

MARCELA MERIDES CARVALHO

**ESTUDO DA ATUAÇÃO DOS METAIS ZINCO E CÁDMIO SOBRE OS
ASPECTOS REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE *CERIODAPHNIA DUBIA*
GERAÇÃO PARENTAL E F1.**

Sorocaba - SP
2016

MARCELA MERIDES CARVALHO

**ESTUDO DA ATUAÇÃO DOS METAIS ZINCO E CÁDMIO SOBRE OS
ASPECTOS REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE *CERIODAPHNIA DUBIA*
GERAÇÃO PARENTAL E F1.**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração, Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata Fracácio

Sorocaba - SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba

Carvalho, Marcela Merides.

Estudo da atuação dos metais zinco e cádmio sobre os aspectos reprodutivos da espécie *Ceriodaphnia dubia* geração parental e F1 / Marcela Merides Carvalho, 2016.

74 f.: il.

Orientador: Renata Fracácio.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2016.

1. Toxicidade - Testes. 2. Metais. 3. *Ceriodaphnia dubia*. 4. Recuperação Biológica. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da atuação de metais com potencial de interferência endócrina em algas e em microcrustáceos: estudo de multigerações.

AUTORA: MARCELA MERIDES CARVALHO

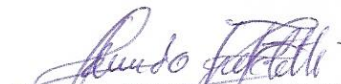
ORIENTADORA: RENATA FRACACIO FRANCISCO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. RENATA FRACACIO FRANCISCO

Coordenação de Curso de Engenharia Ambiental - ICTS/ UNESP / UNESP Sorocaba



Prof. Dr. EDUARDO BERTOLETTI

CONSULTOR EM ECOTOXICOLOGIA INDEPENDENTE



PROFESSOR DOUTOR EVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA

Departamento de Hidráulica e Saneamento / ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS-USP

Sorocaba, 19 de fevereiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS, que me deu condições de entrar e permanecer no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e possibilitou o encontro com pessoas muito especiais durante esses anos, sem as quais certamente não teria conseguido!

A meus pais, Carlos e Tita, pois acreditaram em mim em todo tempo embutindo valores preciosos em meu coração que jamais serei capaz de retribuir. Obrigada pelo amor incondicional!

A minha família em especial irmãs e cunhados, pois sempre estiveram presentes demonstrando paciência e carinho, aos meus sobrinhos lindos que me fazem rir mesmo sem querer. Obrigada pela força e companheirismo!

À Prof^a Dra Renata Fracácio, pela orientação e por desafiar meu potencial de uma forma que eu não acreditava ser capaz de corresponder.

Às minhas amigas e parceiras do Laboratório de Toxicologia: Vivian, Leda, Cris e Cláudia por participarem diretamente deste trabalho me auxiliando durante os testes. Obrigada pela amizade e parceria!

A meus amigos do mestrado, pelos momentos compartilhados, pela muitas risadas no ônibus a caminho das aulas de campo, mesmo com sol quente e carrapatos não perdiam a alegria. Obrigada pelo carinho durante as conversas nos intervalos que gerava incentivo e motivação. Foi bom poder conhecer cada um de vocês!

Finalmente, gostaria de agradecer ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp Sorocaba por propor um curso com tanta excelência e profissionalismo oferecendo sempre aos alunos as melhores oportunidades de crescimento acadêmico. Estendo os meus agradecimentos aos outros professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais conhecer cada um de vocês me inspirou ser alguém melhor.

OBRIGADA A TODOS!

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência... Pois, apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida”.

Augusto Cury

CARVALHO, M. M. **ESTUDO DA ATUAÇÃO DOS METAIS ZINCO E CÁDMIO SOBRE OS ASPECTOS REPRODUTIVOS DA ESPÉCIE *CERIODAPHNIA DUBIA* GERAÇÃO PARENTAL E F1. 2016. 74 f.** Dissertação (Mestrado Ciências Ambientais) Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, 2016.

RESUMO

Poluentes metálicos são considerados substâncias potencialmente tóxicas capazes de interferir no sistema biológico, causando efeitos adversos no organismo exposto e em seus descendentes. Os efeitos de cádmio e de zinco em microcrustáceos são pouco descritos na literatura e a realização de estudos com concentrações semelhantes às detectadas nos ambientes naturais possibilita respostas mais próximas da realidade. Diante dessa questão, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos de metais, sobre *Ceriodaphnia dubia*, em exposição crônica (via água e alimento), por meio de testes ecotoxicológicos, avaliando-se os aspectos reprodutivos, viabilidade e recuperação biológica da geração F1. Foram realizados testes de toxicidade com duas diferentes concentrações dos metais Cd e Zn, sendo essas concentrações ambientalmente seguras para a proteção da vida aquática com base na legislação nacional vigente e concentrações detectadas em ambientes naturais brasileiros. Posteriormente, a geração F1 exposta por curto período foi mantida em condição livre de contaminante, seguindo-se a avaliação toxicológica por análise quantitativa e morfológica de neonatos, análise de metais em tecidos biológicos de *C. dubia* geração parental e F1. As análises das concentrações de Zn foram feitas em Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), enquanto as de Cd em Espectrofotômetro de Absorção Atômica – Forno de Grafite/EEA, no entanto, para ambos os metais não foram detectados bioconcentração de elementos metálicos. Os resultados demonstram que Zn e Cd alteram o padrão reprodutivo de *C. dubia*, causando toxicidade crônica, sendo assim, pode-se concluir que tanto as concentrações encontradas no meio ambiente, quanto às consideradas seguras para a proteção da vida aquática comprometeram a reprodução do organismo-teste, bem como o desenvolvimento dos descendentes. Porém, quando a geração F1 é colocada em ambiente livre de contaminante pode apresentar maior chance de se recuperar e prosseguir gerando descendentes viáveis.

Palavras-chave: toxicidade; metais; *Ceriodaphnia dubia*; recuperação biológica.

CARVALHO, M.M. **STUDY OF PERFORMANCE THE METALS ZINC AND CADMIUM ON REPRODUCTIVE ASPECTS OF SPECIES *CERIODAPHNIA DUBIA* GENERATION PARENTAL AND F1.** 2016 74 f. Dissertation (MSc Environmental Sciences), Institute of Science and technology of Sorocaba, UNESP - São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, 2016.

