mais energia em reprodução, com redução corporal na maturidade.

A partição da energia entre os processos de crescimento somático e reprodução variou entre os tratamentos experimentais. A exposição de *D. laevis* à toxicidade crônica do cobre promoveu uma mudança de estratégia quanto à

alocação energética. Os animais do tratamento T5 apresentaram a maior parcela destinada ao crescimento corpóreo, sendo o único tratamento onde foi observado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), em relação aos outros tratamentos (T1). Este maior investimento talvez seja decorrente de uma mudança estratégica, devido ao menor investimento em reprodução, que foi observada em apenas 50% dos animais acompanhados, enquanto os outros tratamentos apresentaram valores maiores de fêmeas que se reproduziram. Tanto para o número de ovos acumulados por fêmea como para os neonatos, este tratamento apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação ao controle e ao T1, que foram os tratamentos onde 100% dos animais produziram descendentes. Como consequência, a produção total deste tratamento (T5) foi a menor observada.

A característica da produção secundária destinada à reprodução foi significativamente alterada ($p < 0,01$) nos tratamentos T2, T3 e T5 quando comparados aos demais tratamentos (controle, T1 e T4). Esta mudança de estratégia é muito importante para podermos avaliar qual o impacto causado nas taxas reprodutivas de uma população, e como a introdução de agentes contaminantes e estressores podem desencadear um comportamento diferenciado, que irá influenciar diretamente na composição da população. A partir do controle, observa-se uma menor taxa de Pr nos animais, porém para o tratamento T4 observa-se um certo estímulo, que não é observado no tratamento T5. Seria interessante a realização de testes com concentrações intermediárias entre T3 e T5 a fim de determinar se esta estimulação de fato ocorre e, caso ocorra, determinar ou estimar o valor mais próximo que seja o causador deste benefício.

Há uma carência de literatura abordando os efeitos do alimento contaminado na produção secundária especificamente. Gusso-Choueri et al (não publicado) estimaram a produção secundária para *Ceriodaphnia cornuta* cultivada em diferentes tratamentos (água do ambiente, água reconstituída e expostas a duas concentrações de alimento contaminado com cobre) e observaram maiores valores para animais alimentados com algas expostas ao metal. De

Schamphelaere et al (2003) já haviam relatado respostas positivas do estímulo da reprodução e crescimento de *Daphnia magna* alimentada com *P. subcapitata* exposta a diferentes concentrações de cobre, interferindo diretamente no resultado de produção desta espécie, porém não são apresentados os valores na forma de produção secundária.

Há variações nas respostas das espécies zooplanctônicas à contaminação por cobre, como encontrado por Bossuyt e Janssen (2005) que reportaram variações na sensibilidade de zooplâncton de água doce ao cobre e concluíram que estes organismos têm diferentes capacidades de aclimação ao metal. O presente estudo demonstra a sensibilidade de *D. laevis* a diferentes concentrações de cobre, obtidas através do alimento. Essas concentrações subletais promovem a acumulação de cobre nesses organismos tornando-os, sem dúvida, um importante elo de transferência do metal nas cadeias tróficas de ambientes aquáticos naturais.

Devido às diferenças observadas na questão reprodutiva e de crescimento no presente estudo e por outros autores (HOOK; FISHER, 2001; HOOK; FISHER, 2002; GUSSO-CHOUERI et al, não publicado; DE SCHAMPHELAERE et al, 2003), e, como os animais apresentam diferentes respostas de sensibilidade quando expostas a agentes tóxicos (BOSSUYT; JANSSEN, 2005), seria interessante uma maior abordagem relacionada à produção secundária, com a finalidade de tentar compreender melhor como a contaminação via alimentar interfere nas características da população dentro do ecossistema. A fim de se obter dados para uma melhor extrapolação de situações encontradas na natureza, talvez seja interessante a análise por várias gerações de animais, como feito por Bossuyt: Janssen (2005) onde foram acompanhadas várias gerações de *Daphnia magna* expostas ao alimento contaminados com uma concentração constante de metal, a qual o organismo se aclimatava e adaptava, os autores observaram diferenças estatisticamente significantes de mudanças de comportamento decorrentes da presença de metal corporal ao comparar a sexta geração com a primeira, e, depois de nove gerações, alguns animais apresentaram redução na concentração interna do metal. Caso as concentrações de cobre fossem

aumentadas a cada geração, observava-se um aumento na concentração de cobre corporal.

