



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) 260-8305

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

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

E-mail : ppgern@power.ufscar.br



**Consumo e influência de exopolissacarídeos de *Anabaena*
spiroides (Cyanophyceae) sobre a toxicidade e captura do cobre
em *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae)**

Rodrigo Brasil Choueri

São Carlos
2004



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) 260-8305

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

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

E-mail : ppgem@power.ufscar.br



**Consumo e influência de exopolissacarídeos de *Anabaena*
spiroides (Cyanophyceae) sobre a toxicidade e captura do cobre
em *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae)**

Rodrigo Brasil Choueri

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
2004

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

C552ci

Choueri, Rodrigo Brasil.

Consumo e influencia de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) sobre a toxicidade e captura do cobre por *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae) / Rodrigo Brasil Choueri. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Limnologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Cobre. 4. *Anabaena spiroides*. 5. *Ceriodaphnia cornuta*. I. Título.

CDD: 574.52632 (20^a)

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
Orientadora

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
Co-orientadora

"Como podeis comprar ou vender o céu, a tepidez do chão? A idéia não tem sentido para nós. Se não possuimos o frescor do ar ou o brilho da água, como podeis querer comprá-los? Qualquer parte desta terra é sagrada para meu povo. Qualquer folha de pinheiro, qualquer praia, a neblina dos bosques sombrios, o brilhante e zumbidor inseto, tudo é sagrado na memória e na experiência de meu povo. A seiva que percorre o interior das árvores leva em si as memórias do homem vermelho.

Os mortos do homem branco esquecem a terra de seu nascimento, quando vão pervagar entre as estrelas. Nossos mortos jamais esquecem esta terra maravilhosa, pois ela é a mãe do homem vermelho. Somos parte da terra e ela é parte de nós. As flores perfumadas são nossas irmãs, os gamos, os cavalos a majestosa águia, todos nossos irmãos. Os picos rochosos, a fragrância dos bosques, a energia vital do pônei e do homem, tudo pertence a uma só família.

Assim, quando o grande chefe em Washington manda dizer que deseja comprar nossas terras, ele está pedindo muito de nós. O grande Chefe manda dizer que nos reservará um sítio onde possamos viver confortavelmente por nós mesmos. Ele será nosso pai e nós seremos seus filhos. Se for assim, vamos considerar a sua proposta sobre a compra de nossa terra. Mas tal compra não será fácil, já que esta terra é sagrada para nós.

A límpida água que percorre os regatos e rios não é apenas água, mas o sangue de nossos ancestrais. Se vos vendermos a terra, tereis de lembrar a nossos filhos que ela é sagrada, e que qualquer reflexo espectral sobre a superfície dos lagos evoca eventos e fases da vida do meu povo. O marulhar das águas é a voz dos nossos ancestrais.

Os rios são nossos irmãos, eles nos saciam a sede. Levam as nossas canoas e alimentam nossas crianças. Se vendermos nossa terra a vós, deveis vos lembrar e ensinar a nossas crianças que os rios são nossos irmãos, vossos irmãos também, e deveis a partir de então dispensar aos rios a mesma espécie de afeição que dispensais a um irmão.

Nós mesmos sabemos que o homem branco não entende nosso modo de ser. Para ele um pedaço de terra não se distingue de outro qualquer, pois é um estranho que vem de noite e rouba da terra tudo de que precisa. A terra não é sua irmã, mas sua inimiga, depois que a submete a si, que a conquista, ele vai embora, à procura de outro lugar. Deixa atrás de si a sepultura de seus pais e não se importa. A cova de seus pais é a herança de seus filhos, ele os esquece. Trata a sua mãe, a terra, e seus irmãos, o céu como coisas a serem comprados ou roubados, como se fossem peles de carneiro ou brilhantes contas sem valor. Seu apetite vai exaurir a terra, deixando atrás de si só desertos. Isso eu não compreendo. Nosso modo de ser é completamente diferente do vosso. A visão de vossas cidades faz doer aos olhos do homem vermelho.

Talvez seja porque o homem vermelho é um selvagem e como tal, nada possa compreender.

Nas cidades do homem branco não há um só lugar onde haja silêncio, paz. Um só lugar onde ouvir o farfalhar das folhas na primavera, o zunir das asas de um inseto. Talvez seja porque sou um selvagem e não possa compreender.

O barulho serve apenas para insultar os ouvidos. E que vida é essa onde o homem não pode ouvir o pio solitário da coruja ou o coaxar das rãs à margem dos charcos à noite? O índio prefere o suave sussurrar do vento esfrolando a superfície das águas do lago, ou a fragrância da brisa, purificada pela chuva do meio-dia ou aromatizada pelo perfume dos pinhos.

O ar é precioso para o homem vermelho, pois dele todos se alimentam. Os animais, as árvores, o homem, todos respiram o mesmo ar. O homem branco parece não se importar com o ar que respira. Como um cadáver em decomposição, ele é insensível ao mau cheiro. Mas se vos vendermos nossa terra, deveis vos lembrar que o ar é precioso para nós, que o ar insufla seu espírito em todas as coisas que dele vivem. O ar que vossos avós inspiraram ao primeiro vagido foi o mesmo que lhes recebeu o último suspiro.

Se vendermos nossa terra a vós, deveis conservá-la à parte, como sagrada, como um lugar onde mesmo um homem branco possa ir sorver a brisa aromatizada pelas flores dos bosques.

Assim consideraremos vossa proposta de comprar nossa terra. Se nos decidirmos a aceitá-la, farei uma condição: O homem branco terá que tratar os animais desta terra como se fossem seus irmãos.

Sou um selvagem e não compreendo de outro modo. Tenho visto milhares de búfalos a apodrecerem nas pradarias, deixados pelo homem branco que neles atira de um trem em movimento.

Sou um selvagem e não compreendo como o fumegante cavalo de ferro possa ser mais importante que o búfalo, que nós caçamos apenas para nos mantermos vivos.

Que será dos homens sem os animais? Se todos os animais desaparecem, o homem morreria de solidão espiritual. Porque tudo isso pode cada vez mais afetar os homens. Tudo está encaminhado.

Deveis ensinar a vossos filhos que o chão onde pisam simboliza a as cinzas de nossos ancestrais. Para que eles respeitem a terra, ensinai a eles que ela é rica pela vida dos seres de todas as espécies. Ensinai a eles o que ensinamos aos nossos: Que a terra é a nossa mãe. Quando o homem cospe sobre a terra, está cuspidando sobre si mesmo. De uma coisa nós temos certeza: A terra não pertence ao homem branco; O homem branco é que pertence à terra. Disso nós temos certeza. Todas as coisas estão relacionadas como o sangue que une uma família. Tudo está associado. O que fere a terra fere também aos filhos da terra.

O homem não tece a teia da vida: É antes um dos seus fios. O que quer que faça a essa teia, faz a si próprio.

Mesmo o homem branco, a quem Deus acompanha e com quem conversa como um amigo, não pode fugir a esse destino comum. Talvez, apesar de tudo, sejamos todos irmãos.

Nós o veremos. De uma coisa sabemos, é que talvez o homem branco venha a descobrir um dia: nosso Deus é o mesmo deus.

Podeis pensar hoje que somente vós o possuís, como desejais possuir a terra, mas não podeis. Ele é o Deus do homem e sua compaixão é igual tanto para o homem branco, quanto para o homem vermelho.

Esta terra é querida dele, e ofender a terra é insultar o seu criador. Os brancos também passarão talvez mais cedo do que todas as outras tribos. Contaminai a vossa cama, e vos sufocareis numa noite no meio de vossos próprios excrementos.

Mas no nosso parecer, brilhareis alto, iluminado pela força do Deus que vos trouxe a esta terra e por algum favor especial vos outorgou domínio sobre ela e sobre o homem vermelho. Este destino é um mistério para nós, pois não compreendemos como será no dia em que o último búfalo for dizimado, os cavalos selvagens domesticados, os secretos recantos das florestas invadidos pelo odor do suor de muitos homens e a visão das brilhantes colinas bloqueada por fios falantes.

Onde está o matagal? Desapareceu. Onde está a águia? Desapareceu. Restará dar adeus à andorinha da torre e à caça; o fim do viver e o início do sobreviver.

Talvez compreendêssemos com que sonha o homem branco se soubéssemos quais as esperanças transmite a seus filhos nas longas noites de inverno, quais visões do futuro oferecem para que possam ser formados os desejos do dia de amanhã. Mas nós somos selvagens. Os sonhos do homem branco são ocultos para nós. E por serem ocultos temos que escolher o nosso próprio caminho. Se consentirmos na venda é para garantir as reservas que nos prometeste. Lá talvez possamos viver os nossos últimos dias como desejamos. Depois que o último homem vermelho tiver partido e a sua lembrança não passar da sombra de uma nuvem a pairar acima das pradarias, a alma do meu povo continuará a viver nestas florestas e praias, porque nós as amamos como um recém-nascido ama o bater do coração de sua mãe. Se te vendermos a nossa terra, ama-a como nós a amávamos. Protege-a como nós a protegíamos. Nunca esqueça como era a terra quando dela tomou posse. E com toda a sua força, o seu poder, e todo o seu coração, conserva-a para os seus filhos, e ama-a como Deus nos ama a todos. Uma coisa sabemos: o nosso Deus é o mesmo Deus. Esta terra é querida por Ele. Nem mesmo o homem branco pode evitar o nosso destino comum".

Carta enviada em 1855 ao presidente dos Estados Unidos, Francis Pierce, pelo cacique Seattle, da tribo Suquamish, depois de o Governo haver dado a entender que pretendia comprar o território ocupado por aqueles índios.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão, pela orientação e ensinamentos, mas, principalmente, pela oportunidade e confiança;

À Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi, pela orientação e ensinamentos, mas, sobretudo, pela dedicação;

À FAPESP, pelo financiamento do projeto e à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

À Profa. Dra. Odete Rocha, Prof. Dr. Armando Vieira e Prof. Dr. Evaldo Gaeta Espíndola pela ajuda, comentários e sugestões no exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini e ao Rogério, pela ajuda com o rotaevaporador;

À Patrícia, por me ensinar quase tudo que sei dos procedimentos de laboratório, mas, acima de tudo, pela paciência e amizade;

À Kika, por me ajudar sempre que precisei, inclusive nos acidentes...

À Irene, Gabi, Prof. Ivã, Tiago, Miguel, pelos bate-papos e risadas, e, sobretudo, por tornarem nosso laboratório um local descontraído e alegre;

Ao Pedrinho, Sebastião, Sandra, Danilo, Luís e a todo pessoal que trabalha com o Prof. Armando, pela constante disposição em ajudar;

À Alessandra e Karen, pela maravilhosa amizade (saudades das tardes batendo papo e jogando pebol);

Ao Vitelo Vicenzoli, Jão e Doug, pelos dois anos de convivência, amizade e, é claro, muitas risadas...

À Paloma, pela ajuda, pela paciência nas horas difíceis, pela alegria nos momentos de felicidade, e, acima de tudo, pelo amor e carinho...

Aos meus irmãos e irmãs Rico, Caica, Lavinho, Jãozinho e Mi, saudades...

À minha mãe, pelo apoio, pelo conforto, pela alegria contagiante...

À Rosa e ao meu pai, a quem dedico o texto inicial da dissertação; talvez esse texto tenha sido a semente do meu amor à vida, apenas por ser vida, e à liberdade, apenas pela liberdade.

SUMÁRIO

	P.
INTRODUÇÃO.....	13
ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	18
OBJETIVOS.....	20
1. Objetivos gerais.....	20
2. Objetivos específicos.....	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
1. Área de estudo.....	21
2. Coleta e cultivo de <i>Ceriodaphnia cornuta</i>	22
3. Relação peso/comprimento para <i>C. cornuta</i>	23
4. Efeito da ingestão de exopolissacarídeos de <i>Anabaena spiroides</i> sobre a bionomia de <i>C. cornuta</i>	24
4.1 Obtenção de exopolissacarídeos de <i>A. spiroides</i>	25
4.1.1 Preparação do meio experimental.....	25
4.2 Seston.....	26
4.3 Suspensão de células de <i>Scenedesmus bijugus</i>	26
5. Experimento de toxicidade aguda e captura de cobre por <i>C. cornuta</i>	27
5.1 Preparação do material.....	27
5.2 O experimento.....	27
5.3 Determinação de cobre nos organismos.....	29
CAPÍTULOS.....	30
Efeito da ingestão de exopolissacarídeos de <i>Anabaena spiroides</i> KLEBAHN sobre a bionomia de <i>Ceriodaphnia cornuta</i> SARS.....	31
Influência de exopolissacarídeos de <i>Anabaena spiroides</i> KLEBAHN na toxicidade e captura do cobre por <i>Ceriodaphnia cornuta</i> SARS.....	57
Conclusões.....	75

Referências bibliográficas.....76

FIGURAS.....83

LISTA DE FIGURAS

	P.
Figura 1 – A cianofícea <i>Anabaena spiroides</i> , cujos exopolissacarídeos foram utilizados neste estudo.....	84
Figura 2 – Aspecto geral de uma fêmea de <i>Ceriodaphnia cornuta</i>	85
Figura 3 – Localização e imagem do reservatório de Barra Bonita, local de procedência das espécies estudadas.....	86
Figura 4 – Regressão peso seco (μg) – comprimento (mm) para <i>Ceriodaphnia cornuta</i>	87

RESUMO

A espécie humana altera profundamente e com grande rapidez o ambiente no qual se insere. Com o desenvolvimento industrial, a contaminação da água, do ar e do solo tornou-se preocupante, sobretudo nas grandes cidades densamente povoadas. Dentre os contaminantes, estão os metais pesados, cujos níveis nos ecossistemas aquáticos e terrestres vêm aumentando a cada ano. Esses elementos podem ser bioacumulados nos organismos e biomagnificados nas cadeias tróficas. A biodisponibilidade de metais pode ser influenciada por vários fatores, entre eles, a formação de complexos com a matéria orgânica dissolvida, como exudatos algais, que geralmente diminui a toxicidade desses elementos. O escopo deste trabalho foi avaliar o uso potencial de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) como fonte alimentar de *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae), bem como determinar a influência dessa matéria orgânica na toxicidade e captura do cobre por esse cladóceros.

Inicialmente, foi confeccionada uma regressão peso seco (μg) – comprimento (mm) para *Ceriodaphnia cornuta*. Em seguida, foi investigada a ingestão do exopolissacarídeo por *C. cornuta* e a influência desse tipo de alimento em parâmetros bionômicos dessa espécie zooplanctônica. Os resultados demonstraram que o exopolissacarídeo *A. spiroides* é capaz de sustentar uma população de *C. cornuta*. Os animais alimentados com esse composto apresentaram taxa de crescimento populacional (r) de 0,263, bastante significativa para a espécie. O experimento de toxicidade e captura de cobre por *C. cornuta* revelou que a adição de 30mg L^{-1} de exopolissacarídeo de *A. spiroides* aumentou em aproximadamente 4 vezes a EC/50 (calculada pelo método “Trimmed Spearman-Kärber”) do cobre para *C. Cornuta* (de $8,11 \times 10^{-8}\text{M} \pm 9,80 \times 10^{-9}\text{M}$ - sem exopolissacarídeo - para $3,25 \times 10^{-7}\text{M} \pm 5,30 \times 10^{-8}\text{M}$ – com exopolissacarídeo). As concentrações de cobre nos organismos após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do metal no meio experimental foram determinadas em polarógrafo através da técnica de DPASV e demonstraram pouca variação entre concentrações e entre os tratamentos com e sem exopolissacarídeos, o que sugere que os organismos testados regulem o conteúdo de cobre no corpo.