ABSTRACT

Metallic pollutants are considered potentially toxic substances that can interfere with the biological system, causing adverse effects on the exposed organism and its descendants. The effects of cadmium and zinc in microcrustaceans are not very described in the literature and studies with similar concentrations to those found in natural environments allows closer to reality answers. Faced with this question, this research aims to evaluate the effects of metals on *Ceriodaphnia dubia*, in chronic exposure (via food and water) through ecotoxicological tests, by evaluating reproductive aspects, viability and biological recovery of the F1 generation. Toxicity tests were performed with two different concentrations of Cd and Zn, and these environmentally safe concentrations for the protection of aquatic life based on current national legislation and concentrations detected in Brazilian natural environments. Thereafter, the F1 generation was exposed for a short period kept contaminant-free condition, followed by the toxicological evaluation by quantitative and morphological examination of neonates, metals analysis of biological tissues of *C. dubia* parental and F1 generation. Analysis of the Zn concentrations were made in Spectrometry Optical Emission Inductively Coupled Plasma (ICP OES), while Cd in Atomic Absorption Spectrophotometer - Furnace Graphite / EEA, however, for both metals were not detected bioconcentration metallic elements. The results demonstrate that Zn and Cd alter the reproductive pattern *C. dubia*, causing chronic toxicity, and can therefore be concluded that both the concentrations found in the environment, for the considered safe for the protection of aquatic life committed reproducing the test organism as well as the development of the offspring. But when the F1 generation is placed in contaminant-free environment may be more chance to recover and continue producing viable descendents.

Keywords: Toxicity; metals; *Ceriodaphnia dubia*; biological recovery.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS NO MEIO AMBIENTE AQUÁTICO.....	12
2.2	METAIS: UM PROBLEMA AMBIENTAL	13
2.3	METAIS EM ORGANISMOS: ÊNFASE PARA ATUAÇÃO BIOLÓGICA.....	15
2.3.1	<i>Zinco</i>	17
2.3.2	<i>Cádmio</i>	18
2.4	ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA.....	20
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	MÉTODOS	25
4.1	ORGANISMO-TESTE: CULTIVO E MANUTENÇÃO.....	25
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
4.2.1	<i>Teste de toxicidade crônica</i>	29
4.2.2	<i>Análises Químicas</i>	35
4.3	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	35
4.4	TRATAMENTO DOS RESÍDUOS	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÕES	57
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	58
8	BIBLIOGRAFIA	59
9	ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água e o controle dos impactos ambientais estão assumindo papel de elevada importância para sociedade, pois a degradação, que na maioria das vezes é antropogênica, leva a diminuição considerável de sua disponibilidade, desencadeando na perda dos seus múltiplos usos.

As atividades agrícolas e industriais geram excessiva carga poluidora e em conjunto com as atividades domésticas tornam-se as principais responsáveis pela degradação dos ecossistemas aquáticos, devido ao lançamento de seus resíduos em mananciais, sendo a grande maioria sem nenhum tipo de tratamento. Ao longo do curso d'água essas ações contínuas alteram as características físicas, químicas e biológicas do ecossistema, interferindo na estrutura natural do sistema.

A poluição de ambientes aquáticos por produtos químicos inorgânicos e orgânicos é um dos principais fatores que representa uma ameaça para a sobrevivência de organismos aquáticos. Dentre os poluentes, os metais apresentam grande importância ecológica devido ao seu potencial de acumulação e toxicidade, uma vez que esses elementos não são biodegradáveis (BAIRD, 2002; NURBERG, 1984, apud JESUS, 2008).

Existem cerca de vinte elementos considerados tóxicos para a saúde dos seres humanos incluindo Hg, Cd, Pb, As, Mn, Tl, Cr, Ni, Se, Te, Sb, Be, Co, Mo, Sn, W e V. Destes, os dez primeiros são os de maior utilização industrial e, por este motivo, são os mais estudados do ponto de vista toxicológico. Tais elementos reagem com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas o que, muitas vezes, lhes conferem as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos (TAVARES & CARVALHO, 1992).

Segundo Zagatto (2008), agente tóxico é qualquer substância que cause dano grave ou morte, através de uma interação físico-química com o tecido vivo,

enquanto a toxicidade é a capacidade que uma substância tem de produzir dano a um organismo vivo, quando entra em contato com o mesmo. A toxicidade depende da dose, tempo de exposição, da forma física e química do elemento e da via de administração/adsorção, além da biologia dos organismos expostos.

De forma geral, diversas substâncias químicas, incluindo os elementos metálicos, tem demonstrado toxicidade alterando o sistema biológico dos seres vivos e seus descendentes. Os efeitos dos metais em organismos aquáticos têm sido estudados em diferentes grupos de pesquisas nacionais e internacionais, devido à presença dos elementos metálicos em ambientes aquáticos do mundo todo (REIS *et. al.*, 2006; SODRÉ *et. al.*, 2007; HUTCHINSON, 2007; VERSLYCKE *et. al.*, 2007; BRITTO, 2011; SOUZA, 2012; PLAUTZ & SALICE, 2013). Este fato, associado à entrada constante de elementos metálicos no meio ambiente, demonstra a necessidade da produção de dados científicos que possamos ampliar o conhecimento sobre os riscos desses contaminantes no meio ambiente a fim de garantir a proteção da vida aquática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metais potencialmente tóxicos no meio ambiente aquático

Os metais são geralmente definidos segundo suas propriedades físicas no estado sólido, como: alta condutividade elétrica, decrescente com o aumento da temperatura e alta condutividade térmica. Metais no estado sólido também são caracterizados pela sua estrutura cristalina, pelas ligações químicas específicas e pelas propriedades magnéticas. Porém, para a compreensão dos efeitos tóxicos dos metais, são mais importantes as propriedades dos metais quando em solução aquosa. Desta forma, metais podem ser definidos como elementos que, em sistemas biológicos, reagem perdendo um ou mais elétrons para formar cátions (NORDBERG et al., 2007).