O impacto do alimento contaminado com cobre na história de vida de *D. laevis*, observado no presente estudo, como número médio de ovos e número de descendentes produzidos, pode trazer consequências negativas sobre a dinâmica populacional de populações naturais que estejam submetidas à concentrações subletais semelhantes.

Em estudos de Hook; Fischer (2001 a; 2002), os autores observaram, em experimentos de curta duração, onde copépodos marinhos eram alimentadas com diatomáceas expostas a diferentes metais (Hg, Cd, Hg, Mn e Zn), uma redução na capacidade reprodutiva dos animais. Em quatro horas de exposição ao alimento contaminado com zinco, foi observado efeito deletério na produção de ovos, porém, em uma semana de exposição já não existiu mais diferença na produção de ovos. Os autores sugeriram que na exposição de curto prazo, não houve tempo suficiente para acionar os mecanismos de detoxificação dos animais.

Segundo os protocolos ecotoxicológicos (APHA,1995), os testes de toxicidade crônica utilizando espécies do gênero *Daphnia* sugerem o acompanhamento por 21 dias. É importante ressaltar que as espécies citadas nos protocolos (*D. magna* e *D. similis*), não ocorrem naturalmente no Brasil e possuem um ciclo de vida maior que a espécie do presente estudo. *Daphnia magna*, por exemplo, possui um ciclo de vida de 56 dias a 20° C e de 40 dias a 25°C (APHA, 1995). Com os dados obtidos no presente estudo, sugerimos que devam ser realizados ensaios crônicos que avaliem todo o ciclo de vida do animal, uma vez que alterações como a produção de ovos ou nascimento de neonatas, que no final interferiram nos valores médios destes parâmetros ocorreu após o período sugerido. Outro fator importante para o acompanhamento do ciclo de vida total do animal é a escassez de trabalhos com os dados de uma exposição crônica, o que poderia se aproximar mais do ambiente natural contaminado, embora muitas vezes a maior dificuldade de trabalhos de ecotoxicologia seja a extrapolação de dados obtidos no laboratório para o ambiente natural.

6 - CONCLUSÕES

Através do presente estudo foi possível concluir:

- As espécies escolhidas para a realização do presente estudo tiveram um desenvolvimento satisfatório e de relativa facilidade na manutenção no laboratório;
- Foi possível verificar a acumulação de metal nos animais em relação às algas. Enquanto as algas apresentavam a concentração de metal por volta de 10^{-16} g de cobre por célula, os animais apresentavam estas concentrações na ordem de 10^{-9} g/indivíduo, havendo biomagnificação do cobre pelos animais;
- Através da determinação de cobre livre no meio de cultivo dos organismos foi possível verificar que a única via de contato do animal com o metal foi através da exposição ao alimento;
- Entre os parâmetros analisados na história de vida do animal, a reprodução, representada pelo número médio de ovos e de neonatos acumulados por fêmea, apresentaram diferenças estatisticamente significantes;
- A produção secundária total foi significativamente afetada pela exposição ao contaminante, especialmente a produção destinada à reprodução. Em relação à destinada ao crescimento, só houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento T1 e o tratamento T5.
- Neste estudo, os parâmetros reprodutivos foram os mais adequados para indicar o efeito da alga contaminada com cobre sobre os animais;

- A comparação entre parâmetros reprodutivos do controle e do tratamento T1 permite inferir sobre a importância da utilização de testes crônicos que envolvam todo o ciclo de vida do animal, uma vez que o efeito do cobre sobre a reprodução só foi observado em T1 após o vigésimo dia de vida.
- O tratamento T4 mostrou um comportamento atípico com relação aos parâmetros reprodutivos e produção total, quando comparado aos demais tratamentos, sugerindo estímulo à reprodução.

7 - Referências Bibliográficas

ABNT (2004) Associação Brasileira de Normas Técnicas – Toxicidade aguda – **Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. ABNT NBR 12713. 21p. 2004.

ABNT (2005) Associação Brasileira de Normas Técnicas - **Avaliação da toxicidade crônica utilizando *Ceriodaphnia* spp, (Cladocera, Crustacea)**. ABNT NBR13373, 14p. 2005.

AFNOR Association Française de Normalisation 1980. Norme expérimentale.T90-304. **Essais deseaux Determination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance.**

ALBA-TERCEDOR, J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los rios. **IVSIAGA**, Almeria, vol. II: 203-213, 1996.