ABSTRACT

Human specie can alter deeply and very fast the enviroment in which it is in. Because of the industrial development, the water, air and soil contamination have become cause of concern, chiefly in big cities with great populations. Among the contaminants figure the heavy metals, which levels at aquatic and terrestrial ecosystems are growin up every year. These elements are able to bioaccumulate in the organisms and biomagnified on the food webs. The bioavailability of metals can be influenced by several factors like the complexation with dissolved organic matter, e.g. algal exudates, that generally decreases the toxicity of this elements. The scope of this work was evaluate the potencial use of exopolysccharides of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) as food source of *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae), and to establish the influence of this organic matter on copper toxicity and uptake to this cladoceran.

Initially, it was established the *C. cornuta* length-weigth relation. After this, it was investigated ingestion of exopolysccharide and its influence in life history parameters of *C. cornuta*. Results showed that *A. spiroides* exopolysccharide is able to sustain a population of this zooplanktonic specie. Individuals fed with this compound exhibited rate of population growth very significant to this specie ($r = 0,263$). The copper acute toxicity and uptake by *C. cornuta* assay revealed that addition of 30mg L^{-1} of *A. spiroides* exopolysccharide increased about 4 times copper EC/50 (calculated by “Trimmed Spearman-Karber” method) to *C. Cornuta* (from $8,11 \times 10^{-8}\text{M} \pm 9,80 \times 10^{-9}\text{M}$ – without exopolysccharide – to $3,25 \times 10^{-7}\text{M} \pm 5,30 \times 10^{-8}\text{M}$ – with addition of exopolysccharide). Copper concentration in the organisms after 24 hours exposure to several metal concentration was determined by DPASV using a polarograph and showed little variation among concentrations and treatments with and without exopolysccharide. It suggests that organisms of this study were able to regulate copper body contents.

INTRODUÇÃO

O histórico da vida na Terra é determinado por interações entre os seres vivos e seu ambiente. Em sua hipótese explicitada na obra “As Eras de Gaia”, LOVELOCK (1988) defende que os seres vivos e o ambiente estão em constante co-evolução: a vida molda o ambiente assim como o ambiente altera a evolução da vida.

Nesse contexto inclui-se a espécie humana que, com sua tecnologia, altera profundamente e com grande rapidez o ambiente no qual se insere. O desenvolvimento da agricultura sedentária (Neolítico – 11.000 anos atrás) e, posteriormente, da Revolução Agrícola e Industrial (século XVIII) provocaram uma explosão demográfica nas populações humanas e uma aceleração na intervenção antrópica sobre a natureza. Foi com o nascimento da grande indústria, no decorrer do século XIX, que a contaminação da água, do ar e do solo chegou a tornar-se preocupante, sobretudo nas grandes cidades industriais densamente povoadas (RAMADE, 1979).

A partir de meados do século XX, a capacidade humana de alterar a natureza não somente aumentou até atingir inquietante magnitude, como também se modificou de forma qualitativa, com a contaminação do meio por via de materiais perigosos e até letais (CARSON, 1962).

Dentre estes materiais, com toda a certeza, um dos mais preocupantes é o grupo dos “metais pesados”, por causarem múltiplos e adversos efeitos ao ambiente e não serem facilmente eliminados dos ecossistemas (MAZON, PINHEIRO & FERNANDES, 2000).

Segundo o “Dicionário de Ciências Ambientais” (1999), o termo “metais pesados” é aplicado não apenas aos metais de alto peso molecular, mas também aos elementos que não são rigorosamente metais, cujos riscos à biota e ao ambiente são semelhantes aos dos elementos primeiramente citados. A denominação mais aceita atualmente para esta categoria de elementos químicos é “elemento-traço” (ESTEVES, 1998).

No entanto, alguns dos metais tóxicos ou pesados são também nutrientes essenciais aos seres vivos, sendo requeridos em concentrações diminutas (micronutrientes) para sua sobrevivência. O ferro e o cobre, por exemplo, são fundamentais para os organismos, participando diretamente de reações bioquímicas como cofatores de determinadas enzimas, auxiliando sua atividade (MAZON, PINHEIRO & FERNANDES, 2000). Estes elementos-traço são chamados de essenciais, sendo encontrados em tecidos vivos em concentrações extremamente baixas (menor que 0,01% da massa corpórea do organismo). Sua ausência ou deficiência pode resultar em doenças, redução do crescimento ou alteração da atividade reprodutiva (MAZON, PINHEIRO & FERNANDES, 2000). Por outro lado, se o ambiente estiver carregado de elementos-traço, os animais e vegetais os absorverão em quantidades excessivas, podendo intoxicar-se (DAJOZ, 1979).

Com o aumento da industrialização e da demanda crescente por recursos minerais cada vez mais diversificados, vários elementos têm sido concentrados em determinadas regiões do planeta, provocando sérios problemas ambientais (ESTEVES, 1998). Além da industrialização e da mineração, os efluentes domésticos, as drenagens urbanas e da agricultura são também responsáveis pelo aumento dos níveis de elementos-traço nos ecossistemas aquáticos (SAMANIDOU & FYTIANOS, 1990 *apud* STEPHENSON, LAMBUSKA & STRINGER, 1998).

Os prejuízos ambientais causados pelos elementos-traço têm provocado danos a populações humanas. No Brasil, a mídia recentemente noticiou dois importantes casos de contaminação protagonizados pela empresa Shell. No ano de 2001, no bairro “Recanto dos Pássaros” em Paulínia – SP (126 km a noroeste da cidade de São Paulo), onde a empresa mantinha atividades até 1995, e em 2002, na “Vila Carioca”, zona sul da cidade de São Paulo, onde a Shell manipulava pesticidas entre os anos de 1950 e 1978. Pode-se, ainda, citar o histórico caso de morte de pessoas no Japão, vítimas do envenenamento por cádmio (doença de Itai-Itai), resultado da ingestão de arroz contaminado (ESTEVEES, 1998). Mas, sem dúvida, o mais conhecido caso de contaminação por elementos-traço é o da aldeia de pescadores de Minamata e Niigata no Japão, em 1954. Nos arredores da baía de Minamata havia uma indústria que despejava diariamente ao mar concentrações muito diluídas de sulfato de mercúrio, não detectáveis pelos métodos da época. A contaminação das pessoas ocorreu devido à ingestão de peixes contaminados por metilmercúrio progressivamente concentrado ao longo da cadeia alimentar (DAJOZ, 1979).

Os elementos-traço podem ser bioacumulados nos organismos e biomagnificados nas cadeias tróficas de ecossistemas aquáticos e terrestres (NRIAGU, 1990). É consenso a idéia de que a bioconcentração de elementos químicos é uma característica importante para avaliar o risco potencial de novos compostos e entender o comportamento ambiental de compostos xenobióticos já presentes em sistemas naturais (HAITZER *et al.*, 1998).

Segundo ESTEVES (1998), os elementos-traço podem estar sob a forma iônica, complexada (a moléculas orgânicas e inorgânicas) e particulada (principalmente como componentes dos detritos e da biomassa). Sua toxicidade depende da forma como ele se apresenta no ambiente (SUNDA & GUILLARD, 1976; ANDERSON & MOREL, 1978), de sua concentração e do organismo afetado (LOMBARDI & VIEIRA, 1999). A complexação geralmente diminui a disponibilidade biológica dos metais (GIESY, LEVERSEE & WILLIAMS, 1977; LORES & PENNOCK, 1999; KIM *et al.*, 2001; McGEER *et al.* 2002), uma vez que a forma iônica é sua forma mais biodisponível (SUNDA & GUILLARD, 1976; GIESY *et al.*, 1977; ANDERSON & MOREL, 1978; SUNDA & LEWIS, 1978; SUNDA & HUNTSMAN, 1998). No entanto, esta não é uma

regra geral; a matéria orgânica dissolvida (MOD) pode tanto diminuir como aumentar a toxicidade de metais e xenobióticos orgânicos (KLEIN *et al.*, 1995; KUKKONEN, 1995 *apud* STUIJFZAND *et al.*, 1999). Segundo HAITZER *et al.* (1998), existem estudos que atestam que a MOD aumenta a toxicidade de compostos orgânicos e a acumulação de metais.

A bioacumulação pode ocorrer por duas vias: ingestão de alimento contaminado e capturado diretamente da água (HAITZER *et al.*, 1998). Quando o cobre é acumulado pelo fitoplâncton, e este ingerido pelo zooplâncton, o metal pode ser transferido e produzir um efeito tóxico sobre estes últimos organismos (SUNDA & GUILLARD, 1976), ou sobre peixes que se alimentem do zooplâncton contaminado. É possível que a contaminação de organismos zooplancônicos também possa ocorrer quando estes ingerem exopolissacarídeos de origem algal complexados a metais.

A principal fonte de carbono orgânico em reservatórios e lagos é a fotossíntese efetuada por macrófitas e microalgas. A excreção de matéria orgânica dissolvida é um processo rotineiro do fitoplâncton. Polissacarídeos extracelulares compreendem uma importante fração desses excretados (PAULSEN & VIEIRA, 1994) e constituem de 20 a 45% do carbono orgânico particulado e de 20 a 90% do carbono orgânico dissolvido de ambientes aquáticos (MINOR & EGLITON, 1999). O motivo pelo qual algumas espécies de algas excretam materiais orgânicos no ambiente ainda é muito discutido (FOGG, 1983; BJORNENSEN, 1988; WOOD & VAN VALEN, 1990). Entre as funções destes materiais para o fitoplâncton, além da já citada diminuição da concentração de íons metálicos livres no ambiente, podemos citar também a possível coevolução entre células fitoplancônicas, bactérias e organismos bacterívoros: em situações de alta intensidade de luz e escassez nutricional, ter-se-ia um aumento na excreção das células, principalmente de carboidratos, o que criaria um meio adequado para o crescimento de bactérias que, por sua vez, serviriam de alimento para organismos bacterívoros, remineralizando a matéria orgânica dissolvida e enriquecendo o ambiente (WOOD & VAN VALEN, 1990). Apesar de haver muitos estudos sobre a função ecológica destes compostos, enfatizando seu papel na complexação de metais pesados (JARDIM & PEARSON, 1984; CORRADI *et al.*, 1998; GORBI *et al.*, 2002; LOMBARDI

& VIEIRA, 1998a; 1998b; 1999; 2000; 2002), pouco se sabe sobre a utilização de exudatos algais por parte de organismos zooplanctônicos e o papel destes compostos como possível veículo de entrada de metais pesados nas cadeias tróficas.

Espécies zooplanctônicas são ecologicamente importantes por converterem fitoplâncton e bactérias em proteína animal e constituírem importante fração da dieta de diversos peixes (especialmente na fase larval). Sendo o zooplâncton elemento intermediário da base da cadeia alimentar de ambientes aquáticos, estes organismos podem representar importante papel na acumulação e na transferência de elementos-traço para níveis superiores das cadeias tróficas em que estão inseridos.

O cobre é um elemento-traço fundamental para o desenvolvimento de plantas e animais e está normalmente associado à poluição industrial e urbana (FERREIRA, MACHADO & ZALMON, 2000). Se o meio apresentar altas concentrações de cobre biodisponível, a bioacumulação pode ocorrer com possíveis efeitos tóxicos (LAMBUSKA *et al.*, 2000). Sua toxicidade em organismos aquáticos é amplamente estudada e, segundo BRYAN & LANGSTON (1992), um número considerável de espécies é sensível a concentrações dissolvidas a partir de $1 - 10 \mu\text{g L}^{-1}$ (aproximadamente $1,57 \times 10^{-8} - 1,57 \times 10^{-7} \text{M}$) (LAMBUSKA *et al.*, 2000). O efeito deletério do sulfato de cobre (usado para controle da biomassa de algas) sobre comunidades zooplanctônicas foi observado no trabalho de CALEFFI (2000), na represa de Guarapiranga-SP.

Em ambientes naturais, a concentração total de metais indica a grandeza da contaminação, mas não oferece muitas informações quanto à forma em que o metal se apresenta, ou seja, pode-se inferir muito pouco sobre sua mobilidade e biodisponibilidade (LOMBARDI & VIEIRA, 1999). Para uma avaliação completa destes aspectos, estudos de complexação de metais por MOD natural devem ser realizados, especialmente para se entender esses processos em ambientes eutrofizados como o do Reservatório de Barra Bonita-SP. Além disso, a maioria dos estudos neste campo considera os exudatos algais em sua totalidade, não dando informações específicas quanto às classes de compostos orgânicos que agem como agentes quelantes (LOMBARDI & VIEIRA, 1998).

Este trabalho teve como objetivo estudar a relação entre elementos-traço, matéria orgânica de origem natural e zooplâncton, avaliando a influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) (figura 1) sobre a toxicidade e captura do cobre em *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae) (figura 2).

ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em capítulos, na forma de artigos científicos, os quais estão apresentados nas normas da revista na qual se pretende submetê-los para publicação.

O primeiro capítulo intitulado “Efeito da ingestão de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* KLEBAHN sobre a bionomia de *Ceriodaphnia cornuta* SARS” investiga o efeito da ingestão de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* sobre *C. cornuta* (Crustacea, Cladocera), quanto ao seu ciclo de vida em condições controladas em laboratório. Pretende-se submeter este manuscrito para publicação no periódico *Freshwater Biology* (normas ao final do capítulo).

O segundo capítulo, “Influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* KLEBAHN na toxicidade e bioacumulação captura do cobre em *Ceriodaphnia cornuta* SARS”, avalia a

influência de exopolissacarídeos de *A. spiroides* sobre a toxicidade e a captura do cobre por *C. cornuta* (Crustacea, Cladocera). Pretende-se submeter este manuscrito para publicação no periódico *Freshwater Biology* (normas ao final do capítulo).

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo estudar a relação elementos-traço – matéria orgânica de origem natural – zooplâncton, avaliando a influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) sobre a toxicidade e captura do cobre em *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a biomassa individual (peso seco) e relações comprimento/peso de diferentes fases de desenvolvimento de *C. cornuta*;
- Realizar um levantamento de variáveis indicadoras da saúde dos animais em cultivos laboratoriais;
- Verificar se há a ingestão de exopolissacarídeos de *A. spiroides* por *C. cornuta*;
- Investigar o efeito da ingestão de exopolissacarídeos de *A. spiroides* sobre a bionomia de *C. cornuta* em havendo de fato sua ingestão;
- Avaliar a influência de exopolissacarídeos de *A. spiroides* sobre a toxicidade do cobre para *C. cornuta*;
- Avaliar a influência de exopolissacarídeos de *A. spiroides* sobre a captura de cobre por *C. cornuta*;

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ÁREA DE ESTUDO

A Bacia do Alto Tietê abrange um grande número de municípios, sendo alguns com elevado grau de industrialização, tais como Campinas, Paulínia, Piracicaba, Limeira e Rio Claro. Entre as indústrias localizadas nessa área, encontram-se as de produtos alimentícios, de fabricação de conservantes, óleos, resinas, indústrias têxteis, de papel e celulose, químicas, metalúrgicas, além de usinas de álcool. Há, portanto, grande aporte de efluentes industriais e domésticos em toda Bacia, incluindo o reservatório de Barra Bonita (COSTA & ESPÍNDOLA, 2000). Segundo ESTEVES (1998), os lagos são reservatórios potenciais de elementos-traço devido às suas características de ambientes deposicionais.

O reservatório de Barra Bonita localiza-se entre os municípios de Barra Bonita e Igarapu do Tietê (22°29' a 22°44'5" latitude Sul e 48°10' longitude Oeste) (figura 3). O rio Tietê é o principal formador desse corpo d'água, sendo o rio Piracicaba o segundo maior tributário do reservatório de Barra Bonita. Esse reservatório foi construído com a finalidade principal de gerar energia elétrica (CALIJURI *et al.*, 2002) e é parte importante da Hidrovia Tietê-Paraná, sendo a primeira represa do sistema Tietê (COSTA & ESPÍNDOLA, 2000). Além

de importante recurso energético e via de transporte fluvial, o reservatório é utilizado na irrigação, piscicultura, recreação, abastecimento e desenvolvimento industrial da região. Está a uma altitude de 430 m, apresenta uma área inundada de 329,12 km², uma profundidade média de 16 m, perímetro de 525 km e volume total de vertedouro estimado em 4.200 m³.s⁻¹ (TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1990 in COSTA & ESPÍNDOLA, 2000).