Todos os seres vivos necessitam de alguns metais em doses pequenas, sendo esses metais chamados de micro nutrientes (Figura 1), como o caso do zinco, magnésio, cobalto e ferro (constituente da hemoglobina). Esses metais, mesmo sendo essenciais, quando em altas concentrações podem apresentar efeitos adversos para os organismos, dependendo do contaminante, da concentração, do tempo de exposição e da susceptibilidade individual. Assim, o monitoramento de espécies metálicas nos diversos compartimentos ambientais se tornou uma ferramenta de particular importância, pois todos os seres vivos, de alguma forma, estão expostos a essas substâncias (DORNFELD, 2002; QUINÁGLIA, 2006; NORDBERG et al., 2007; SARKAR, 2002).

Figura 1. Indicação dos Elementos Metálicos Essenciais com bordas em negrito na Tabela Periódica e destaque em preenchimento cinza para os elementos potencialmente tóxicos.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Rf	Ha													
Lantanídeos				Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Actinídeos				Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw

FONTE: Adaptado de tabelaperiodica.org

Alguns metais recebem uma atenção maior, devido à capacidade de produzirem efeitos adversos aos organismos por si próprios ou pela interação com outros elementos. A figura 1 apresenta na tabela periódica os elementos considerados tóxicos em diversos documentos (periódicos, conferências internacionais e Organização Mundial de Saúde - OMS). Dentre os diversos contaminantes ambientais estudados, os metais são amplamente citados, pois é um dos grupos mais antigos que afetam o meio ambiente, devido ao grande uso desses elementos pelo homem, desde a antiguidade até a vida moderna.

Os metais são encontrados nas mais variadas formas químicas (elementar, dissolvidos, adsorvidos a partículas sólidas, complexados, entre outras) e estão distribuídos nos mais diversos compartimentos ambientais, tais como solo, água, ar, sedimento e organismos vivos. Os elementos metálicos são encontrados em todos os organismos vivos e desempenham uma variedade de funções, podendo ser elementos estruturais, estabilizadores de estruturas biológicas, componentes de mecanismos de controle, como nervos e músculos e, em particular, são ativadores em reações de transferência de elétrons, como redução-oxidação ou oxirredução (QUINÁGLIA, 2006; LEEWEN et. al, 2007; NORDBERG et. al., 2007).

2.2 Metais: Um problema ambiental

Nas últimas décadas o mundo tem seguido um modelo de desenvolvimento caracterizado pela fabricação e utilização de diversos produtos formados por compostos químicos de uso doméstico, industrial e agrícola, como inseticidas, detergentes, repelentes, desinfetantes, fragrâncias, solventes, remédios, entre outros. Segundo a Sociedade Americana de Química há cerca de 10 milhões de substâncias químicas estão disponíveis comercialmente e mencionadas na literatura científica. Estima-se que cerca de 70 mil são de uso cotidiano, sendo 2 mil novas substâncias são adicionadas a essa lista anualmente (MOZETO & ZAGATTO, 2008).

Algumas dessas substâncias podem alterar o funcionamento do sistema biológico dos organismos expostos, afetando a saúde, o crescimento, reprodução e até mesmo seus descendentes. Os metais estão presentes no meio ambiente

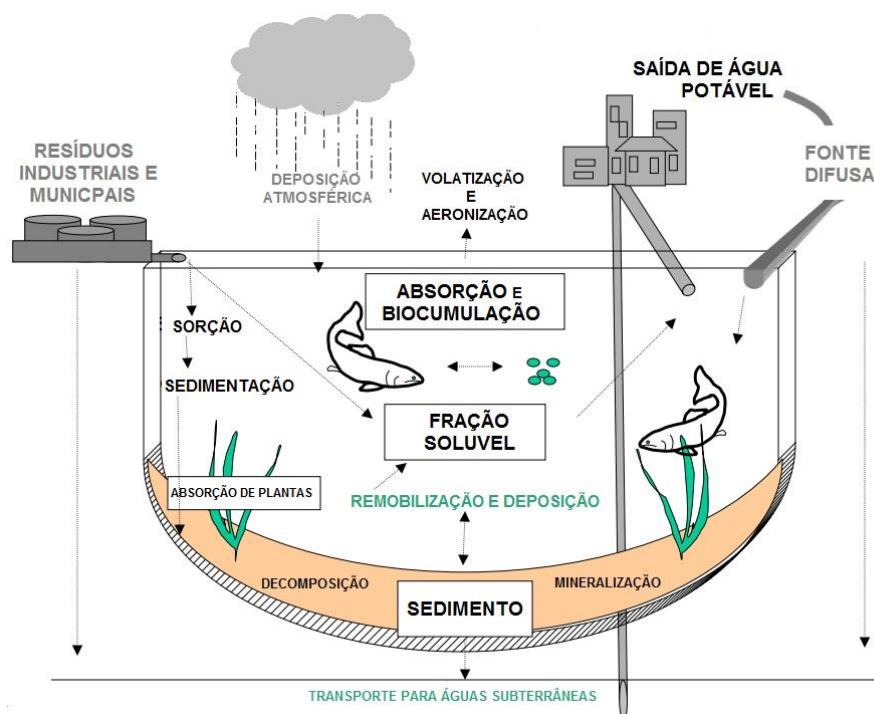
sendo metabolizados de maneira diferente causando implicações biológicas irreversíveis. Por isso os números de pesquisas científicas relacionadas aos efeitos dos metais aumentaram significativamente nos últimos anos.

Os efeitos biológicos dependem da substância, dose ou concentração, duração do contato, via de exposição e período do desenvolvimento no qual o organismo foi exposto (DAMSTRA, 2002; BILA & DEZOTTI, 2007). Segundo Baird (2002), quando o organismo em fase de desenvolvimento é exposto pode desencadear anomalias, desenvolvimento desordenado de células, dentre outros, pois esses poluentes podem ser transferidos da mãe para o feto (efeito teratogênico).

Atualmente os metais são encontrados no mundo todo em diferentes compartimentos de um ecossistema aquático. Podem ser encontrados na água, em materiais particulados em suspensão, no sedimento e na biota. Esses compartimentos possuem forte interação entre si. Os metais em solução podem adsorver-se ao material particulado e transportar-se para o sedimento. Este por sua vez, ao ser resuspenso ou a partir de alterações nas características físico-químicas do ambiente, pode disponibilizar metais para o corpo d'água. Em geral, a mistura e deposição de substâncias químicas em ambientes aquáticos ocorrem nos sedimentos, os quais desempenham um importante papel nestes ambientes, funcionando como fonte de metais para a coluna d'água, dependendo das condições físico-químicas locais (BERRYMAN, 202; CAMPBELL et. al., 2004; NORDBERG et al., 2007) (figura 2).