ALBERGONI, V.; PICCINI,E.; COPPELLOTTI, O. Response to heavy metals in organisms – I. Excretion and accumulation of physiological and non physiological metals in *Euglena gracilis* **Comparative Biochemistry and Physiology (C)** v. 67, p. 121-127, 1980.

ADAMS, W.J, ROWLAND, C.D. Aquatic Toxicology Test Methods. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J (Eds) **Handbook of Ecotoxicology** 2nd Ed. New York: Lewis Publishers. 1290 p. 2002.

APHA (1995) American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and waste water, 21 ed., Washington. 1268p.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima. 464 p. 2006.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2a. ed. Bookman, 622 p., 2002.

BARBOUR, M.T., GERRITSEN, J., SNYDER, B.J., STRIBLING, J.B. **Rapid Bioassessment Protocols for use in streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish**, 2. ed. ,1999.

BERNARDI, R. de; GIUSSANI, G.; MANCA, M. Cladocera: Predators and prey. **Hydrobiologia** 145:225-243. 1987.

BOSSUYT, B.T.A., JANSSEN, C. Long-term of *Pseudokircheneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentration: changes in tolerance and physiology. **Aquatic Toxicol.** 68, 61-74. 2004.

BOSSUYT, B.T.A., JANSSEN, C. Copper toxicity to different field-collected cladocerans species: intra and inter species sensitivity. **Environ. Pollut.** 136, 145-154. , 2005.

BOSTELMANN, E. **Avaliação da concentração de metais em amostras do sedimento do Reservatório Billings, Braço Rio Grande, São Paulo, Brasil.** Dissertação (Mestrado) USP São Paulo, 130p. 2006.

BOTTRELL, H.H.; DUNCAN, A., GLIWICS, Z.M., GRYGIEREK, E., HERZIG, A., HILLBRICHT-ILKOWSKA, A., KURASAWA, H., LARSSON, P, WEGLENSKA, T. A review of some problems in zooplankton production studies. **Norwegian Journal of Zoology**, v. 24, p. 419-456. 1976.

BOZELLI, R. L.; HUSZAR, V. L. de M. Comunidades fito e zooplanctônicas continentais em tempo de avaliação. **LIMNOtemas.** Sociedade Brasileira de Limnologia, 2003

BRULAND, KW; DONAT; JR; HUTCHINS, D. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnol. Oceanogr.** 36(8): 1555-1577. 1991.

CAMPAGNA, A.F. **Toxicidade dos sedimentos da Bacia Hidrográfica do rio Monjolinho (São Carlos-SP): ênfase nas substâncias cobre, aldrin e heptacloro.** USP Pirassununga 281 p. 2005.

CHANDINI, T. Survival, grown and reproduction of *Daphnia carinata* (Crustacea, Cladocera) exposed to chronic cadimium stress at diferent food (Chorella) levels. **Envir. Pollut.** 60 : 29-45. 1989.

CHOUERI RB, MELÃO MGG, LOMBARDI AT, VIEIRA AAH The effects of a cyanobacteria exopolysaccharide on the life-history of *Ceriodaphnia cornuta* SARS. **J Plankton Res** 29(4):339-345. 2007.

CLÉMENT, B.; ZAID, S. A new protocol to measure the effects of toxicants on the daphnids-algae interactions. **Chemosphere**, 55, 1429-1438. 2004.

COELHO-BOTELHO, M. J. Dinâmica da comunidade zooplanctônica e sua relação com o grau de trofia em reservatório. **Boi CETESB** 2004. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br

CONIGLIO, L; BAUDO, R. Lifes tables of *Daphnia obtusa* (Kurz) surviving exposure to toxic concentration of chromium. **Hydrobiologia**. V.188/189 p. 407-410. 1989.

COONEY, J.D. Freshwater tests. In: RAND, G.M. (Ed) **Fundamentals of aquatic toxicology** 2a ed, 1125 p. 1995.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. In: **Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater organisms**. Doctoral Thesis (Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen). 2003.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., CANLI, M., LIERDE, V. V., FORREZ; I., VANHAECKE, F., JANSSEN, C.R. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicol.** 70, 233-244. 2004.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., JANSSEN, C.R. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. **Environ. Toxicol. Chem.** 23, 2038-2047. 2004

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., STAUBER, J.L., WILDE, K.L., MARKICH, S.J., BROWN, P.L., FRANKLIN, N.M., CREIGHTON, N.M., JANSSEN, C.R.. Toward a

biotic ligand model for freshwater green algae: surface-bound and internal copper are better predictors of a toxicity than a free Cu^{2+} -ion activity when pH is varied.