2. COLETA E CULTIVO DE *Ceriodaphnia cornuta*

Os cultivos de *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae) em laboratório foram iniciados a partir de animais coletados no Reservatório de Barra Bonita, em um ponto médio à montante da barragem. Procurou-se cultivar uma amostra representativa da população, evitando-se as populações monoclonais. Para os cultivos, foi seguida a metodologia apresentada por VIJVERBERG (1989).

A coleta foi feita por meio de arrastos horizontais e verticais com o auxílio de rede de plâncton com 0,68µm de abertura de malha. Depois de coletados, os organismos foram acondicionados em galões de polietileno com capacidade para vinte litros contendo água do próprio ambiente, para o transporte ao laboratório.

No laboratório os animais foram triados, identificados e acondicionados em recipientes de vidro com capacidade de 4 litros. As culturas-estoque foram mantidas em sala com temperatura controlada de 21±1°C e fotoperíodo de 12/12h luz/escuro. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em câmara incubadora (FANEM 347 CDG) com temperatura regulada para 25°C e o mesmo fotoperíodo.

A água utilizada na manutenção dos aquários foi coletada quinzenalmente no mesmo local da coleta dos organismos. No laboratório a água foi filtrada em pré-filtro e autoclavada à 120°C por 30 minutos. Também foram cultivados animais em água reconstituída (U.S. EPA, 1991) com 44mg CaCO₃ L⁻¹ e pH acertado para 6,8, para os experimentos de toxicidade, uma vez que água do Reservatório de Barra Bonita contém concentrações relativamente altas de cobre. O alimento foi fornecido a cada 48 horas, constituído de solução concentrada de algas (*Chlorella lacustris*, *Scenedesmus bijugus*, *Selenastrum capricornuta*) além de um preparado de levedura e ração de peixe fermentado na proporção 1:1 (ROJAS *et al.*, 2001). A água das culturas foi parcialmente renovada a cada semana, e totalmente renovada mensalmente.

3. RELAÇÃO COMPRIMENTO/PESO PARA *Ceriodaphnia cornuta*

Para a obtenção de biomassa (peso seco), um número variável (30-100) de indivíduos não fixados de cada fase de desenvolvimento das diferentes espécies foram medidos sob lupa (Leica MZ6) com ocular micrometrada, agrupados, lavados três vezes com água destilada e transferidos para cadinhos de alumínio (0,5cm de diâmetro) pré-pesados (P₀). Estes organismos foram secos a 60°C por 24 horas e, após resfriamento em dessecador, pesados em balanças microanalítica (Mettler Toledo UMT-2), com precisão de 0,1µg (P₁). A diferença entre P₁ e P₀ representa o peso seco total dos animais. Com os dados obtidos e utilizando-se o software “Origin 6.0”, foi obtida a equação matemática que relaciona esses dois parâmetros, bem como o gráfico respectivo. A equação obtida é do tipo:

$$W = a.L^b$$

relacionando comprimento(L) (mm) e peso seco (W) (μg) para a espécie estudada (figura 4). As constantes “a” e “b” são obtidas após o ajuste da figura.

4. EFEITO DA INGESTÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Anabaena spiroides* SOBRE A BIONOMIA DE *Ceriodaphnia cornuta*.

Dados bionômicos de *C. cornuta*, tais como tempo de desenvolvimento embrionário, idade e comprimento da primípara (primeira postura de ovos), crescimento, fecundidade (número de ovos depositados por cria), porcentagem de eclosão e intervalo na produção de ovos (intervalo de tempo entre uma dada postura de ovos e a seguinte), foram obtidos de 12 animais tratados com exopolissacarídeo de *A. spiroides*, durante os primeiros 15 dias de vida. O crescimento populacional (r) nesse período foi calculado, a partir de dados de sobrevivência e fecundidade, de acordo com a fórmula (WETZEL, 1983):

$$r = (\text{Log}_e N_t - \text{Log}_e N_0) \cdot t^{-1}, \text{ onde}$$

r é o crescimento populacional, N_0 é o número de indivíduos no tempo 0 e N_t é o número de indivíduos após decorrido o tempo t .

O experimento foi realizado em laboratório sob uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro (incubadora FANEM 347 CDG).

Neonatas com até 24 horas de vida foram individualizados em tubos de ensaio contendo 50mL de meio experimental (água mais o alimento fornecido). As observações foram feitas a cada 12 horas com o auxílio de estereomicroscópio Leica MZ6, munido de ocular micrometrada.

Os animais foram alimentados com solução alimentar composta de polissacarídeos excretados por *A. spiroides*, à concentração de 15mg L^{-1} (aproximadamente $3,73\text{mg C L}^{-1}$) de forma a representar uma situação de abundância de alimento. O meio experimental foi trocado a cada 24 horas.

Como base para comparação, foram observados parâmetros bionômicos de 12 animais tratados com a clorofícea *Scenedesmus bijugus* – alimento largamente utilizado em cultivos de cladóceros em laboratório – e de 10 animais tratados com seston do Reservatório de Barra Bonita – de forma a representar uma condição alimentar semi-natural – sob as mesmas condições dos animais tratados com exopolissacarídeo.

4.1 Obtenção de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides*

Para a extração dos exopolissacarídeos, as algas foram cultivadas em meio ASM1 (GORHAM *et al*, 1964), ao qual adicionou-se 500mg L^{-1} de tampão TRIS, e mantidas em sala aclimatada a $22^{\circ}\text{C} \pm 1$, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e aeração constante até o início da fase estacionária de crescimento. As culturas foram, então, filtradas em filtros de fibra de vidro (Sartorius GMF 3 – porosidade de $1,2\mu\text{m}$) para a retirada das células. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 40°C (Quimis, modelo 344B2) e, posteriormente, dialisado em membranas com poros de 12 a 14KD durante 24 horas em água corrente e 48 horas em água destilada para retirada dos sais e material de baixa massa molecular. Os polissacarídeos resultantes desse procedimento foram, por fim, liofilizados (liofilizador Heto DW3 - 2000) e congelados até o momento do uso.

4.1.1 Preparação do meio experimental

Para a preparação do meio experimental, os exopolissacarídeos tiveram sua massa quantificada e foram adicionados à água do Reservatório de Barra Bonita filtrada em filtros de microfibras de vidro com porosidade de $1,2\mu\text{m}$ (Sartorius GMF 3), previamente autoclavada a 120°C por 30 minutos e com pH acertado para aproximadamente 6,8. A solução foi deixada 12 a 15 horas em agitador magnético (Corning PC 420) para a completa

dissolução do exopolissacarídeo. A concentração de carbono orgânico total na água do Reservatório de Barra Bonita, na época em que foi coletada para este experimento, era de 8,29mgC L⁻¹ (ANTÓNIO, comunicação pessoal). O meio experimental foi trocado diariamente durante os experimentos.

4.2 Seston

O seston, tratamento experimental que representa condições alimentares próximas àquelas do ambiente natural, foi obtido a partir da filtração de água do Reservatório de Barra Bonita em rede de 68µm de abertura de malha. Durante o experimento, foram feitas coletas no ambiente a cada 4 dias e a água foi mantida em laboratório em aquários (20L) com aeração constante, sob temperatura de 22±1°C e fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro. Foram quantificados o carbono total, carbono orgânico total e carbono inorgânico da água de Barra Bonita no dia da coleta e após os 4 dias em que foram mantidas no laboratório, a fim de se verificar se, nesse período, houve mudança quantitativa no seston fornecido como alimento aos animais durante os experimentos. A água dos cultivos foi trocada com uma frequência maior (a cada 12 horas) em relação aos outros tratamentos alimentares (a cada 24 horas), de forma a aproximar as condições experimentais ao que se encontra no ambiente natural.

4.3 Suspensão de células de *Scenedesmus bijugus*

As algas foram cultivadas em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) em sala aclimatada a 22°C ± 1, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro. As algas fornecidas como alimento aos animais estavam em fase de crescimento exponencial. Para a preparação do meio experimental, a cultura algal era centrifugada a 1500rpm por 20 minutos (centrífuga FANEM Excelsa II modelo 206 MP). O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspenso em água reconstituída (U.S. EPA, 1991). Esse procedimento foi realizado para evitar eventuais efeitos tóxicos do meio de cultura algal sobre os animais. A suspensão concentrada de *S. bijugus* era diluída a 10⁵céls mL⁻¹ (0,80mgC L⁻¹) – concentração de células amplamente utilizada em cultivos de cladóceros em laboratório – em água do

Reservatório de Barra Bonita (8,29mgC L⁻¹ – ANTÓNIO, comunicação pessoal) previamente filtrada em filtros de microfibras de vidro com porosidade de 1,2µm (Sartorius GMF 3), autoclavada a 120°C por 30 minutos e com pH acertado para aproximadamente 6,8. O meio experimental foi trocado diariamente durante os experimentos. A cada 12 horas, o alimento foi ressuspensionado delicadamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur.

5. EXPERIMENTO DE TOXICIDADE AGUDA E CAPTURA DE COBRE POR *Ceriodaphnia cornuta*

5.1 Preparação do material

Todo material utilizado nos experimentos foi deixado de molho em HNO₃ 1M durante 7 dias, posteriormente enxaguado em água destilada (destilador de vidro Gehaka, modelo DG4K, versão 1.04) e, depois de seco, armazenado em sacos plásticos fechados para evitar contaminação.

5.2 O experimento

Para a preparação do meio experimental, os exopolissacarídeos (obtidos da mesma forma como descrito para o experimento de bionomia) foram pesados e adicionados à água reconstituída com 44mg CaCO₃.L⁻¹ de dureza e pH acertado para aproximadamente 6,8. Essa solução foi preparada conforme os procedimentos já descritos anteriormente.

Para testar a influência do exopolissacarídeo de *A. spiroides* na toxicidade e captura do cobre por *C. cornuta*, foram utilizadas as concentrações de 10⁻⁸, 10⁻⁷, 4x10⁻⁷, 7x10⁻⁷ e 10⁻⁶M de cobre (CuCl₂), mais o controle (sem adição de cobre), em meio contendo 30mg.L⁻¹ de polissacarídeo dissolvido e 10⁻⁸, 4x10⁻⁸, 7x10⁻⁸, 10⁻⁷ e 10⁻⁶M mais o controle para o

meio experimental sem adição do exopolissacarídeo. A concentração de exopolissacarídeo foi escolhida de acordo com o trabalho de NOGUEIRA (2002) onde se verificou que haveria diferentes respostas na porcentagem de imobilidade dos organismos nas concentrações de cobre utilizadas neste experimento. As soluções contendo metal e exopolissacarídeos foram preparadas 2 horas antes do início do período de incubação dos animais. Para cada tratamento foram feitas três réplicas.

Antes da incubação os animais foram deixados em água reconstituída sem alimento para esvaziamento do trato digestivo. Os animais foram então separados em grupos de 30 indivíduos adultos, medidos (para posterior determinação do peso seco por meio de equação matemática previamente determinada), e incubados a 25°C por 24 horas em recipientes de policarbonato contendo 60mL de meio experimental, tampados para evitar a evaporação.

Após o tempo de incubação, os animais que apresentavam mobilidade e imobilidade foram contados para determinação da EC_{50} através do método “Trimmed Spearman–Karber” (HAMILTON, RUSSO & THURSTON, 1977). Para cada concentração de cobre separadamente, os indivíduos que apresentavam imobilidade foram retirados do recipiente de incubação com auxílio de pipeta de Pasteur, depositados em vidros de relógio, brevemente enxaguados com água destilada, dispostos em filtros de membrana de acetato-celulose previamente deixados de molho em HNO_3 0,1M por 24 horas e encaminhados à estufa de secagem a 60°C. Os animais que apresentavam mobilidade foram retirados do recipiente de incubação utilizando-se peneiras de 6cm de diâmetro e 68 μ m de abertura de malha previamente deixadas de molho por 7 dias em HNO_3 0,1M. Os indivíduos foram em seguida enxaguados brevemente em água destilada, deixados em estufa a 60°C durante 3 minutos para que fossem mortos e submersos por 2 minutos em solução de 0,02M de EDTA (MA *et al.*, 2003). O procedimento de lavagem dos animais em EDTA tem como objetivo a extração do cobre adsorvido na carapaça dos organismos, uma vez que esse metal não está disponível ao metabolismo do animal e, portanto, não é considerado metal acumulado (RAINBOW & DALLINGER, 1993). Estes animais, após serem levemente enxaguados em água destilada para retirada do excesso de EDTA, foram depositados sobre

filtros de acetato-celulose previamente deixados de molho em HNO₃ 0,1M por 24 horas, e, em seguida, encaminhados à estufa a 60°C.

5.3 Determinação de cobre nos organismos

Os animais depositados nos filtros de membrana de acetato-celulose foram acondicionados em frascos de Teflon com tampa, previamente deixados de molho em HNO₃ 6M por 7 dias, onde foram adicionados 200µL de HNO₃ ultra-puro (J.T.Baker) e encaminhados à estufa a 90°C por 48 horas, para digestão das amostras e posterior leitura em polarógrafo “EG&G Instruments”, modelo 303A SMDE através da técnica DPASV (polarografia anódica de pulso diferencial).

Para as determinações de cobre no polarógrafo, o pH das amostras foi ajustado para 2,0 e utilizado tampão inorgânico KCl/HCl (0,09/0,01M), que também foi empregado como eletrólito de suporte, fornecendo uma força iônica de 0,2M. Todas as determinações foram feitas através do método de “adição de padrão”. Dessa maneira, consegue-se minimizar problemas de variação entre amostras e os erros experimentais são menores que os do procedimento clássico, do uso de curvas de calibração. O potencial inicial foi de -0,7V e o final de -0,09V. Altura do pulso de 50mV. Os valores, obtidos em intensidade de corrente (nA), foram transformados para concentração molar através da curva de calibração das adições.

A partir das leituras de metal total presente nos animais, foi calculada a quantidade de metal acumulado por unidade de peso seco de *C. cornuta* (ngCu µgPS⁻¹).

CAPÍTULOS

Efeito da ingestão de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* KLEBAHN sobre a bionomia de *Ceriodaphnia cornuta* SARS.

Rodrigo Brasil Choueri^{1,2}; Maria da Graça Gama Melão²; Ana Teresa Lombardi³; Armando Augusto Henrique Vieira⁴

¹Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

²Laboratório de Plâncton, Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

³Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná-PR, Brasil.

⁴Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

Correspondência: Maria da Graça Gama Melão, Lab. de Plâncton, Dep. de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos – Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905 São Carlos-SP, Brasil. E-mail: dmgm@power.ufscar.br

Título abreviado: Ingestão de exopolissacarídeo de *Anabaena spiroides* por *Ceriodaphnia cornuta*

Palavras-chave: Exopolissacarídeos algais; *Ceriodaphnia cornuta*; Bionomia; *Anabaena spiroides*.

Resumo

1. Grande parte das espécies de microalgas excreta materiais orgânicos no ambiente. Entretanto, pouco se sabe sobre a utilização desses exudatos algais como fonte alimentar para organismos zooplanctônicos e seu impacto nas cadeias tróficas de ambientes aquáticos.

2. Neste estudo investigou-se a utilização de exopolissacarídeo de *Anabaena spiroides* KLEBAHN (Cyanophyceae) como alimento por *Ceriodaphnia cornuta* SARS (Cladocera) e sua capacidade de sustentar o crescimento e a reprodução desses organismos.