Muitas destas substâncias, embora banidas, ainda permanecem e permanecerão por muito tempo na natureza, pois são normalmente substâncias persistentes de elevada estabilidade. Observa-se que mesmo em pequenas quantidades seu efeito pode ser magnificado através da cadeia alimentar comprometendo todo ecossistema (CAMPBELL et. al., 2004, SOFYAN et. al., 2007).

Figura 2. Destinos dos metais no meio ambiente.



FONTE: Adaptado Campbell et. al., 2004.

Alguns elementos metálicos possuem capacidade de se misturar a outras substâncias, sendo assim a sua capacidade de alterar o sistema metabólico do organismo exposto pode ser inativado ou potencializado, tornando ainda mais complexa a molécula química, aumentando a dificuldade de prever os impactos no ecossistema (DAMSTRA, 2002; BILA & DEZOTTI, 2007, CARVALHO & FRACÁCIO, 2013).

De modo geral os metais são fontes importantes de danos causados aos ambientes aquáticos, e qual segundo Castro (2005) influencia na redução da biodiversidade levando a um desequilíbrio ambiental. Neste sentido faz se necessário repensar em medidas de redução dos teores de contaminantes tóxicos lançados, visando à recuperação do ecossistema.

2.3 Metais em organismos: ênfase para atuação biológica

Com vistas à proteção da vida aquática, mais importante do que a concentração total dos contaminantes no ambiente é a sua biodisponibilidade, que é a fração de metal livre para ser assimilada pelos organismos. Os metais

lançados nos corpos d'água nem sempre estão igualmente biodisponíveis para os organismos aquáticos. Um das formas de se medir a biodisponibilidade é determinar a concentração dos metais acumulados na biota, diretamente nos organismos expostos a estes contaminantes presentes na água e sedimento (AMADO-FILHO et al., 2008; BORGMAN, 2003; DORNFELD, 2002).

Segundo Rainbow (2002), todos os invertebrados aquáticos acumulam metais em seus tecidos, sejam estes metais essenciais ou não para o seu metabolismo. Algumas espécies acumulam metais traço em diferentes concentrações em seus tecidos, órgãos e em seus corpos. Desta forma, podem ser encontradas concentrações corporais de metais traço muito diferentes entre os invertebrados aquáticos que vivem no mesmo habitat. Portanto, torna-se essencial utilizar diversos organismos para avaliar a contaminação do ambiente (AMADO-FILHO et al., 2008).

Segundo Castro *et al.* (2005), metais integram os ciclos biogeoquímicos do planeta, onde observa-se que fenômenos naturais como a erosão podem provocar a dissolução de diversos componentes promovendo a transmissão de metais aos solos, ao ar e à água. Dependendo das condições ambientais podem começar a ser liberados na coluna d'água tornando-se biodisponíveis, correndo o risco de serem incorporados na biota por meio de contato superficial, ingestão, alimentação e cadeia alimentar, conseqüentemente podendo causar danos também à saúde humana (KHAN *et al.*, 2005).

Naturalmente os organismos necessitam de quantidades variadas de alguns metais para desenvolverem suas atividades metabólicas, porém em concentrações inadequadas tais elementos podem ser altamente tóxicos, dependendo dos fatores individuais do organismo e do grau de exposição (DAMSTRA, 2002; RAND E PETROCELLI, 2004). Relata-se na literatura que mesmo em pequenas quantidades de metais, seu efeito poderá ser potencializado através da ascensão na cadeia alimentar devido ao potencial de acumulação no organismo. Nesse sentido, os efeitos dos metais ainda não foram bem descritos e são variáveis em função das características químicas peculiares, considerando-se os sítios de ação de cada metal (LAVICOLI, et. al. 2009).

Alguns metais podem se acumular no tecido dos organismos e afetar as funções de algumas enzimas, inibindo sua ação metabólica entre outras, sendo assim os efeitos podem ser bastante variáveis e devem ser investigados (PATNAIK, 2002; FERREIRA, 2003). Recentemente estudos experimentais mostraram que mesmo baixas doses dos metais, como o cádmio e zinco podem causar alterações nas funções do sistema biológico no organismo. São relatadas alterações no sistema reprodutivo em populações de pequenos vertebrados, diversas espécies de peixes e outros microinvertebrados (JESUS & CARVALHO, 2008; LAVICOLI et. al., 2009; SOUZA, 2012; MOREIRA, 2010).

Metais como muitos outros contaminantes podem inibir a aquisição de alimentos em *D. magna*, interferindo na taxas de crescimento e reprodução, prejudicando severamente a idade da primeira reprodução (BARATA e BAIRD, 2000; EVENS et. al., 2009). Para o organismo *C. dubia* efeitos reprodução também podem ser observados, quando ocorre o aumento do tempo de exposição a capacidade reprodutiva diminui. Os efeitos causados em crustáceos e outros organismos aquáticos podem afetar tanto a geração parental quanto o desenvolvimento de outras gerações. Alterações na sobrevivência, crescimento, reprodução, comportamento, fisiologia e morfologia são recentemente evidenciadas por diversos grupos de pesquisa (TSUI & WANG 2005; MARSHALL 2008).

2.3.1 Zinco

O Zinco está dentre os metais potencialmente tóxicos e apesar de ser um elemento essencial na dieta de plantas e animais, tendo papéis enzimáticos, estruturais e regulatórios em muitos sistemas biológicos, pode tornar-se tóxico quando esses organismos estão expostos a uma concentração elevada (BIELMYER, 2006; CONDESSA, 2009; SANTOS, 2009).

Raramente é encontrado zinco naturalmente em seu estado metálico, mas muitos minerais contêm Zn como um componente principal a partir do qual o metal pode ser economicamente recuperado (OMS, 2001). O zinco é usado principalmente como um revestimento de proteção de outros metais, tais como ferro e aço, mas as aplicações mais importantes são as de moldagem de corante,

a indústria da construção e outras ligas. Este metal é como um catalisador e os seus compostos inorgânicos têm várias aplicações para o equipamento automotivo, de armazenamento de pilhas secas e tubos (OMS, 2001).