Environ. Sci. Technol. 39, 2067-2072. 2005

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., JANSSEN, C.R. Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. **Environ. Sci. Technol.** 40, 4514-4522. 2006.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., FORREZ; I., DIERCKENS, K., SORGELLOS, P., JANSSEN, C.R.. Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicol.** 81, 409-418. 2007

EDMONDSON WT, WINBERG GC **A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters.** Blackwell, Oxford. 358p. (IBP Handbook, 17). 1971.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia.** 2ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 602p, 1998.

GAULD, D. T. The grazing rate of planktonic copepods. **J. Mar. Biol. Assoc UK.** 29, 695-705. 1951.

GOUVEA, 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**. 60:1332-1339. 2005.

GUSMÃO, L.F.M. **Efeitos do cobre e cromo na comunidade zooplanctônica: um estudo experimental em mesocosmos**. Dissertação (Mestrado) USP São Carlos, 288 p. 2004.

GUSSO, PK **Contaminação alimentar e seus efeitos na bionomia de *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae)**. Monografia (Graduação) UFPR, 2004.

HOOKE, SE; FISHER, NS. Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. **Marine Biology**. 138:1131-1140. 2001a.

HOOKE, SE; FISHER, NS. Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. **Environ Toxicol and Chem** 20:568-574. 2001b.

HOOKE, SE; FISHER, NS. Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. **Marine Environmental Research** 53:161-174. 2002.

JARDIM, GM **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí, SP**. Dissertação (Mestrado) USP – Piracicaba, 127 p. 2004.

JARDIM, W.F., GIMENEZ, S.M.N, NERY, J.H.S. The use of cupric ion buffers on the calibration of ion selective electrodes. **Annals V Simposio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 226-230. 1986.

JARDIM, WF; PEARSO, HW A study of the copper complexing compounds released by some species of cyanobacteria. **Water Research** 18(8):985-989, 1984

LAWS, E.A. **Aquatic Pollution**: an introductory text. 3th Edition. New York: Interscience Publication, 2000.

LOMBARDI, AT.; JARDIM, W. Synchronus-Scan fluorescence and the complexation of copper (II) ions by humic substances. **J Braz Chem Soc** v.8(4): 339-342. 1997.

LOMBARDI AT, VIEIRA AAH Lead and copper toxicity to *Nephrocytium lunatum* (Chlorophyceae) and their complexation with excreted material. **Revista de Microbiologia**. 29:44-48. 1998a.

LOMBARDI AT, VIEIRA AAH Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae). **Phycologia** 37:34-39.1998b.

LOMBARDI AT, VIEIRA AAH Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia**. V.39, p.118-125, 2000.

LOMBARDI AT, VIEIRA AAH, SARTORI LA Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **J Phycology** 38:332–337. 2002.

LOMBARDI, A. T. ; HIDALGO, T. R. M. ; VIEIRA, A. A. H. . Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus*. **Chemosphere**, 60:453-459. 2005.

LOMBARDI AT, HIDALGO TMR, VIEIRA AAH, SARTORI LA Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminitus* Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia** 46:74-78. 2007

LORES, E.M., PENNOCK, J.R. Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton. **Marine Ecology progress Series**, v. 187, p. 67-75, 1999.

MASON, A.Z, JENKINS, K.D. Metal detoxication in aquatic organisms In: **Metal speciation and Bioavailability in Aquatic Systems**, Chichester: Wiley & Sons. 1995.

MOORE, M.M. et al **Copper**. South Australia: National Environmental Department. (National Environmental Health Monographs. Metal Series, n.3. Published by the National Environmental Health Forum). 1997.

MUYSEN, BTA; JANSSEN, CR. Age and exposure duration as a factor influencing Cu and Zn toxicity toward *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 68:436-442. 2007

NOGUEIRA, P.F.M.; MELÃO, M.G.G; LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). **Freshwater biology**. 50: 1560-1567, 2005.

NOGUEIRA, P.F.M. **Interação entre a matéria orgânica natural, o cobre e microorganismos heterotróficos: dinâmica do metal e sua disponibilização para biota aquática**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos 2007.

PAGGI, J.C Crustacea Cladocera In: LOPRETTO, E.C.; TELL, G. (Eds) **Ecosistemas de aguas continentales: Metodologias para su estudio III**. La Plata: Ediciones Sur, 1995.