3. Para tanto, foram analisados parâmetros bionômicos (idade e comprimento da primípara, comprimento máximo, número total de ovos e neonatas, porcentagem de eclosão, tempo de desenvolvimento embrionário e intervalo de produção de ovos) de indivíduos mantidos sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro, desde o nascimento até a idade de 15 dias. O exopolissacarídeo foi fornecido à concentração de 15mg L^{-1} ($3,73\text{mgC L}^{-1}$) e o meio experimental foi trocado diariamente. Como base para comparação, foram observados parâmetros bionômicos de animais tratados com a clorofícea *Scenedesmus bijugus* e animais alimentados com seston do Reservatório de Barra Bonita, sob as mesmas condições dos animais tratados com exopolissacarídeo.

4. Os organismos zooplanctônicos consumiram o exopolissacarídeo de *A. spiroides* nas condições experimentais e apresentaram expressivo sucesso reprodutivo e crescimento

somático acentuado, o que revela que esse composto é potencialmente capaz de suprir as necessidades nutricionais mínimas para sustentar uma população de *C. cornuta*.

Introdução

Grande parte das espécies de microalgas excreta materiais orgânicos no ambiente, mas o motivo pelo qual o fazem ainda é muito discutido (Fogg, 1983; Bjørnsen, 1988; Wood & Van Valen, 1990). Entre as funções benéficas desses materiais para o próprio fitoplâncton e para toda a biota aquática, pode-se citar a diminuição da concentração de íons metálicos livres no ambiente (Gorbi *et al.*, 2001; Lombardi & Vieira, 1998a; 1998b; 1999; 2000; Lombardi, Vieira & Sartori, 2002), uma vez que o exudato algal é capaz de quelar esses íons, tornando-os biologicamente indisponíveis e, portanto, minimizando sua toxicidade (Di Giulio *et al.*, 2003). Outro importante papel dos excretados algais seria resultado de uma possível coevolução entre fitoplâncton, bactérias e organismos bacterívoros: em situações de alta intensidade de luz e escassez nutricional, ter-se-ia um aumento na excreção das células fitoplanctônicas, principalmente de carboidratos, o que criaria um meio adequado para o crescimento de bactérias que, por sua vez, serviriam de alimento para organismos bacterívoros remineralizando a matéria orgânica dissolvida e enriquecendo o ambiente (Wood & Van Valen, 1990). O que é ponto comum entre pesquisadores é a capacidade de organismos fitoplanctônicos liberarem no ambiente diversos compostos de baixa massa molecular (Hellebust, 1974), assim como compostos de alta massa molecular, em sua maioria, polissacarídeos (Paulsen & Vieira, 1994). Apesar de haver muitos estudos sobre a função ecológica destes compostos, pouco se sabe sobre a utilização de exudatos algais como fonte alimentar para organismos zooplanctônicos e seu impacto nas cadeias tróficas de ambientes aquáticos, especialmente quando se trata de

ambientes límnicos. Prieto *et al.* (2001), investigando o consumo de TEP (*Transparent Exopolymer Particles* – agregados gelatinosos orgânicos, formados por moléculas de polissacarídeos) por uma mistura de espécies de copépodos litorâneos marinhos, verificaram que esses agregados não eram utilizados como fonte alimentar pelos animais estudados. Ao contrário, Ling & Alldredge (2003) registraram consumo de TEP pelo copépodo marinho *Calanus pacificus*. Malej & Harris (1993) verificaram que a presença de exopolímeros de alto peso molecular diminuía o consumo de diatomáceas por copépodos, o que pode sugerir seu uso como fonte complementar de nutrição desses microcrustáceos (Passow & Alldredge, 1999). Em um dos poucos registros para cladóceros de água doce, Stutzman (1995) verificou que colônias de clorofíceas com revestimento gelatinoso, uma das formas de disponibilização dos exopolissacarídeos algais, podem sustentar uma população de *Daphnia magna*. Assim, visto que são escassas as informações sobre o consumo de exopolissacarídeos algais por parte de organismos zooplanctônicos dulcícolas, o presente trabalho visa contribuir para a compreensão do papel ecológico desses compostos orgânicos nas cadeias tróficas dos ambientes aquáticos.

Neste estudo, investigou-se a utilização de exopolissacarídeo da cianofícea *Anabaena spiroides* KLEBAHN como alimento pelo cladóceros *Ceriodaphnia cornuta* SARS e sua capacidade de sustentar o crescimento e a reprodução destes organismos. Ambas as espécies são comumente encontradas no Reservatório de Barra Bonita - SP, área de estudo do presente trabalho, onde são freqüentes florações de *A. spiroides*. Para se atingir o objetivo enunciado, parâmetros bionômicos de indivíduos de *C. cornuta* alimentados com exopolissacarídeo de *A. spiroides* foram obtidos em condições laboratoriais controladas.

Materiais e métodos

Dados bionômicos de *Ceriodaphnia cornuta*, tais como tempo de desenvolvimento embrionário, idade e comprimento da primípara, crescimento, fecundidade, porcentagem de eclosão e intervalo na produção de ovos, foram obtidos de 12 animais tratados com exopolissacarídeo de *Anabaena spiroides*, durante os primeiros 15 dias de vida. O crescimento populacional (r) nesse período foi calculado, a partir de dados de sobrevivência e fecundidade, de acordo com a fórmula (Wetzel, 1983):

$$r = (\text{Log}_e N_t - \text{Log}_e N_0).t^{-1}$$

O experimento foi realizado em laboratório sob uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro (incubadora FANEM 347 CDG).

Os organismos foram coletados no Reservatório de Barra Bonita, São Paulo, Brasil ($22^\circ 32'34,5''$ S, $48^\circ 29'26,4''$ O), trazidos ao laboratório, onde foram triados, identificados, aclimatados e mantidos em culturas-estoque até o início do experimento.

Neonatas com até 24 horas de vida foram individualizadas em tubos de ensaio contendo 50mL de meio experimental (água mais o alimento fornecido). As observações foram feitas a cada 12 horas com o auxílio de estereomicroscópio Leica MZ6, munido de ocular micrometrada.

Como base para comparação, foram observados parâmetros bionômicos de 12 animais tratados com a clorofícea *Scenedesmus bijugus* – alimento largamente utilizado em cultivos de cladóceros em laboratório – e de 10 animais tratados com seston do Reservatório de Barra Bonita – condição alimentar semi-natural – sob as mesmas condições dos animais tratados com exopolissacarídeo.

Exopolissacarídeo de Anabaena spiroides

Neste tratamento experimental, os animais foram alimentados com solução alimentar composta de polissacarídeos excretados por *A. spiroides*, à concentração de 15mg L⁻¹ (aproximadamente 3,73mgC L⁻¹). Para a extração dos exopolissacarídeos, as algas foram cultivadas em meio ASM1 (Gorham *et al*, 1964), ao qual adicionou-se 500mg L⁻¹ de tampão TRIS, e mantidas em sala aclimatada a 22°C ± 1, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e aeração constante até o início da fase estacionária de crescimento. As culturas foram, então, filtradas em filtros de fibra de vidro (Sartorius GMF 3 – 1,2µm de abertura de malha) para a retirada das células. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 40°C (Quimis, modelo 344B2) e, posteriormente, dialisado em membranas com poros de 12 a 14KD durante 24 horas em água corrente e 48 horas em água destilada para retirada dos sais e material de baixa massa molecular. Os polissacarídeos resultantes desse procedimento foram, por fim, liofilizados (liofilizador Heto DW3 - 2000) e congelados até o momento do uso.

Para a preparação do meio experimental, os polissacarídeos tiveram sua massa quantificada e foram dissolvidos em água do Reservatório de Barra Bonita filtrada em filtros de microfibras de vidro (Sartorius GMF 3 – 1,2µm de porosidade), previamente autoclavada a 120°C por 30 minutos e com pH acertado para aproximadamente 6,8. A solução foi deixada 12 a 15 horas em agitador magnético (Corning PC 420) para a completa dissolução do exopolissacarídeo. A concentração de carbono orgânico total na água do Reservatório de Barra Bonita, na época em que foi coletada para este experimento, era de 8,29mgC L⁻¹ (Antônio, comunicação pessoal). A solução alimentar foi trocada diariamente durante os experimentos.

Seston

O seston, tratamento experimental que representa condições alimentares próximas àquelas do ambiente natural, foi obtido a partir da filtração de água do Reservatório de Barra Bonita em rede de 68µm de abertura de malha. Durante o experimento, foram feitas coletas no ambiente a cada 4 dias e a água foi mantida em laboratório em aquários (20L) com aeração constante, sob temperatura de 22°C ± 1 e fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro. Foram quantificados o carbono total, carbono orgânico total e carbono inorgânico da água de Barra Bonita no dia da coleta e após os 4 dias em que foram mantidas no laboratório, a fim de se verificar se, nesse período, houve mudança quantitativa no seston fornecido como alimento aos animais durante os experimentos. A água dos cultivos foi trocada com uma frequência maior (a cada 12 horas) em relação aos outros tratamentos alimentares (a cada 24 horas), de forma a aproximar as condições experimentais ao que se encontra no ambiente natural.

Suspensão de células de Scenedesmus bijugus

As algas foram cultivadas em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) em sala aclimatada a 22°C ± 1, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro. As algas fornecidas como alimento aos animais estavam em fase de crescimento exponencial. Para a preparação do meio experimental, a cultura algal era centrifugada a 1500rpm por 20 minutos (centrífuga FANEM Excelsa II modelo 206 MP). O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspensionado em água reconstituída (U.S. EPA, 1991). Esse procedimento foi realizado para evitar eventuais efeitos tóxicos do meio de cultura algal sobre os animais. A

suspensão concentrada de *S. bijugus* era diluída a 10^5 céls mL⁻¹ (0,80mgC L⁻¹) – concentração de células amplamente utilizada em cultivos de cladóceros em laboratório – em água do Reservatório de Barra Bonita (8,29mgC L⁻¹ – António, comunicação pessoal) previamente filtrada em filtros de microfibras de vidro com porosidade de 1,2µm (Sartorius GMF 3), autoclavada a 120°C por 30 minutos e com pH acertado para aproximadamente 6,8. O meio experimental foi trocado diariamente durante os experimentos. A cada 12 horas, o alimento foi ressuspensionado delicadamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Resultados

A concentração de carbono orgânico total da água do Reservatório de Barra Bonita praticamente não variou durante o experimento em que se utilizou o seston como alimento, em média, $4,77 \pm 0,28$ mgC L⁻¹. A variação da concentração de carbono entre a água recém-coletada e após a manutenção no laboratório não foi significativa, não tendo havido, portanto, alterações quantitativas importantes nas condições alimentares durante o experimento.

As médias, desvio padrão e coeficientes de variação (%) dos parâmetros analisados da história de vida de *C. cornuta* alimentadas com exopolissacarídeo de *A. spiroides*, *Scenedesmus bijugus* e seston do reservatório de Barra Bonita são apresentados na Tabela I.

A figura 1 apresenta o comprimento em função da idade dos animais durante o experimento. A partir desta figura observa-se que os animais apresentaram maior taxa de crescimento nas fases iniciais da vida, e, na medida em que os organismos vão se tornando mais velhos, a taxa de crescimento corporal diminui.

As figuras 2 e 3 apresentam a média do número de ovos produzidos acumulado por indivíduo e a média do número de neonatas produzidas acumulado por indivíduo, em função da idade, para animais alimentados com os três tipos de alimento.

Fica claro nestas figuras o sucesso na produção de ovos e neonatas para os animais tratados com exopolissacarídeo. Os resultados demonstram que os animais se alimentaram do exopolissacarídeo, apresentando crescimento somático e capacidade de produção de descendentes viáveis em valores superior aos encontrados para os outros dois tratamentos alimentares. Esses aspectos revelam a capacidade deste tipo de alimento de sustentar uma população de *C. cornuta*.

Discussão

A qualidade do alimento disponível figura entre os mais importantes fatores ambientais que controlam o crescimento e a reprodução de espécies zooplancônicas (Vijverberg, 1989), e, portanto, a viabilidade de populações destes organismos. Cladóceros possuem a habilidade de filtrar alimento de diversos tamanhos, de bactérias a grandes algas, o que os coloca em contato com um largo espectro de recursos de qualidade variável. Sendo a capacidade de seleção do alimento limitada, a quantidade e a qualidade deste alimento parece ser um importante fator de influência em parâmetros bionômicos de populações de cladóceros (Abrantes & Gonçalves, 2003). Gulati & DeMott (1997) resumem em quatro fatores não exclusivos os mecanismos pelos quais o alimento afeta seus consumidores: I) tamanho e forma das partículas, seletividade ao alimento, inibição da alimentação e taxas de ingestão; II) defesas morfológicas contra a digestão; III) inadequação nutricional (P, N e ácidos graxos); IV) presença de toxinas.

As médias do número total de ovos e neonatas produzidos por indivíduo e a fecundidade média observadas nos animais tratados com exopolissacarídeo de *A. spiroides* são superiores quando comparadas aos dados desses parâmetros registrados para *C. cornuta* alimentadas com seston do Reservatório de Barra Bonita (aproximadamente 30 ovos e neonatas por fêmea) a clorofíceia *Scenedesmus bijugus* à concentração de 10^5 células mL⁻¹ (aproximadamente 25 ovos e neonatas por fêmea). Em comparação com a literatura existente, as taxas reprodutivas apresentadas por *C. cornuta* alimentada com exopolissacarídeo de *A. spiroides* sugerem que o exudato é um alimento de boa qualidade. *C. cornuta* alimentada com seston enriquecido com diversas concentrações da clorofíceia *Ankistrodesmus falcatus* e de populações naturais da cianofíceia *Mycrocistis aeruginosa* (Ferrão-filho & Azevedo, 2003) e com seston de um ambiente oligotrófico enriquecido com algas cultivadas em laboratório a 20 e 25°C (Melão, 1999) apresentaram fecundidades médias significativamente menores (variando de 2 a 4 ovos ou neonatas.fêmea⁻¹) em relação aos números observados em animais tratados com exopolissacarídeo neste trabalho (em média, $6,31 \pm 0,49$ ovos por postura). Nandini & Sarma, 2000, fornecendo diferentes concentrações de *Chlorella vulgaris* a *C. cornuta* também registrou fecundidades inferiores às registradas neste estudo. Hardy & Caraballo (1995), cultivando essa espécie *in situ* e em laboratório a 29°C e fornecendo alimento natural do Lago Calado (Amazonas – Brasil), também registraram dados de fecundidade inferiores (em laboratório – aproximadamente 2 ovos.fêmea⁻¹; *in situ* – aproximadamente 2,9 ovos.fêmea⁻¹) aos registrados para os animais alimentados com o exopolissacarídeo no presente trabalho. O crescimento populacional (r), calculado para *C. cornuta* alimentada com exopolissacarídeo de *A. spiroides* (r = 0,263), foi maior em relação aos valores de “r” encontrados para os outros dois tratamentos deste trabalho (r = 0,228 para o tratamento com seston e r = 0,217 para o tratamento com S.

bijugus). Ferrão-Filho & Azevedo (2003) e Ferrão-Filho, Azevedo & DeMott (2003) alimentando indivíduos dessa espécie com a cianofícea *Microcystis aeruginosa* não-tóxica e a clorofícea *Ankistrodesmus falcatus* também registraram taxas de crescimento populacional menores em relação às taxas registradas em animais alimentados com exopolissacarídeo no presente trabalho. De modo geral, a quantidade e qualidade dos alimentos variam positivamente com as taxas reprodutivas dos organismos zooplanctônicos (Gilyarov, 1982; Orcutt & Porter, 1984; Infante & Litt, 1985; Arnold, 1971; Stutzman, 1995; Boersma & Vijverberg, 1996; Rose, Warne & Lim, 2000; Abrantes & Gonçalves, 2003).