Os efeitos ocasionados pela ação tóxica desse metal em peixes estão relacionados ao desenvolvimento e à maturação sexual. Retardo na maturação e decréscimo na taxa de crescimento podem ser observados tanto em níveis fisiológicos quanto morfológicos (CAMPOS, 1999, citado por LINS et al, 2010), além de causar alterações nas brânquias dificultando a respiração e levando a morte dos indivíduos (SANTOS, 2009), bem como alterações fisiológicas no fígado (CONDESSA, 2009).

Zaroni et al. (2012) afirmam que o Zn é responsável por impactos na comunidade aquática em geral e mencionam que em *Nitokra sp*, um copépode estuarino, o Zn afetou a eclosão de ovos, interferindo na reprodução deste que é um elo da cadeia trófica bentônica, como de outros compartimentos do ambiente aquático. Outros estudos com pequenos crustáceos aquáticos como *D. magna* e *C. dubia* expostos a diferentes concentrações de Zn demonstraram efeitos significativos na taxa de alimentação, o que conseqüentemente refletiu no crescimento e em seguida na reprodução dos organismos, comprometendo não apenas as espécies expostas como também seus descendentes (MUYSEN E JANSSEN, 2001; MUYSEN E JANSSEN, 2007; DE SCHAMPHELAERE et. al., 2004).

2.3.2 Cádmio

O cádmio é um metal considerado como não essencial e de alta toxicidade, sendo que 38 dos seus sais podem ser cancerígenos (QUINÁGLIA, 2006, OMS, 2001). Está amplamente distribuído pela crosta terrestre, ocorrendo naturalmente associado ao zinco e chumbo em minérios. Pode ser encontrado em altas concentrações em rochas sedimentares e fosfatos marinhos. É encontrado como subproduto do processamento de zinco, cobre e chumbo, sendo frequentemente encontrado em altas concentrações nas áreas de mineração e depósito desses metais. Elevadas concentrações podem ocorrer em água, ar e solo próximo a fontes de emissões industriais. Compostos inorgânicos de cádmio, em sua

maioria, são solúveis em água, por exemplo, cloreto, sulfato, acetato, enquanto que óxidos e sulfetos têm baixa solubilidade, sendo considerados como espécies insolúveis de Cd. Formam com muita facilidade íons aminocomplexos e cianocomplexos, além de complexos com grupos de enxofre, como por exemplo, tiocarbamato (CETESB, 2011; NORDBERG et al., 2007; QUINÁGLIA, 2006; SARKAR, 2002).

Entre os usos do cádmio citam-se os anticorrosivos, eletrodeposição sobre ferro, cobre, latão, aço e outras ligas, além do uso em pigmentos, tintas e esmaltes. Cádmio e seus compostos também são usados em baterias elétricas, componentes eletrônicos, fotografia, fotogravura e reatores nucleares. Devido à possibilidade da substituição do Cd por outros materiais menos tóxicos, a utilização do Cd tem sido limitada por lei em alguns países (MUNGER&HARE, 1997; NORDBERG et al., 2007; QUINÁGLIA, 2006; SARKAR, 2002).

O aporte de cádmio em sistemas aquáticos deve-se a fatores como intemperismo e erosão de solos e rochas, precipitações atmosféricas, operações industriais, vazamento de aterros e locais contaminados, pelo uso de lodos e fertilizantes na agricultura além de efluentes industriais, principalmente de galvanoplastias, produção de pigmentos, soldas, equipamentos eletrônicos, lubrificantes e acessórios fotográficos. Nos sedimentos o cádmio é incorporado por adsorção a partículas minerais, óxidos hidratados e matéria orgânica e a forma química como se encontra pode determinar sua biodisponibilidade e remobilização (QUINÁGLIA, 2006).

Considerando-se o cádmio em sistemas de águas doces, podem residir na coluna de água por longos períodos de tempo. Esse metal é bioacumulativo ao longo do tempo, e por consequência a concentração nos sistemas biológicos tende a aumentar com a idade. Pode ser prejudicial a cladóceros (*Simocephalus serrulatus*) alimentados com algas expostas ao metal, causando efeitos sobre o ciclo de vida, taxas de alimentação e reprodução (SOUZA, 2012) e o mesmo também apresentou efeito sobre o comportamento do anfípoda *Gammarus aequicauda*, diminuindo a sua atividade de natação no período noturno (MORILLO-VELARDE et al, 2010).

Ramírez (2002) ainda destaca que o Cd é um dos maiores agentes tóxicos associados à contaminação industrial e ambiental, por ser persistente no meio e ter a capacidade de se deslocar por quilômetros colocando em risco o meio ambiente e os seres vivos.

Segundo revisão realizada por Lavicoli et. al. (2009), sobre a atuação de metais potencial tóxicos em pequenos vertebrados terrestres, os autores concluíram que alguns aspectos são indispensáveis na busca por ampliar o conhecimento, tais como: 1) Necessidade de relacionar à atuação de metais em sistemas biológicos de diferentes níveis tróficos e fazer a relação dose-resposta; 2) É necessário compreender os efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos dos metais, com ênfase para as questões reprodutivas; 3) Necessita-se avaliar os potenciais efeitos adversos no sistema biológico em baixo nível de exposições a metais, de forma que sejam representativos de ambientes naturais, uma vez que a maioria das informações disponíveis atualmente está relacionada com níveis de exposição elevadas. A compreensão dessas questões deve atender uma ampla classe de organismos e métodos de estudos dinâmicos entre os níveis tróficos para de fato serem estabelecidas concentrações mais próximas às que protegem a biota aquática.

2.4 Ecotoxicologia Aquática

A ecotoxicologia aquática pode ser definida como o estudo dos efeitos dos agentes tóxicos nos organismos aquáticos a nível celular, individual, populacional e nas comunidades (ADAMS, 1995). Considerando-se a avaliação e o monitoramento dos poluentes aquáticos, as análises químicas e físicas detectam e quantificam as substâncias nos ambientes. Porém, para uma melhor compreensão deste significado, é recomendável a utilização dos ensaios ecotoxicológicos que permitam prever os efeitos das mesmas substâncias sobre a biota. Este fato torna a interpretação dos estudos mais relevante e aplicável (ZAGATTO, 2008).