PEDROZO, M.F.M.; LIMA, I.V. **Ecotoxicologia do cobre e seus compostos**. **Salvador**: CRA. 128 p. (Cadernos de Referência Ambiental, v. 2). 2001

PERALES-VELA, HV; GONZÁLES-MORENO, S; MONTES-HORCASITAS, ROCV. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sublethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**. 67: 2274-2281, 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.; DALLINGER, R Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrate. In: DALLINGER, R; RAINBOW, P.S. (Eds) **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers. p. 119-131. 1993

RAINBOW, P.S.; WANG, W.X. Comparative assimilation of Cr, Se and Zn by the barnacle *Elminus modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. **Marine Ecology Progress Series** v. 218, p239-248, 2001.

RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology** 2a ed, 1125 p. 1995.

ROCHA O, MATSUMURA-TUNDISI T Growth rate, longevity and reproductive performance of *Daphnia laevis* Birge, *D.gessneri* Herbst and *D. ambigua* Scourfield in laboratory cultures. **Braz. J. Biol** 50:915-921. 1990.

RODGHER, S. **Estudos ecotoxicológicos e limnológicos nos reservatórios em cascata do médio e baixo rio Tietê: Uma análise espacial e temporal.**

Dissertação (Mestrado) USP São Carlos, 213 p. 2001.

RODGHER, S. **Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos dos metais cádmio e cromo em organismos planctônicos.** Tese (Doutorado) USP São Carlos. 252 p.

2005

RODGHER S, LOMBARDI AT, MELÃO MGG, TONIETTO AE Change in life cycle parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. **Ecotoxicology** 17(8):826–833.2008

RODGHER, S; LOMBARDI, A.T., MELÃO, M.G.G. Evaluation of life cycle parameters of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to 36 days dietary copper exposure. **Ecotoxicol Environ Safety** 2009. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.03.009

SANTOS, M.A.P.F. **Influência de substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por *Ceriodaphnia silvestrii*.** Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, 126p. 2004.

SANTOS MAPF, MELÃO MGG, LOMBARDI AT The effects of humic substances on copper toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera). **Ecotoxicology** 17:449-454, 2008.

SIGG, L.; BEHRA, R. Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. In: SIGEL, A; SIGEL, H.; SIGEL, R.K.O. (Eds) **Metals ions in biological systems** Boca Rotan: Taylor & Francis Groups, 2005, p.47-73.

SIPAÚBA-TAVARES,L.H. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 70p. 1994.

SOBRAL, O., CHASTINET, C., NOGUEIRA, A., SOARES, A.M.V.M, GONÇALVES, F., RIBEIRO, R. In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicology test with *Daphnia magna*. **Ecotoxicol. Environ. Safety**. 50, 174-179. 2001.

SOFYAN, A., SHAW, J.R., BIRGE, W.J. Metal transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. **Environ. Toxicol. Chem.** 25, 1034-1041. 2006.

SOFYAN, A., SHAW, J.R., BIRGE, W.J. Dietary and waterborne metal to cladocerans and the relative importance of metal exposure. **Environ. Sci. Technol.** 39, 2067-2072. 2007.

STUMM, W.;MORGAN, J.J. **Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters**. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1022p. 1996.

TALLING J. F. ; DRIVER D. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. Proc. Conf. Primary productivity measurements, marine and freshwater; held University of Hawaii, 1961. **Annals**. U.S. Atomic Energy Comm. TID-7633. pp. 142-146. 10th Pacif. Sci. Cong. Honolulu, p. 142-146. 1963.

TIMMERMANS, K.R Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: DALLINGER, R; RAINBOW, P.S. (Eds) **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers. p. 133-148. 1993

TONIETTO, A.E. **Especiação química de cobre e zinco nas águas do Reservatório do Irai: Efeitos da matéria orgânica e interação com microalgas**. Dissertação (Mestrado) UFPR 164p. 2006.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O. Ecossistemas de águas interiores. In: REBOUÇAS, A. da C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G (orgs), **Águas doces no Brasil – Capital ecológico, uso e conservação**. 2. ed. São Paulo: Escrituras, 2002.

VAN LEEUWEN, C.J, Short-term toxicity testing. In: KRUIJF, H.A.M.; ZWART, D.; VISWANATHAN, P.N.; RAY, P.K. (Eds) **Manual on Aquatic Toxicology** 332p. 1988.

VIJVERBERG, J. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. **Fresh. Biol**, v.21, p.317-373. 1989

WETZEL, R.G. **Limnologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1110 p 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Copper**. Geneva: WHO. (Environmental Health Criteria 200). 1998.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima. 464 p. 2006.