A idade de crustáceos na primípara e, conseqüentemente, o desenvolvimento pós-embrionário, são influenciados pela quantidade de alimento (Hrbackova-Esslova, 1963; Korinek, 1970; Weglenska, 1971 *apud* Hardy & Duncan, 1994; Grygierek, 1971 *apud* Bottrell, 1975) e muitos autores têm mostrado que, em altas concentrações de alimento, cladóceros levam um menor tempo para atingir a maturidade (Hardy & Duncan, 1994; Lynch, 1989; Orcutt & Porter, 1984; Rose *et al.*, 2000). Aqui se utiliza o termo “maturidade” em referência ao início da produção de ovos pelo animal, muito embora dafnídeos possam estar fisiologicamente maduros e não depositarem ovos, em casos, por exemplo, de limitação de alimento (Stibor & Lampert, 1993). Os valores de idade da primípara demonstram que os animais tratados com o exopolissacarídeo, neste estudo, atingiram a maturidade mais cedo comparando-se com os valores obtidos dos animais alimentados com a suspensão de *S. bijugus*, mas não em relação aos animais tratados com seston do Reservatório de Barra Bonita. Isso indica que o exopolissacarídeo foi um alimento de alta qualidade, possibilitando que animais saudáveis logo investissem energia na reprodução, muito embora a diversidade alimentar do seston (algas, bactérias, detritos,

compostos orgânicos dissolvidos, inclusive exopolissacarídeos algais) possa ter proporcionado um desempenho ainda maior desses animais sob esse aspecto. Em comparação com a literatura, a idade da primípara dos animais alimentados com exopolissacarídeo no presente estudo foi menor em relação ao encontrado por Ferrão-Filho & Azevedo (2003) (em torno de 4 dias), mas demonstram pouca variação em relação aos dados de Melão (1999) (3,83 dias). Hardy & Caraballo (1995) registraram valores menores de tempo de desenvolvimento pós-embrionário (2,5 dias), mas deve-se levar em consideração que o autor cultivou os animais a 29°C e que, com o aumento na temperatura, ocorre uma diminuição no tempo necessário para cladóceros planctônicos atingirem a maturidade (Hardy & Duncan, 1994; Orcutt & Porter, 1984; Bottrell, 1975).

Os resultados relacionados ao crescimento somático de *C. cornuta* também sugerem que exopolissacarídeo de *A. spiroides* seja um alimento de boa qualidade. Em trabalhos com dafnídeos foi verificado que indivíduos sob limitação qualitativa e quantitativa de alimento apresentam comprimento ou massa somática reduzida em relação a indivíduos tratados com alimentos de maior qualidade ou com maior quantidade de alimento disponível (Abrantes & Gonçalves, 2003; Lynch, 1989; Taylor, 1985). Isso acontece possivelmente devido ao processo de rejeição dos alimentos filtrados pelo zooplâncton. Esse processo requer gasto de energia para movimentar o pós-abdômem e expulsar a partícula de alimento, (Gliwicz & Siedlar, 1980), levando a uma brusca diminuição nas taxas de filtração e a um consumo inadequado do alimento (Gilyarov, 1982). No presente trabalho, os organismos alimentados com exopolissacarídeo de *A. spiroides* apresentaram comprimentos lineares, na primípara e após 15 dias, superiores (0,472mm e 0,631mm) comparando-se com os animais tratados com seston (0,422mm e 0,504mm) e *S. bijugus* (0,421mm e 0,559mm). *C. cornuta* cultivada por Hardy & Caraballo (1995) também

apresentaram comprimento na primípara e comprimento máximo inferiores (0,428mm e 0,598mm) ao dos animais tratados com exopolissacarídeo no presente trabalho. O comprimento da primípara também foi maior nos animais deste estudo comparado ao valor médio encontrado por Michael (0,43mm) *apud* Bottrell (1975). Muitos estudos com várias espécies de *Daphnia* apontam que o comprimento da primípara é diminuído com limitação de alimento (Lynch, 1989; Fechen, 1970 *apud* Gilyarov 1982; Abrantes & Gonçalves, 2003).

É esperado que cladóceros com deficiência nutricional apresentem crescimento lento e baixas taxas reprodutivas comparados a cladóceros bem alimentados. (Beerstecher, 1952). Devido ao fato de exopolissacarídeos algais constituírem-se basicamente de carbono, não era esperado que os animais do presente estudo demonstrassem tal proficuidade reprodutiva e de crescimento somático, devido principalmente à escassez de nitrogênio na composição do alimento fornecido (1,83% do peso seco de exopolissacarídeo de *A.spiroides*). No entanto, o meio de cultura era composto por água do Reservatório de Barra Bonita filtrada e autoclavada. Esse tratamento elimina organismos vivos, mas ainda mantém certa quantidade de nutrientes dissolvidos (carbono e nitrogênio, por exemplo) que disponibilizar-se-iam através do crescimento de bactérias, uma vez que as condições do experimento não eram axênicas.

Os resultados deste estudo demonstram que *Ceriodaphnia cornuta* alimentada com exopolissacarídeo de *Anabaena spiroides* apresenta um expressivo sucesso reprodutivo e crescimento somático acentuado, o que revela que este alimento supre as necessidades nutricionais mínimas para sustentar uma população desta espécie. Assim, no ambiente natural, esses compostos provavelmente desempenham um importante papel ecológico,

constituindo uma potencial fonte complementar de energia para as populações de cladóceros, especialmente na ocorrência de florações de *A. spiroides*.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processos número 99/07766-0, 2002/04275-0 e 2002/11582-6) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão a Rodrigo Brasil Choueri.

Referências Bibliográficas

Abrantes N.; Gonçalves F. (2003) The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory, *Acta Oecologica*, **24**, S245-S249.

Arnold D.E. (1971) Ingestion, assimilation, survival, and reproduction by *Daphnia pulex* fed seven species of blue-green algae, *Limnology and Oceanography*, **16**, 906-920.

Beerstecher E. (1952) The nutrition of crustacea, *Vitamins and Hormones*, 69-77.

Bjørnsen P.K. (1988) Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it?, *Limnology and Oceanography*, **33**, 151-154.

Boersma M.; Vijverberg J. (1996) Food effects on life history traits and seasonal dynamics of *Ceriodaphnia pulchella*, *Freshwater Biology*, **35**, 25-34.

Bottrell H.H. (1975) Generation time, length of life, instar duration and frequency of moulting, and their relationship to temperature in eight species of Cladocera from the River Thames, reading, *Oecologia*, **19**, 129-140.

Di Giulio R.T.; Benson W.H.; Sanders B.M.; Van Veld P.A. (2003) Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment, Second Edition* (ed. by G.M. Rand), pp. 523-560, Taylor & Francis Group, London and New York.

Ferrão-Filho A. S.; Azevedo S.M.F.O. (2003) Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory cultures and natural populations on tropical cladocerans, *Aquatic Ecology*, **37**, 23-35.

Ferrão-Filho A. S.; Azevedo S.M.F.O.; DeMott W.R. (2000) Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans, *Freshwater Biology*, **45**, 1-19.

Fogg G.E. (1983) The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis, *Botanica Marina*, **26**, 3-14.

Gilyarov A.M. (1982) Factors regulating the numbers in populations of fresh-water planktic crustaceans, *Hydrobiological Journal*, **18**.

Gliwicz Z.M.; Siedlar E. (1980) Food size limitation and algae interfering with food collection in *Daphnia*, *Archiv für Hydrobiologie*, **88**, 155-177.

Gorbi G.; Corradi M.G.; Invidia M.; Rivara L.; Bassi M. (2001) Is Cr(VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction, *Water Research*, **36**, 1917-1926.

Gorham P.R.; McLanchlan J.; Hammer U.T.; Kim W.K. (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae*, *Verhandlungen Internationales Vereinigung für Limnologie*, **15**, 769-780.

Guillard R.R.L.; Lorenzen C.J. (1972) Yellow-green algae with chlorophyllid-c, *Journal of Phycology*, **8**, 10-14.

Gulati R.D.; Demott W.R. (1997) The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-the-art, perspectives and priorities, *Freshwater Biology*, **38**, 753-768.

Hardy E.R.; Caraballo P. (1995) Fluctuation diaria de las poblaciones de *Daphnia gessneri* HERBST y *Ceriodaphnia cornuta* SARS (Crustacea-Cladocera) en el lago Calado. *Boletín Científico. Santa Fé de Bogotá*, 379-396.

Hardy E.R.; Duncan A. (1994) Food concentrations and temperature effects on life cycle characteristics of tropical cladocera *Daphnia gessneri* HERBST, *Diaphanosoma sarsi* RICHARD, *Moina reticulata* DADAY. I. Development time, *Acta Amazónica*, **24**, 119-134.

Hellebust J.A. (1974) Extracellular products. *Algal Physiology and Biochemistry* (ed. by W.D.P. Stewart), pp. 838-863, Blackwell, Oxford.

Hrbáková-Esslova, M. (1963) The development of three species of *Daphnia* in the surface water of the Slapy Reservoir, *Hydrobiologia*, **48**, 325-333.

Infante A.; Litt A.H. (1985) Differences between two species of *Daphnia* in the use of 10 species of algae in Lake Washington, *Limnology and Oceanography*, **30**, 1053-1059.

Korinek V. (1970) The embryonic and post-embryonic development of *Daphnia hyalina* from Lake Maggiore, *Memorie dell' Instituto Italiano di Idrobiologia*, **26**, 85-95.

Ling S.C.; Alldredge A.L. (2003) Does marine copepod *Calanus pacificus* consume transparent exopolymer particles (TEP)?, *Journal of Plankton Research*, **25**, 507-515.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (1998a) Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae), *Phycologia*, **37**, 34-39.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (1998b) Lead and copper toxicity to *Nephrocytium lunatum* (Chlorophyceae) and their complexation with excreted material, *Revista de Microbiologia*, **29**, 44-48.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (1999) Lead and copper-complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta), *Phycologia*, **38**, 283-288.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (2000) Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates, *Phycologia*, **39**, 118-125.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H.; Sartori L.A. (2002) Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales), *Journal of Phycology*, **38**, 332-337.

Lynch M. (1989) The life history consequences of resource depression in *Daphnia pulex*, *Ecology*, **70**, 246-256.

Malej A.; Harris R. P. (1993) Inhibition of copepod grazing by diatom exudates – a factor in the development of mucus aggregates, *Marine Ecology – Progress Series*, **96**, 33-42.

Melão M.G.G. (1999) Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras, *Perspectivas da Limnologia no Brasil – Editora União*, 45-57.

Nandini S.; Sarma S.S.S. (2000) Lifetable demography of four cladoceran species in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) density, *Hydrobiologia*, **435**, 117-126.

Orcutt J.D.; Porter K.G. (1984) The synergistic effects of temperature and food concentration on life history parameters of *Daphnia*, *Oecologia*, **63**, 300-306.

Passow, U.; Alldredge, A.L. (1999) Do transparent exopolymer particles (TEP) inhibit grazing by the euphasiid *Euphasia pacifica*?, *Journal of Plankton Research*, **21**, 2203-2217.

Paulsen B. S.; Vieira A.A. H. (1994) Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta), *Journal of Phycology*, **30**, 638-641.

Prieto L.; Sommer F.; Stibor H. N.; Koeve W. (2001) Effects of planktonic copepods on transparent exopolymeric particles (TEP) abundance and size spectra, *Journal of Plankton Research*, **23**, 515-525.

Rose R.M.; Warne M.St.J.; Lim R.P. (2000) Life history responses of the cladoceran *Ceriodaphnia* cf. *dubia* to variation in food concentration, *Hydrobiologia*, **427**, 59-64.

Stibor H.; Lampert W. (1993) Estimating the size at maturity in field populations of *Daphnia* (Cladocera), *Freshwater Biology*, **30**, 433-438.

Stutzman P. (1995) Food quality of gelatinous colonial chlorophytes to the freshwater zooplankters *Daphnia pulex* and *Diaptomus oregonensis*, *Freshwater Biology*, **34**, 149-153.

Taylor B.E. (1985) Effects of food limitation on growth and reproduction of *Daphnia*, *Archiv für Hydrobiologie*, **88**, 155-177.

Vijverberg J. (1989) Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review, *Freshwater Biology*, **21**, 317-373.

Wetzel R.G. (1983) Structure and productivity of aquatic ecosystems. *Limnology, Second edition*, pp. 134-156, Saunders College Publishing.

Wood A.M.; Van Valen L.M. (1990) Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton, *Marine Microbial Food Webs*, **4**, 103-116.

Tabela I: Médias, desvios padrão e coeficientes de variação (%) dos parâmetros da história de vida de *C. cornuta* alimentadas com exopolissacarídeo de *A. spiroides*, suspensão de células de *S.bijugus* e seston do reservatório de Barra Bonita.

	Seston			<i>S. bijugus</i>			Polissacarídeo		
	Média	Desv.Pad.	C.V. (%)	Média	Desv.Pad.	C.V. (%)	Média	Desv.Pad.	C.V. (%)
Idade na primípara (dias)	2.55	0.90	35.14	5.75	1.38	24.03	3.63	0.29	8.05
Comprimento na primípara (mm)	0.422	0.022	5.20	0.421	0.017	3.93	0.472	0.020	4.24
Fecundidade média	3.81	0.37	9.81	3.85	0.86	22.48	6.31	0.49	7.71
N total de ovos / fêmea	30.90	7.25	23.46	25.08	7.97	31.78	51.00	4.59	9.00
N total de neonatas / fêmea	29.80	6.89	23.13	24.75	8.06	32.56	50.50	4.38	8.67
Eclosão (%)	96.31	4.70	4.88	97.55	6.56	6.73	98.59	2.16	2.19
Tempo de desenvolvimento embrionário (dias)	1.13	0.10	9.04	1.48	0.10	6.42	1.36	0.06	4.20
Intervalo de produção de ovos (dias)	1.21	0.14	11.89	1.51	0.07	4.84	1.40	0.04	2.80
Comprimento máximo (mm)	0.504	0.017	3.37	0.559	0.035	6.31	0.631	0.016	2.49
Crescimento populacional ("r")		0.228			0.217			0.263	

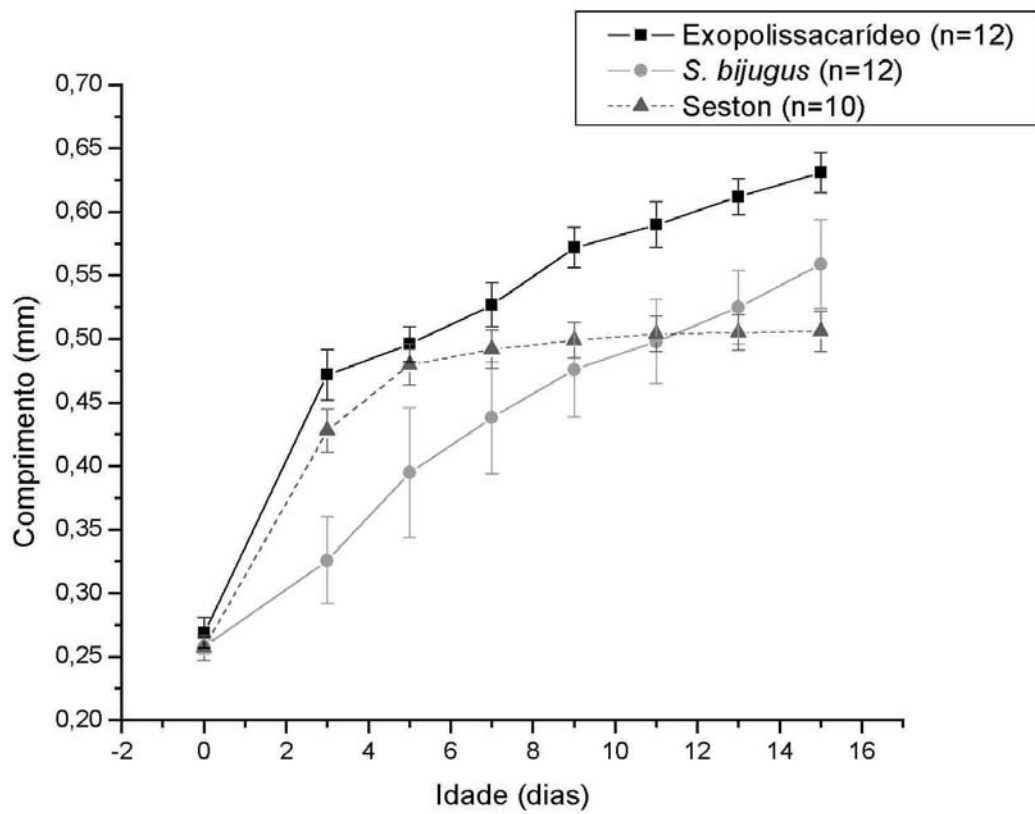


Figura 1: Comprimento (mm) em função da idade (dias) de *C. cornuta* alimentadas com exopolissacarídeo de *A. spiroides*, suspensão de células de *S.bijugus* e seston do reservatório de Barra Bonita; as barras de erro representam o desvio padrão.