Os ensaios de toxicidade permitem determinar: a) a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos; b) estabelecer critérios e padrões de qualidade de água e sedimento; c) avaliar a toxicidade relativa de

diferentes substâncias; d) avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; e) subsidiar programas de monitoramento ambiental, dentre outras aplicações (ARAGÃO & ARAÚJO, 2008).

A escolha de um organismo-teste, para avaliação da toxicidade, deve ser realizada com base em alguns critérios, destacando-se: ampla faixa de sensibilidade a substâncias tóxicas; abundância e disponibilidade de aquisição; importância comercial ou ecológica; facilidade de cultivo em laboratório; informações literárias sobre a biologia da espécie; ciclo de vida curto; representatividade dos compartimentos ambientais, e ser nativa do sistema de estudo (HOFFMAN, 2003).

O conhecimento dos efeitos biológicos resultantes da exposição às concentrações reais de poluentes é essencial para predizer uma análise de risco ambiental confiável. No entanto, concentrações relativamente altas, têm sido aplicadas em ensaios de toxicidade laboratoriais para obtenção da curva concentração-resposta, em curtos períodos de exposição, não condizendo com a realidade ambiental (FUCHSMAN et. al., 2000). Por este motivo, os ensaios de toxicidade devem basear-se nas concentrações mínimas capazes de provocar algum efeito biológico (crescimento, mobilidade, reprodução, quantidade de filhotes por fêmea, histopatologia, atividades enzimáticas, alterações na expressão gênica, dentre outros) por períodos de tempo prolongados, e não tomar como base somente os efeitos letais.

Neste contexto, vários ensaios de toxicidade crônica já estão bem estabelecidos e alguns métodos já foram padronizados, por associações ou organizações de normalização como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); Environmental Protection Agency (EPA); Organization for Economic Co-operation and Development (OECD); International Organization for Standardization (ISO); American Society for Testing and Materials (ASTM), dentre outras (ARAGÃO & ARAÚJO, 2008).

Assim, além dos ensaios ecotoxicológicos já padronizados é importante identificar a biodisponibilidade, a extensão da concentração do contaminante na biota, e considerar seu impacto potencial na cadeia trófica e seu risco para o

ecossistema. Isto porque o contaminante, neste caso os metais potencialmente tóxicos, quando entram no meio ambiente, podem sedimentar ou ser liberados na coluna d'água, e ser incorporados pela biota em concentrações maiores do que o organismo pode eliminar permanecendo bioacumulado nos tecidos desse organismo tornando-se tóxico e interferindo no seu sistema metabólico.

Para Chen & Folt (2010), a concentração de um contaminante em água nem sempre prediz a concentração na biota, pois o contaminante pode mover-se nos níveis tróficos subsequentes tornando-se muitas vezes superior à que foi inserido (MASSON & JENKIS, 1995; MISHRA *et al.*, 2008, SOFYAN *et. al.*, 2007). Uma vez agregados ou incorporados os contaminantes podem ser transferidos na cadeia alimentar e transformados elevando sua toxicidade (LAWSON & MASON, 1998), podendo provocar também a diminuição da biodiversidade deste ecossistema.

Nesse sentido, a legislação brasileira e internacional estabelecem limites máximos permissíveis de diferentes classes de compostos químicos, em função do uso pretendido do recurso hídrico (CONAMA 357/05, USEPA, 2000). Na legislação brasileira os metais potencialmente tóxicos apresentam limites máximos em corpos de águas classificados como 1 e 2, que dentre outros usos tem como objetivo a proteção da vida aquática. Tais limites foram estabelecidos seguindo-se os padrões da Agência de Proteção Norte Americana (EPA), que se basearam em respostas agudas e crônicas diante da exposição de diferentes organismos-teste, nas décadas de 1970 e 1980. Porém, na época em que se estabeleceram tais concentrações máximas não havia na literatura os métodos padronizados sobre respostas em organismos de diferentes níveis tróficos, sendo necessária uma reavaliação de parâmetros diante dessas novas abordagens toxicológicas.

Diante da problemática, a presente pesquisa objetiva avaliar os efeitos dos elementos químicos cádmio e zinco, por meio da exposição de organismos de diferentes níveis tróficos a concentrações limites, permitidas em legislação nacional vigente e concentrações encontradas no meio ambiente.

Por tratar-se de uma abordagem envolvendo riscos biológicos diante da exposição a poluentes metálicos através de diferentes vias de exposição, estudos associados ao seu comportamento e interações nos sistemas aquáticos, bem como a sua atuação nos sistemas biológicos e capacidade de recuperação, devem ser realizados. Para tanto, os fatores relevantes que devem ser considerados e que serão contemplados no presente trabalho, são: 1) As concentrações permitidas em corpos de água por legislação nacional asseguram a proteção da vida aquática? 2) As concentrações encontradas no meio ambiente, mesmo que relativamente baixas podem causar efeito tóxico para organismos aquáticos? 3) A toxicidade por metais é potencializada quando as vias de exposição ocorrem simultaneamente? 4) É possível haver recuperação biológica depois de interrompida a exposição dos organismos a esses tóxicos, destacando-se a capacidade reprodutiva da geração F1? 5) Esses elementos metálicos podem acumular nos tecidos biológicos organismos aquáticos, mesmo em baixas concentrações (ppb)?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico dos metais Cd e Zn sobre os aspectos reprodutivos de *Ceriodaphnia dubia*, expostas às concentrações consideradas ambientalmente seguras para vida aquática e a concentrações representativas de ambientes naturais do Estado de São Paulo - Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Averiguar se concentrações de Cd e Zn permitidas em legislação nacional para rios de classe 2 e se concentrações encontradas em corpos d'água do estado de SP podem apresentar toxicidade para espécie de microcrustáceo *C. dubia* e alga verde *R. subcapitata*.
- Avaliar a toxicidade causada por esses metais potencialmente tóxicos em organismos espécie *C. dubia* expostos por via aquosa (gerações parental), através do parâmetro reprodutivo.
- Avaliar a viabilidade de *C. dubia* (geração F1) em condição livre de contaminante e capacidade de se recuperar após curto período de exposição, por meio de parâmetro reprodutivo;
- Analisar se a toxicidade por metais é potencializada quando a exposição ocorre de forma concomitante, via aquosa e alimentar em *C. dubia*.
- Analisar a bioconcentração de Cd e Zn em microcrustáceos (*C. dubia*) após ensaios crônicos tradicionais;

4 MÉTODOS

4.1 Organismo-teste: Cultivo e manutenção

4.1.1. *Ceriodaphnia dubia*

Ceriodaphnia dubia (figura 3) é uma espécie de microcrustáceo de água doce da ordem Cladocera bastante usada em testes ecotoxicológicos por apresentar características como sensibilidade às substâncias químicas, fácil manutenção em laboratório, biologia conhecida, ciclo biológico curto e também são representativos no meio ambiente aquático, requisitos para representar um organismo-teste.