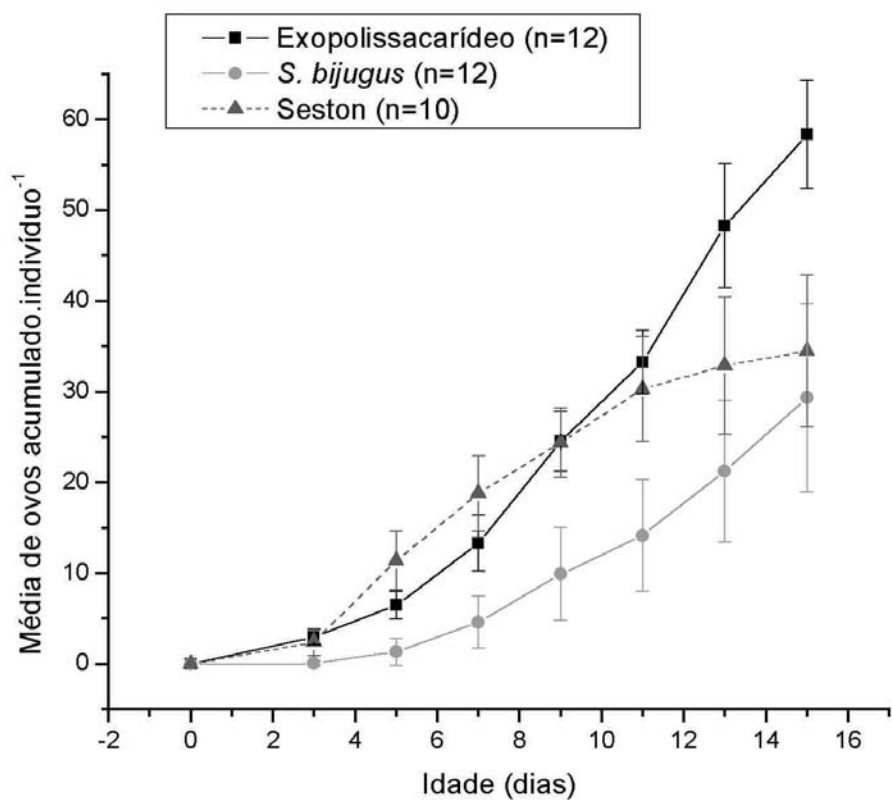


Figura 2: Número médio acumulado de ovos produzidos por fêmea em função da idade (dias) para *C. cornuta* alimentada com exopolissacarídeo de *A. spiroides*, suspensão de células de *S. bijugus* e seston do reservatório de Barra Bonita; as barras de erro representam o desvio padrão.

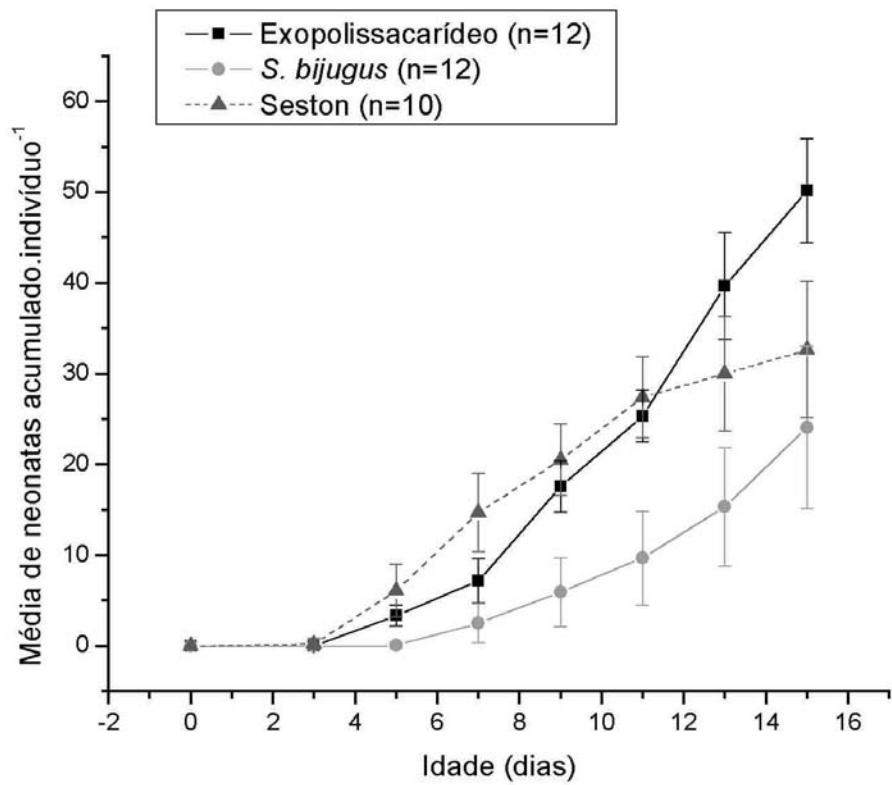


Figura 3: Número médio acumulado de neonatas produzidas por fêmea em função da idade (dias) para *C. cornuta* alimentada com exopolissacarídeo de *A. spiroides*, *Scenedesmus bijugus* e seston do reservatório de Barra Bonita; as barras de erro representam o desvio padrão.

Influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* KLEBAHN na toxicidade e captura do cobre por *Ceriodaphnia cornuta* SARS.

Rodrigo Brasil Choueri^{1,2}; Maria da Graça Gama Melão²; Ana Teresa Lombardi³; Armando Augusto Henrique Vieira⁴

¹Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

²Laboratório de Plâncton, Departamento de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

³Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná-PR, Brasil.

⁴Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil.

Correspondência: Maria da Graça Gama Melão, Lab. de Plâncton, Dep. de Hidrobiologia, Universidade Federal de São Carlos – Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905 São Carlos-SP, Brasil. E-mail: dmgm@power.ufscar.br

Título abreviado: Exopolissacarídeo de *Anabaena spiroides* – toxicidade e captura de cobre por *Ceriodaphnia cornuta*

Palavras-chave: Exopolissacarídeos algais; *Ceriodaphnia cornuta*; Toxicidade; Regulação de cobre;

Resumo

1. Foi investigada a toxicidade aguda e a captura do cobre por *Ceriodaphnia cornuta* SARS na presença e ausência de exopolissacarídeos de *Anabaena Spiroides* KLEBAHN.
2. Grupos de 30 indivíduos adultos foram expostos a uma amplitude de concentração de cobre (de 10^{-8} a 10^{-6} M) por um período de 24h. A EC_{50} , estimada pelo método “Trimmed Spearman-Kärber”, foi aumentada em aproximadamente 4 vezes (de $8,1 \times 10^{-8}$ M para $3,2 \times 10^{-7}$ M) na presença de 30mg L^{-1} do exopolissacarídeo.
3. A concentração de cobre nos organismos, determinado em polarógrafo através da técnica DPASV, apresentou pequena variação entre as diferentes concentrações e entre os diferentes tratamentos, o que sugere que os organismos foram capazes de regular o conteúdo de cobre no corpo.

Introdução

É crescente a preocupação de autoridades, sociedade civil e comunidade científica com a contaminação dos recursos hídricos por metais pesados. Estes elementos são difíceis de serem eliminados dos ecossistemas e podem ser bioconcentrados na cadeia trófica, podendo resultar em intoxicação dos seres que habitam o ambiente contaminado.

Os efeitos tóxicos de um metal, geralmente resultado da ligação de íons metálicos a macromoléculas biologicamente importantes, alterando suas funções (Di Giulio *et al.*, 2003), depende da forma como ele se apresenta no meio. Isso é controlado por processos físico-químicos tais como precipitação, adsorção, complexação a elementos inorgânicos e à matéria orgânica. Desses processos, a complexação de metais pesados pela matéria orgânica vem sendo

largamente investigada e tem-se verificado que a formação deste tipo de complexo reduz a toxicidade de metais pesados em organismos aquáticos (Giesy, Leversee & Williams, 1977; Lores & Pennock, 1999; Kim *et al.*, 2001; McGeer *et al.* 2002) e especificamente no fitoplâncton (Sunda & Lewis, 1978; Moffett & Brand, 1996; Corradi *et al.*, 1998; Gorbi *et al.*, 2001), resultado da diminuição da concentração da forma iônica desses metais (Sunda & Guillard, 1976; Giesy *et al.*, 1977; Anderson & Morel, 1978; Sunda & Lewis, 1978; Sunda & Huntsman, 1998).

Em ambientes dulcícolas, os carboidratos excretados por microalgas constituem-se principalmente por polissacarídeos (Mykkestad, 1995) e podem contribuir com até 30% do carbono orgânico dissolvido, sendo parte considerável da matéria orgânica dissolvida. É bem documentada a capacidade do fitoplâncton, especialmente de cianofíceas excretarem ligantes orgânicos fortes (McNight & Morel 1979; Lombardi & Vieira, 2000), os quais agem na complexação de metais pesados (Jardim & Pearson, 1984; Corradi *et al.*, 1998; Lombardi & Vieira, 1998a; 1998b; 1999; 2000; Lombardi, Vieira & Sartori, 2002; Gonzalez-Dávila, 1995) e, desta forma, regularem a toxicidade de metais pesados no meio aquático (Sunda & Lewis, 1978; Gonzalez-Dávila, 1995; Moffett & Brand, 1996; Corradi *et al.*, 1998; Gorbi *et al.*, 2001).

Apesar de haver muitos estudos sobre a função ecológica dos exopolissacarídeos de origem algal, pouco se sabe sobre seu possível papel como veículo de entrada de metais pesados nas cadeias tróficas. As principais vias de entrada de contaminantes em animais aquáticos são a derme, brânquias e trato digestivo, em caso de o alimento estar contaminado. Choueri *et al.* (dados não publicados) demonstraram que *Ceriodaphnia cornuta* SARS pode se alimentar de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* KLEBAHN, mas não existe informação sobre a relação entre este tipo de alimento e a toxicidade e bioacumulação de metais pesados pelo zooplâncton.

O escopo deste trabalho é estudar a influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* na toxicidade e captura do cobre em *Ceriodaphnia cornuta*.

Materiais e métodos

Culturas estoque

Indivíduos de *C. cornuta* foram coletados no Reservatório de Barra Bonita (22° 32'34,5"S, 48° 29'26,4"O, São Paulo, Brasil), trazidos ao laboratório, onde foram triados, identificados, aclimatados e mantidos em água reconstituída (U.S. EPA, 1991) durante meses, em condições próximas às do ambiente natural (44mg CaCO₃.L⁻¹ de dureza e pH aproximadamente 6,8). A temperatura foi mantida em 21±1°C e o fotoperíodo regulado para 12/12 horas luz/escuro. A alimentação dos animais consistia em soluções concentradas de três espécies algais (*Scenedesmus bijugus*, *Selenastrum capricornuta*, *Chlorella vulgaris*) e a solução de levedura e ração de peixe fermentado na proporção 1:1 (Rojas, Marins & Rocha, 2001).

Preparação do material para os experimentos com metais

Todo material utilizado nos experimentos foi deixado de molho em HNO₃ 1M durante 7 dias, posteriormente enxaguado em água destilada (destilador de vidro Gehaka, modelo DG4K, versão 1.04) e, depois de seco, armazenado em sacos plásticos fechados para evitar contaminação.

Exopolissacarídeo de Anabaena spiroides

Para a extração dos exopolissacarídeos, as algas foram cultivadas em meio ASM1 (Gorham *et al*, 1964), no qual adicionou-se 500mg L⁻¹ de tampão TRIS, e mantidas em sala

aclimatada a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12/12 horas luz/escuro e aeração constante até o início da fase estacionária de crescimento. As culturas foram, então, filtradas em filtros de fibra de vidro com porosidade de $1,2\mu\text{m}$ (Sartorius GMF 3), para a retirada das células. O filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 40°C (Quimis, modelo 344B2) e posteriormente dialisado em membranas com poros de 12 a 14KD durante 24 horas em água corrente e 48 horas em água destilada para retirada dos sais e material de baixa massa molecular. Os polissacarídeos resultantes desse procedimento foram, por fim, liofilizados (liofilizador Heto DW3 - 2000) e congelados até o momento do uso.

Para a preparação do meio experimental, a massa de polissacarídeo foi quantificada e adicionada à água reconstituída (U.S. EPA, 1991) com $44\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ de dureza e pH acertado para aproximadamente 6,8. A solução foi deixada 12 a 15 horas em agitador magnético (Corning PC 420) para a completa dissolução do exopolissacarídeo.

Toxicidade aguda e captura do cobre

Para testar a influência do exopolissacarídeo de *A. spiroides* na toxicidade e captura do cobre por *C. cornuta*, foram utilizadas as concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} , 4×10^{-7} , 7×10^{-7} e 10^{-6}M de cobre (CuCl_2), mais o controle (sem adição de cobre), em meio contendo $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de polissacarídeo dissolvido e 10^{-8} , 4×10^{-8} , 7×10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6}M mais o controle para o meio experimental sem adição do exopolissacarídeo. A concentração de exopolissacarídeo foi escolhida após testes preliminares indicarem que com 30mg L^{-1} haveria diferentes respostas na porcentagem de imobilidade dos organismos nas concentrações de cobre utilizadas neste experimento. As soluções contendo metal e exopolissacarídeos foram preparadas 2 horas antes do início do período de incubação dos animais. Para cada tratamento foram feitas três réplicas.

Antes da incubação os animais foram deixados em água reconstituída sem alimento, durante pelo menos uma hora, para esvaziamento do trato digestivo. Os animais foram então separados em grupos de 30 indivíduos adultos, medidos (para posterior determinação do peso seco por meio de equação matemática previamente determinada), e incubados a 25°C por 24 horas em recipientes de policarbonato contendo 60mL de meio experimental, tampados para evitar a evaporação.

Após o tempo de incubação, os animais que apresentavam mobilidade e imobilidade foram contados para determinação da EC₅₀ através do método “Trimmed Spearman–Kärber” (Hamilton, Russo & Thurston, 1977). Para cada concentração de cobre, os indivíduos que apresentavam imobilidade foram retirados do recipiente de incubação com auxílio de pipeta de Pasteur, depositados em vidros de relógio, brevemente enxaguados com água destilada, dispostos em filtros de membrana de acetato-celulose previamente deixados de molho em HNO₃ 0,1M por 24 horas e encaminhados à estufa de secagem a 60°C. Os animais que apresentavam mobilidade foram retirados do recipiente de incubação utilizando-se peneiras de 6cm de diâmetro e 68µm de abertura de malha previamente deixadas de molho por 7 dias em HNO₃ 0,1M. Os indivíduos foram em seguida enxaguados brevemente em água destilada, deixados em estufa a 60°C durante 3 minutos para que fossem mortos e submersos por 2 minutos em solução de 0,02M de EDTA (Ma *et al.*, 2003) para extração do cobre adsorvido na carapaça. Estes animais, após serem levemente enxaguados em água destilada para retirada do excesso de EDTA, foram depositados sobre filtros de acetato-celulose previamente deixados de molho em HNO₃ 0,1M por 24 horas, e, em seguida, encaminhados à estufa a 60°C. Depois de secos na estufa, os animais foram e colocados em recipientes de Teflon com tampa, previamente deixados de molho em HNO₃ 6M por 7 dias, onde foram adicionados 200µL de HNO₃ ultra-puro (J.T.Baker) e encaminhados à estufa a 90°C por 48 horas, para digestão das

amostras. O conteúdo de cobre total foi determinado através de polarografia de pulso diferencial utilizando-se um polarógrafo PAR- EG&G, modelo 303A SMDE. Para tanto foi utilizada a técnica de adição de padrão.

Resultados

A figura 1 apresenta o gráfico de porcentagem de mobilidade dos animais nas diversas concentrações de cobre às quais eles foram submetidos, com e sem a presença de exopolissacarídeo de *A. spiroides*.

A porcentagem de mobilidade de *C. cornuta* foi significativamente alterada com a adição de 30mg.L⁻¹ de exopolissacarídeo de *A. spiroides*. Com a presença do exudato a porcentagem de mobilidade dos organismos foi superior em todas as concentrações, com exceção do tratamento com concentração de 10⁻⁶M de cobre, em que todos os animais apresentaram imobilidade nos tratamentos com e sem a adição de exopolissacarídeo. A concentração de cobre que causou efeito de imobilidade para 50% dos organismos (EC 50) foi aproximadamente 4 vezes superior no tratamento com polissacarídeo ($3,25 \times 10^{-7} \pm 5,30 \times 10^{-8}$ M) em relação ao tratamento sem polissacarídeo ($8,11 \times 10^{-8} \pm 9,80 \times 10^{-9}$ M).

As figuras 2a e 2b apresentam os resultados de concentração de cobre nos animais ($\eta\text{gCu} \cdot \mu\text{gPS}^{-1}$) que apresentavam mobilidade após as 24 horas de duração do experimento, nas diferentes concentrações às quais os animais foram expostos, para os tratamentos sem e com a adição de 30mg.L⁻¹ de exopolissacarídeo. A concentração de cobre no corpo que causa imobilidade nos organismos (representada pela barra mais escura nos gráficos 2a e 2b) foi obtida a partir de 30 animais imóveis.

Os resultados de concentração de cobre nos animais são referentes ao cobre absorvido, uma vez que o cobre adsorvido foi extraído com a imersão dos animais em solução de EDTA.

Observa-se nas figuras que a concentração de metal absorvido pelos animais não variou positivamente com as concentrações de metais às quais esses organismos foram expostos. As concentrações de cobre presentes nos animais em todas as concentrações, para os dois tratamentos, são bastante similares, não havendo diferenças marcantes.

Discussão

É bem documentada na literatura a diminuição da toxicidade de metais para organismos aquáticos com o aumento da matéria orgânica dissolvida (Giesy, Jr., Liversay & Williams, 1977; Meador, 1991; Lores & Pennock, 1999; Kim *et al.*, 2001; McGeer *et al.* 2002). Isso se deve à complexação do contaminante à matéria orgânica, resultando em uma diminuição da concentração de íons livres no meio e conseqüente diminuição da captura do metal pelas células (Di Giulio *et al.*, 2003). Os resultados deste trabalho mostraram que, com a adição de 30mg.L⁻¹ de exopolissacarídeos de *A. spiroides*, houve um aumento de aproximadamente 4 vezes da EC₅₀ do cobre para *C. cornuta*, ou seja, uma significativa redução da toxicidade do metal para o organismo.

As principais rotas de entrada de metais para invertebrados aquáticos são a captura do metal em solução e através de alimento contaminado (Rainbow & Dallinger, 1993). Os metais em solução podem entrar nos invertebrados aquáticos ou por difusão facilitada, quando se ligam passivamente a proteínas de transporte nas membranas de superfícies permeáveis dos organismos, ou via incorporação no transporte ativo disponível para metais essenciais, como Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺, quando o metal não possui afinidade com ligantes orgânicos (Rainbow & Dallinger, 1993). Os metais em solução também são adsorvidos à carapaça dos invertebrados aquáticos, mas desta forma não ficam disponíveis ao metabolismo do animal (Rainbow & Dallinger, 1993) além de ficarem menos biodisponibilizados para predadores do que os metais

em tecidos internos (Reinfelder and Fisher, 1994). No presente trabalho a parcela do metal que estava adsorvida à carapaça dos animais foi extraída através de solução quelante.

A captura de partículas alimentares em cladóceros é feita através da criação de uma corrente hídrica que passa da parte anterior para a posterior do organismo e as partículas são coletadas através de cerdas filtrantes dispostas em certos apêndices do tronco adaptados para esse fim; as partículas coletadas são encaminhadas ao sulco alimentar e então ingeridas (Ruppert & Barnes, 1996). É possível que o metal complexado ao alimento se torne livre no trato intestinal devido à sua natureza ácida, podendo ser assimilado ou excretado junto às fezes. Os resultados obtidos de concentração de metal absorvido pelos organismos demonstram que a quantidade de cobre nos animais não variou positivamente com a concentração de cobre às quais os organismos foram submetidos, sendo observado inclusive que, em alguns casos, animais expostos a concentrações maiores de metal no meio apresentaram concentrações menores de metal acumulado. Isso sugere que os organismos deste estudo possam regular o conteúdo de cobre no corpo. É suposto que o cobre, um metal essencial, possa ser regulado em organismos aquáticos (Luoma, 1983) e trabalhos anteriores já demonstraram essa estratégia em diferentes organismos. Blasco, Arias & Sáenz (2002) verificaram que a concentração de cobre e zinco no corpo *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda) coletados em diferentes pontos do Golfo de Cádiz, Espanha, não variava significativamente e sugeriu que isso está relacionado à regulação desses metais para os organismos estudados. Timmermans (1993) também verificou pequena variação da concentração de cobre em organismos bentônicos de diversos rios e lagos europeus com diferentes graus de poluição. White & Rainbow (1982) também verificaram que a concentração de cobre em *Palaemon elegans* coletados em diferentes pontos da Inglaterra foi relativamente constante, sugerindo que estes decápodos são capazes de regular a concentração de cobre no corpo. Em experimentos de laboratório também foi verificada a regulação da

concentração de cobre no corpo por parte de *P. elegans* (Rainbow & White, 1989). Borgmann *et al.* (1993) verificaram que o anfípodo *Hyaella azteca* é capaz de regular o conteúdo de cobre no corpo por longos períodos (10 semanas).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a presença de 30mg.L⁻¹ de exopolissacarídeo de *A. spiroides* diminuiu em aproximadamente 4 vezes a toxicidade aguda do cobre para *C. cornuta*. Além disso, a pequena variação da quantidade de cobre presente nos organismos entre as diferentes concentrações e entre os dois tratamentos sugere que os animais deste estudo foram capazes de regular o conteúdo de cobre no corpo.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processos número 99/07766-0 e 2002/04275-0) e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Referências bibliográficas

Anderson D.M.; Morel F.M.M. (1978) Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*, *Limnology and Oceanography*, **23**, 283-295

Blasco J.; Arias A.M.; Sáenz V. (2002) Heavy metal concentrations in *Squilla mantis* (L.) (Crustacea, Stomatopoda) from the Gulf of Cádiz: Evaluation of the impact of the Aznalcollar mining spill, *Environment International*, **28**, 111 –116

Borgmann, U., Norwood, W.P., Clarke, C. (1993) Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. *Hydrobiologia*, **259**, 79-89.

Corradi M.G.; Gorbi G.; Morsi Abd-El-Monem H.; Torelli A.; Bassi M. (1998) Exudates from the wild type and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* influence differently Cr(VI) toxicity to algae, *Chemosphere*, **37**, 3019-3025.

Di Giulio R.T.; Benson W.H.; Sanders B.M.; Van Veld P.A. (2003) Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment, Second Edition* (ed. by G.M. Rand), pp. 523-560, Taylor & Francis Group, London and New York.

Giesy, Jr. J.P.; Liversidge G.J.; Williams D.R. (1977) Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae), *Water Research*, **11**, 1013-1020.

González-Dávila M. (1995) The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater, *Marine Chemistry*, **48**, 215-236.

Gorbi G.; Corradi M.G.; Invidia M.; Rivara L.; Bassi M. (2001) Is Cr(VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction, *Water Research*, **36**, 1917-1926.

Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; & Thurston, R.V. (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays, *Environmental Science and Technology*, **11**, 714-719; Correction (1978), **12**, 417.

Jardim W.F.; Pearson H.W. (1984) A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria, *Water Research*, **18**, 985-989.

Kim S.D.; Gu M.B.; Allen H.E.; Cha D.K. (2001) Physicochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* to copper, *Environmental Monitoring and Assessment*, **70**, 105-116.

Ling S.C.; Alldredge A.L. (2003) Does marine copepod *Calanus pacificus* consume transparent exopolymer particles (TEP)?, *Journal of Plankton Research*, **25**, 507-515.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (1998) Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae), *Phycologia*, **37**, 34-39.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (1998) Lead and copper toxicity to *Nephrocytium lunatum* (Chlorophyceae) and their complexation with excreted material, *Revista de Microbiologia*, **29**, 44-48.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (1999) Lead and copper-complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta), *Phycologia*, **38**, 283-288.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H. (2000) Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates, *Phycologia*, **39**, 118-125.

Lombardi A.T.; Vieira A.A. H.; Sartori L.A. (2002) Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales), *Journal of Phycology*, **38**, 332-337.

Lores E.M.; Pennock J.R. (1999) Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton, *Marine Ecology Progress Series*, **187**, 67-75.

Lores, E.M.; Snyder, R.A.; & Pennock, J.R. (1999) The effect of humic acid on uptake / adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. *Chemosphere*, **38**, 293-310.

Luoma S.N. (1983) Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – a review, *Science of Total Environment*, **28**, 1-22.

Ma M.; Zhu W.; Wang Z.; Witkamp G.J. (2003) Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid, *Aquatic Toxicology*, **63**, 221-228.

McGeer J.C.; Szebedinszky C.; McDonald D.G.; Wood C.M. (2002) The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during

chronic waterborne exposure, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **133**, 147-160.

McKnight D.M.; Morel F.M.M. (1979) Release of weak and strong copper-complexing agents by algae, *Limnology and Oceanography*, **24**, 823-837.

Meador J.P. (1991) The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper toxicity, *Aquatic Toxicology*, **19**, 13-32.

Mofett J.W.; Brand L.E. (1996) Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress, *Limnology and Oceanography*, **41**, 388-395.

Myklestad S.M. (1995) Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides, *Science of Total Environment*, **165**, 155-164.

Passow, U. & Alldredge, A.L. (1999) Do transparent exopolymer particles (TEP) inhibit grazing by the euphasiid *Euphasia pacifica*?, *Journal of Plankton Research*, **21**, 2203-2217.

Rainbow P.S.; Dallinger R. (1993) Metal uptake, regulation, and excretion in freshwater invertebrates. *Ecotoxicology of metals in invertebrates* (ed. by Dallinger R.; Rainbow P.S.), pp. 134 – 145, Lewis Publisher, Boca Raton.

Rainbow P.S.; White S.L. (1989) Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle, *Hydrobiologia*, **174**, 245-262.

Reinfelder J.R.; Fisher N.S. (1994) Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey, *Limnology and Oceanography*, **39**, 1783-1789.

Rojas N.E.T.; Marins M.A.; Rocha, O. (2001) The effect of abiotic factors on the hatching of *Moina micrura* KURZ, 1874 (Crustacea, Cladocera) ephippial eggs, *Brazilian Journal of Biology*, **61**, 371-376,.

Ruppert E.E.; Barnes R.D. (1996) Zoologia dos Invertebrados, Sexta edição, pp. 659-759, Editora Roca, São Paulo.

Sunda W.G.; Guillard R.R. (1976) Relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton, *Journal of Marine Research*, **34**, 511-529.

Sunda W.G.; Huntsman S.A. (1998) Process regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems, *Science of Total Environment*, **219**, 165-181.

Sunda W.G.; Lewis J.A.M. (1978) Effect of complexation by natural organic-ligands on toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*, *Limnology and Oceanography*, **23**, 870-876.

Timmermans K.R. Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates (1993). *Ecotoxicology of metals in invertebrates* (ed. by Dallinger R.; Rainbow P.S.), pp. 134-145, Lewis Publisher, USA.

U.S. Environmental Protection Agency (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed. Edited by C.I. Weber. EPA-600/4-90/027

White S.L.; Rainbow P.S. (1982) Regulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*, *Marine Ecology Progress Series*, **8**, 95-101.

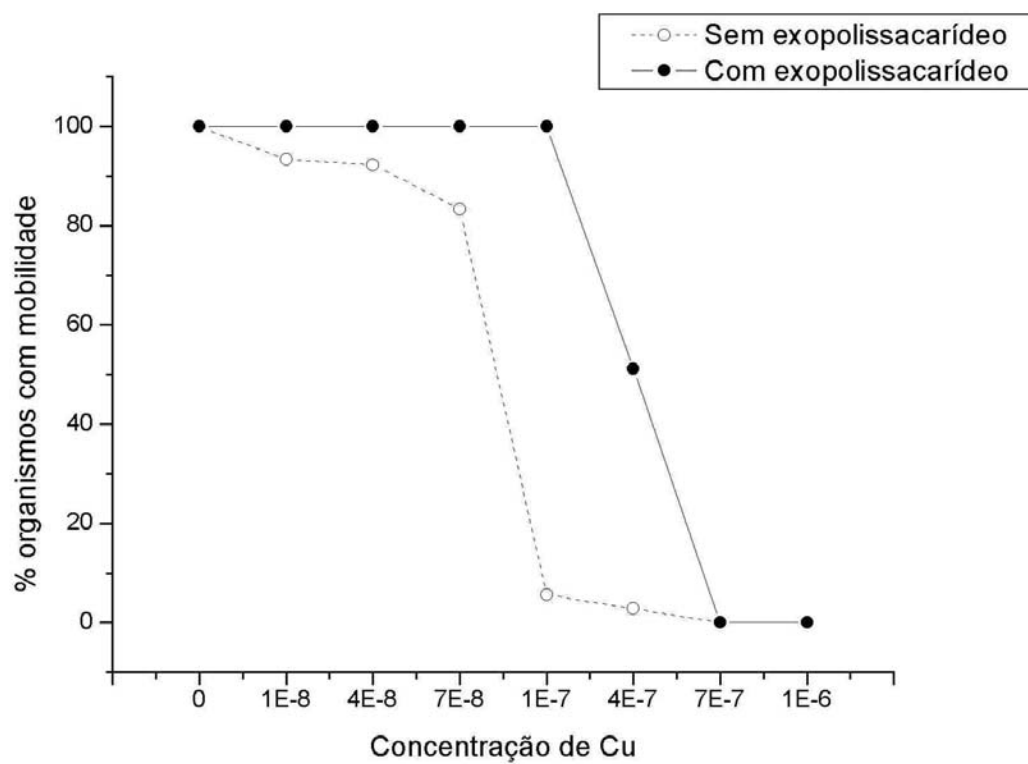


Figura 1: Porcentagem de mobilidade de *C. cornuta* em diversas concentrações de cobre (M), com e sem a adição de 30mg.L⁻¹ de exopolissacarídeo de *A. spiroides*.