Figura 3: Organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*



FONTE: http://cfb.unh.edu/Organisms/Cladocera/Daphnidae/Ceriodaphnia_dubia/_600x600.jpg

Os cladóceros apresentam vantagens competitivas em determinados ambientes, pois gastam menos tempo para atingir a maturidade com ciclo de vida reduzido pela reprodução partenogenética, acelerando o crescimento de suas populações. O padrão reprodutivo dos cladóceros envolve a eclosão de fêmeas de ovos partenogenéticos por gerações, em condições favoráveis, e reprodução sexuada em condições desfavoráveis. O desenvolvimento é direto e os jovens são liberados da câmara incubadora por meio de flexão ventral do pós-abdome da

fêmea, processo que é seguido por ecdise e nova postura de ovos. O número de neonatos pode variar muito, diminuindo nos últimos estágios da vida até cessar a produção de ovos (MELÃO, 1999).

O sucesso da espécie depende das estratégias competitivas que lhe permitam sobreviver e se reproduzir no ambiente, sendo assim o crescimento e reprodução de um organismo dependem exclusivamente da sua morfologia, comportamento, qualidade do alimento e adaptação aos fatores ambientais. Entender o padrão reprodutivo do organismo-teste faz-se necessário, pois os dados da reprodução ao longo dos testes são considerados importante parâmetro para avaliação de toxicidade crônica. Pelo fato de existirem normas nacionais e internacionais padronizadas para a referida espécie, dados confiáveis na literatura podem ser obtidos, demonstrando a importância do seu uso.

No LATHIS (Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia) da UNESP campus de Sorocaba, os organismos estão sendo mantidos em água de cultivo reconstituída, proveniente de água mineral, em pH mínimo e máximo de 7,2 e 7,6 e dureza com variação entre 40 e 48 mg CaCO₃/L. A quantidade de organismos é de 30 indivíduos em 500mL de água de cultivo mantidos em cubas de vidro, que permanecem em incubadoras com controle de temperatura (25°C ± 2°C) e fotoperíodo (16 horas de luz e 600 lux). Os itens alimentares são algas unicelulares da espécie *Raphidocelis subcapitata*, adicionada diariamente às culturas em quantidade equivalente a 10⁵ células/organismo e alimento composto ministrado 2 vezes por semana, na proporção de 0,02 ml/indivíduo, seguindo-se as recomendações da ABNT NBR 13373 (2011). Teste de sensibilidade foram realizados regularmente garantindo a qualidade dos organismos-testes, sendo apresentado carta controle no ANEXO 2.

4.1.2. *Raphidocelis subcapitata*

A *Raphidocelis subcapitata*, anteriormente chamada de *Pseudokirchneriella subcapitata*, é uma alga unicelular (Figura 4), pertencente à Classe das Clorofíceas. Encontram-se geralmente em águas doces, em ambientes considerados oligotróficos e eutróficos (BRITTO, 2011).

A utilização de algas em ensaios de toxicidade é das mais recomendadas, por se tratar de uma espécie classificada na cadeia alimentar como produtores servindo como fonte de alimento para outras espécies aquáticas bem como a facilidade em relação à manutenção de culturas e crescimento em meios sintéticos bem definidos. Além disso, apresentam ciclo de vida curto, facilitando estudos relacionados à avaliação de exposição de várias gerações e taxas de crescimento. Um dos testes empregados rotineiramente visando a avaliação da toxicidade aquática para as algas está relacionado a inibição do crescimento algal (COSTA et. al., 2008, CUNHA, 2010).

Figura 4: Alga *Raphidocelis subcapitata* vista em microscópio óptico.



FONTE: <http://ccala.butbn.cas.cz/en/raphidocelis-subcapitata-korshikov-et-al>

O organismo-teste *R. subcapitata* está sendo cultivado no Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia da UNESP, no campus de Sorocaba, sob condições ambientais recomendadas pela ABNT NBR 12.648 (2011). A manutenção dessa cultura é feita através do preparo de um específico composto de nutrientes selecionados para o desenvolvimento das algas, seguindo-se a norma acima citada, conforme tabela 1.

Tabela 1: 7 soluções usadas no meio de cultura líquido para algas.

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4000	Dissolver e completar para 100mL com água processada
2	KNO_3	10000	Dissolver e completar para 100mL com água processada
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3000	Dissolver e completar para 100mL com água processada
4	K_2HPO_4	4000	Dissolver e completar para 100mL com água processada.
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	Dissolver e completar para 1000mL com água processada.
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60	
	H_3BO_3	60	
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1625	Dissolver e completar para 1000mL com água processada.
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	625	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	625	
7	NaHCO_3	15000	Dissolver e completar para 1000mL com água processada.

Fonte: ABNT NBR 12648 (2011).

Para a preparação do meio de cultura, colocar 500mL de água ultrapura em um balão volumétrico de 1000mL e adicionar as soluções na ordem e quantidade conforme a tabela seguinte:

Tabela 2: Sequência das soluções para preparo de meio olígo líquido.

Solução	1	2	3	4	5	6	7
Volume (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0

Fonte: ABNT NBR 12648 (2011).