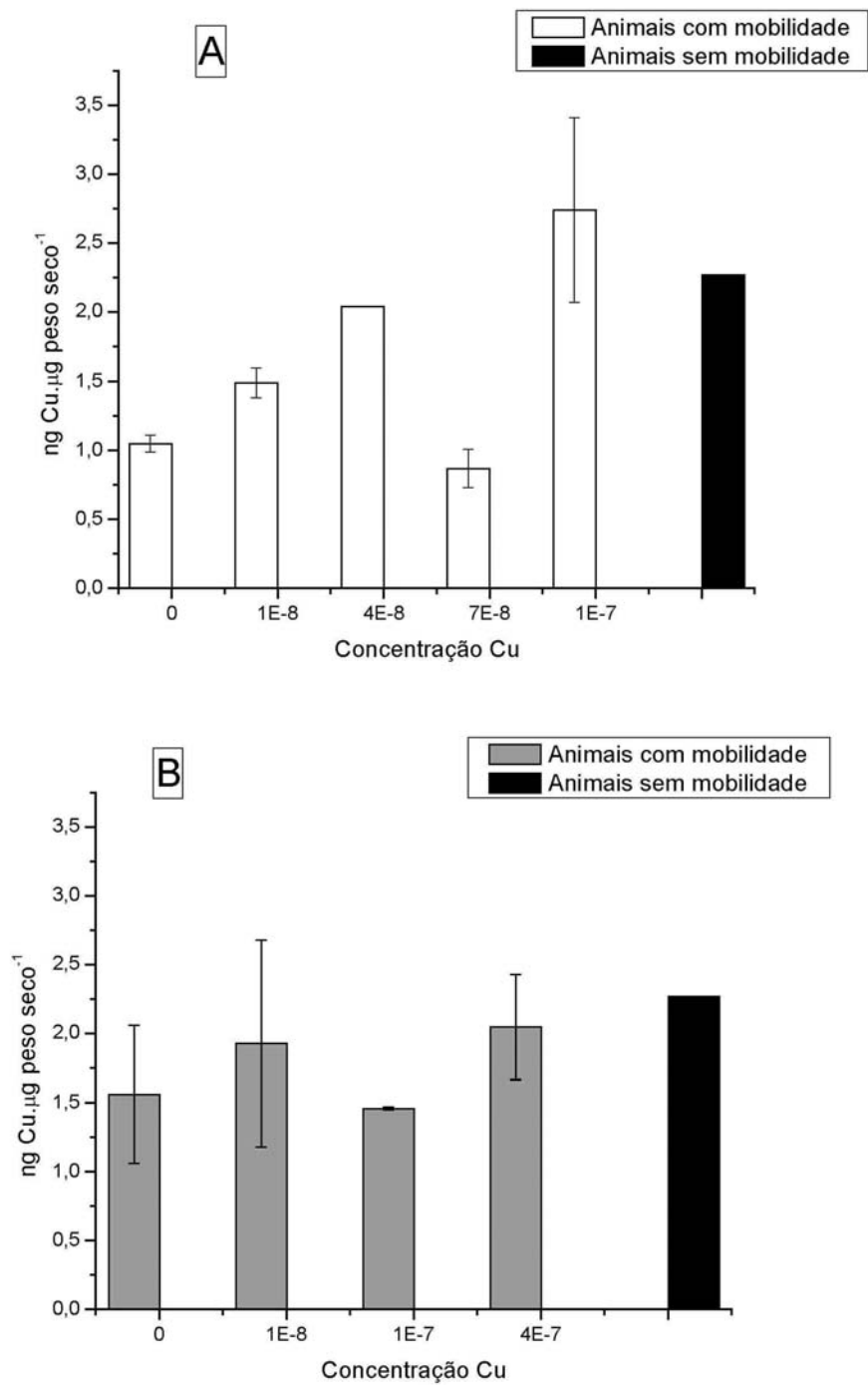


Figura 2: Concentração de cobre (ngCu. $\mu\text{g.PS}^{-1}$) nos organismos com mobilidade e sem mobilidade (barra escura) após a exposição de 24 horas a diferentes concentrações de cobre no meio; (A) sem a adição de 30mg L^{-1} de exopolissacarídeo e (B) com a adição de 30mg L^{-1} de exopolissacarídeo.

CONCLUSÕES

- Foi constatada a ingestão de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* por *Ceriodaphnia cornuta* e seu efeito sobre aspectos reprodutivos e de crescimento somático sugerem que este seja um alimento de boa qualidade;
- Foi verificado que *C. cornuta* alimentada com *Scenedesmus bijugus* à concentração de 10^5 céls mL⁻¹ apresenta maiores taxas reprodutivas e de crescimento somático do que quando alimentada com seston natural do Reservatório de Barra Bonita-SP;
- Foi verificada a diminuição da toxicidade do cobre para *C. cornuta* em meio contendo exopolissacarídeos de *A. spiroides*;
- As concentrações de cobre nos organismos após a exposição de 24 horas a diferentes concentrações de cobre em meio sem e com a adição de exopolissacarídeo mostraram pouca variação, sugerindo que *C. cornuta* seja capaz de regular o conteúdo de cobre no corpo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO R.M. **Potencial de heterotrofia do Reservatório de Barra Bonita (SP), com ênfase na decomposição de polissacarídeos extracelulares de espécies fitoplanctônicas.** 2004. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

ANDERSON D.M.; MOREL F.M.M. Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*, **Limnology and Oceanography**, 23: 283-295, 1978.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecology: individuals, populations and communities.** 3^a Edição. London: Blackwell science, 1996.

BJØRNSSEN P.K. Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it?, **Limnology and Oceanography**, 33: 151-154, 1988.

BRYAN, G.W.; LANGSTON, W.J. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review, **Environmental Pollution** 76: 89 –131, 1992.

- CALEFFI, S. Impacto do uso do sulfato de cobre sobre o zooplâncton na represa de Guarapiranga. In: ESPÍNDOLA, E.L.G. *et al.* **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**. São Carlos, SP: Ed. RiMa, 03 – 13, 2000.
- CALIJURI, M.C.; DOS SANTOS, A.C.A.; JATI, S. Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). **Journal of Plankton Research**, 24 (7): 617-634, 2002.
- CARSON, R.. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Companhia Melhoramentos de São Paulo, 305 pp.,1962.
- CORRADI M.G.; GORBI G.; MORSE ABD-EL-MONEM H.; TORELLI A.; BASSI M.
Exudates from the wild type and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* influence differently Cr(VI) toxicity to algae, **Chemosphere**, 37: 3019-3025, 1998.
- COSTA, J.B. & ESPÍNDOLA, E. L. G. 2000. Avaliação toxicológica da água e sedimento em tributários do reservatório de Barra Bonita (Médio Tietê Superior). In: ESPÍNDOLA, E.L.G. *et al.* **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**. São Carlos, SP: Ed. RiMa, 75 – 93, 2000
- DAJOZ, R. A poluição.II. O panorama das poluições. In: **Enciclopédia de ecologia**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 158 – 251, 1979.
- DICIONÁRIO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS. Rio de Janeiro: Thex Editora, 1999.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 602pp., 1998.

- FERREIRA, A.G.; MACHADO, A.L.S.; ZALMON, I.R. Metais pesados em moluscos bivalves no Litoral Norte do estado do Rio de Janeiro. In: ESPÍNDOLA, E.L.G. *et al.* **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**. São Carlos, SP: Ed. RiMa, 2000.
- FOGG G.E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis, **Botanica Marina**, 26: 3-14, 1983.
- GIESY, JR. J.P.; LEVERSEE G.J.; WILLIAMS D.R. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae), **Water Research**, 11: 1013-1020, 1977.
- GOODYEAR, K.L.; McNEIL, S. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review. **The Science of the Total Environment**, 229: 1-19, 1999.
- GORBI, G.; CORRADI, M.G.; INVIDIA, M.; RIVARA, L.; BASSI, M. Is Cr (VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction. **Water Research**, 36: 1917-1926, 2002.
- GORHAM P.R.; MCLANGLAN J.; HAMMER U.T.; KIM W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae*, **Verhandlungen Internationalem Vereinigung für Limnologie**, 15: 769-780, 1964
- GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide-c, **Journal of Phycology**, 8: 10-14, 1972.
- HAITZER, M.; HOSS, S.; TRAUNSPURGER, W.; STEINBERG, C. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review, **Chemosphere**, 37(7): 1335–1362, 1998.

- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; & THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays, **Environmental Science and Technology**, 11: 714-719, 1977. Correction, 12: 417, 1978.
- JARDIM W.F.; PEARSON H.W. A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria, **Water Research**, 18: 985-989, 1984.
- KIM S.D.; GU M.B.; ALLEN H.E.; CHA D.K. Physicochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* to copper, **Environmental Monitoring and Assessment**, 70: 105-116, 2001.
- LAMBUSKA, I.; STRINGER, R.; BRIGDEN, K. Poluição por metais e compostos orgânicos associada à unidade da Bayer em Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brasil. 2000. Disponível em: <www.greenpeace.org.br/bayer/index_port.asp>
- LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura sp.* (Chrysophyceae), **Phycologia** 37(1): 34-39, 1998a
- LOMBARDI A.T.; VIEIRA A.A. H. Lead and copper toxicity to *Nephrocytium lunatum* (Chlorophyceae) and their complexation with excreted material, **Revista de Microbiologia**, 29: 44-48, 1998.
- LOMBARDI A.T.; VIEIRA A.A. H. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates, **Phycologia**, 39: 118-125, 2000.
- LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. Lead- and copper-complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta), **Phycologia** 38(4): 283-288, 1999
- LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H.; SARTORI, L.A. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales), **Journal of Phycology** 38: 332-337, 2002.

- LORES E.M.; PENNOCK J.R. Bioavailability and trophic transfer of humic-bound copper from bacteria to zooplankton, **Marine Ecology Progress Series**, 187: 67-75, 1999.
- LOVELOCK, J. **As eras de Gaia: a biografia da nossa Terra viva**. Rio de Janeiro: Ed. Campus Ltda, 236 pp., 1988.
- MA M.; ZHU W.; WANG Z.; WITKAMP G.J. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid, **Aquatic Toxicology**, 63: 221-228, 2003.
- MAZON, A.F.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *Prochilodus scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). In: ESPÍNDOLA, E.L.G. *et al.* **Ecotoxicologia – Perspectivas para o século XXI**. São Carlos, SP: Ed. RiMa, 327 – 339, 2000
- MCGEER J.C.; SZEDEDINSZKY C.; MCDONALD D.G.; WOOD C.M. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 133: 147-160, 2002.
- MINOR, E.C.; EGLITON, T.I. Molecular-level variations in particulate organic matter subclass along environment, **Marine Chemistry**, 67: 1030-1122, 1999.
- NOGUEIRA, P.F.M. **Influência de exopolissacarídeo de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) na toxicidade, bioacumulação e transferência tóxica do cobre por *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae) de um reservatório eutrofizado do Rio Tietê**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

NRIAGU, J.O. Global metal pollution, **Environment**, 32(7): 7-33, 1990.

PAULSEN B.S.; VIEIRA A.A.H. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta), **Journal of Phycology**, 30: 638-641, 1994.

RAINBOW P.S.; DALLINGER R. Metal uptake, regulation, and excretion in freshwater invertebrates. In: DALLINGER R.; RAINBOW P.S. **Ecotoxicology of metals in invertebrates**, Boca Raton: Lewis Publisher, 134 – 145, 1993.

RAMADE F. A poluição. I. A difusão de poluentes. In: **Enciclopédia de ecologia**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 140 – 158, 1979.

ROJAS N.E.T.; MARINS M.A.; ROCHA, O. The effect of abiotic factors on the hatching of *Moina micrura* KURZ, 1874 (Crustacea, Cladocera) ephippial eggs, **Brazilian Journal of Biology**, 61(3), 371-376, 2001.

STEPHENSON A.; LAMBUSKA, I.; STRINGER, R. Análise de sedimento fluviais coletados a montante e a jusante da indústria química Solvay-Indupa, Rio Grande da Serra, São Paulo, Brasil. 1998. Disponível em: <www.greenpeace.org.br/toxicos/metais.asp>

STUIJFZAND, S.C.; JOKER, M.J.; VAN AMMELROOY, E.; ADMIRAAL, W. Species-specific responses to metals in organically enriched river water, with emphasis on effects of humic acids, **Environmental Pollution**, 106: 115-121, 1999.

SUNDA, W.G.; GUILLARD, R.R. Relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton, **Journal of Marine Research**, 34: 511-529, 1976.

SUNDA W.G.; HUNTSMAN S.A. Process regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems, **Science of Total Environment**, 219: 165-181, 1998.

SUNDA W.G.; LEWIS J.A.M. Effect of complexation by natural organic-ligands on toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*, **Limnology and Oceanography**, 23: 870-876, 1978.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed. Edited by C.I. Weber. EPA-600/4-90/027, 1991.

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

WETZEL R.G. Structure and productivity of aquatic ecosystems. **Limnology**, 2nd edition, Saunders College Publishing, 134 - 156, 1983.

WOOD A.M.; VAN VALEN L.M. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton, **Marine Microbial Food Webs**, 4: 103-116, 1990.

FIGURAS



Figura 1: A cianofícea *Anabaena spiroides*, cujos exopolissacarídeos foram utilizados neste estudo.



Figura 2: Aspecto geral de uma fêmea de *Ceriodaphnia cornuta*.



Figura 3: Localização e imagem do reservatório de Barra Bonita, local de procedência das espécies estudadas (Fonte: ANTONIO, 2004).

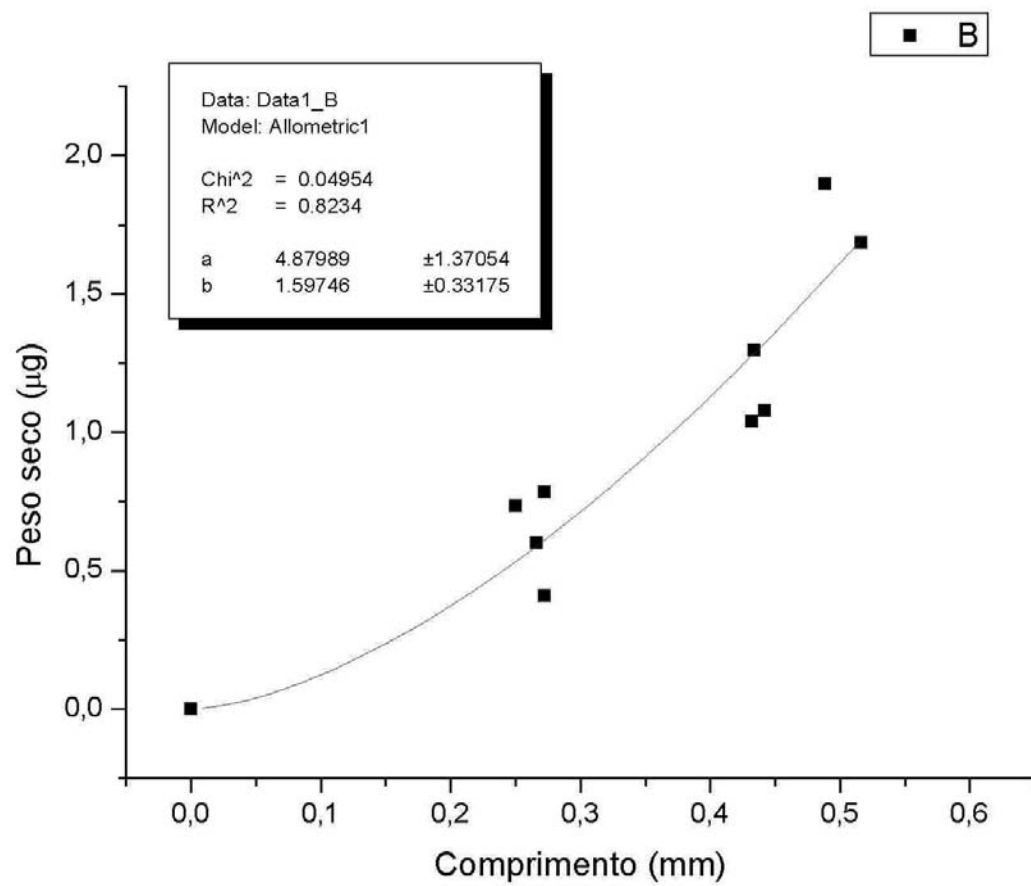


Figura 4: Regressão peso seco (µg) – comprimento (mm) para *Ceriodaphnia cornuta*.