Completar com 1000mL com água processada e ajustar pH do meio entre 6,0 e 8,0 com ácido clorídrico (HCl) ou Hidróxido de sódio (NaOH). Ajustado o pH agitar por 1h e autoclavar por 15 min a 121°C, seguindo-se a inoculação das

amostras de alga, com auxílio de uma pipeta autoclavada, em ambiente estéril (respeitando a proporção que a norma se refere, de 10ml de alga/L de meio de cultura), coloca-se um respirador autoclavado para manter em aeração. O sistema é disposto em incubadora com luz constante a temperatura variando entre 23 e 27°C até que o meio apresente coloração de verde intenso, que demonstre a fase exponencial da cultura. Retira-se o meio e armazena-o em geladeira para posterior contagem de células em microscópio óptico, que permite maior controle sobre a cultura. Nessa fase, essas algas são utilizadas para alimentação da cultura de *C. dubia*.

4.2 Desenho experimental

4.2.1 Teste de toxicidade crônica

A. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn por via de exposição aquosa com o organismo-teste *C. dubia*: geração parental e geração F1.

Os indivíduos da espécie *C. dubia* com idade entre 6 e 24 horas de vida (neonatos) foram expostos durante 8 dias às concentrações individuais dos metais Cd e Zn, consideradas ambientalmente seguras para rios de classe 2 em legislação nacional vigente (CONAMA-357/05), conforme tabela 3. Também foram analisadas as concentrações detectadas em ambientes naturais brasileiros, representativos do estado de São Paulo, segundo relatórios de qualidade de águas superficiais da CETESB (2012). Os corpos de água avaliados apresentaram concentrações de zinco e cádmio 50% em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação nacional para rios de classe 2, que tem como uma das finalidades a proteção da comunidade aquática. Na tabela abaixo, destacam-se as concentrações utilizadas nos testes ecotoxicológicos.

Tabela 3. Concentrações dos contaminantes utilizadas nas soluções-testes para os ensaios ecotoxicológicos.

FONTE	CONCENTRAÇÃO DE METAIS	
	Cádmio	Zinco
CONAMA 357/05	0,001 mg/L	0,18 mg/L
CETESB (2012)*	0,0015 mg/L	0,27 mg/L

*Concentrações detectadas em ambientes naturais (SP), segundo relatórios de qualidade de águas (CETESB).

A solução-estoque foi preparada com água mili-Q e armazenada em recipientes plásticos por 6 meses em refrigeração. Para solução-estoque de Zn pesou-se 87,9 mg do sal de Sulfato de Zinco P.A. – ACS ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e colocou-se em 1L de água mili-Q, para obtenção 200mg/L, em seguida ficou em agitação por aproximadamente 1 hora para dissolver completamente o sal. Para a solução-estoque do Cd pesou-se 2,28 mg do sal de Sulfato de Cádmio P.A. – ACS ($\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$) e colocado em 1L de água mili-Q, para obtenção de 1mg/L e também deixado em agitação por 1 hora. As soluções-estoque foram levadas para análise analítica para confirmar as concentrações antes dos testes.

A solução-teste foi feita com água de cultivo e mantidas em garrafas plásticas em refrigeração durante o período do teste. Para solução-teste Zn Conama foi utilizada pipeta automática para retirar 900 µl da solução-estoque e colocar no balão volumétrico de 1L, onde foi avolumado com água de cultivo. Para Zn Meio Ambiente foi pipetado 1350 µl da solução-estoque e também avolumado em 1L de água de cultivo. Da mesma forma se sucedeu para a solução-teste de Cd, foi retirado 1000 µl para concentração Conama e 1500 µl para concentração do Meio Ambiente, ambas foram avolumadas em 1L de água de cultivo.

Para cada concentração estudada bem como para o controle (mantido apenas com água de cultivo, livre de contaminantes) foram realizadas 10 réplicas com 1 organismo-teste de idade entre 6 e 24 horas em cada recipientes plásticos com capacidade para 40 ml. O volume de solução teste foi de 20 ml, em cada recipiente (solução com os metais preparada conforme tabela 3). Os experimentos foram mantidos em incubadoras com temperatura ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (16 horas de luz e 600 lux por 8 dias), em regime semi-estático, com troca de água a cada 3 dias e os parâmetros pH, dureza e oxigênio monitorados a cada troca, seguindo-se as recomendações da ABNT NBR 13373 (2011), conforme figura 6.

Os neonatos da geração parental (geração F1) nasceram em solução com elementos metálicos e estiveram expostos nas primeiras horas de vida. Durante a segunda troca (144 horas) os neonatos foram retirados e introduzidos em soluções livre de contaminação (água de cultivo) e alimentadas com alga livre de

metal para avaliar a capacidade biológica de recuperação na ausência de contaminante. Os experimentos da geração F1 foram mantidos nas mesmas condições que as da geração parental, citada acima, conforme ABNT NBR 13373 (2011). Todo o experimento foi repetido duas vezes em dois momentos distintos para averiguação da reprodutibilidade dos dados (Testes I e II). O resumo do desenho experimental pode ser observado na Figura 6 (A).

Os parâmetros biológicos avaliados foram: 1- Número de neonatos provenientes da geração parental; 2 - Viabilidade da geração F1 proveniente de exposição aquosa; 3- Capacidade da geração F1 de recuperar se e 4- Análise quantitativa de metais em tecidos biológicos (bioconcentração) em organismos adultos e geração F1, por meio de digestão ácida descrita no item 4.2.2.

B. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn com o organismo-teste *R. subcapitata*.

Os ensaios ecotoxicológicos com as algas *R. subcapitata* expostas às concentrações de metais foram montados utilizando-se as mesmas concentrações mencionadas na Tabela 3. Em erlenmeyers com capacidade para 250 mL, previamente descontaminados com banho 10% HNO³ e esterilizados em autoclave à 180°C seguiu-se a inserção de 100 mL de meio de cultura olígo. Posteriormente foram adicionadas as soluções-teste de cada metal separadamente, com auxílio de micropipeta automática, finalizando-se a montagem experimental com a inoculação de células algais correspondente à quantidade de 5×10^5 , conforme descrição na Tabela 4.

O controle experimental foi realizado apenas com o meio olígo seguindo-se a mesma condição acima descrita. Todo o experimento foi realizado em triplicata e repetido em dois momentos distintos para averiguação da reprodutibilidade dos dados (Testes I e II) (Figura 5). Os ensaios foram mantidos em incubadora Shaker (Tecnal TE – 421) com controle automático de agitação em 175 rpm e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 horas, como mostra a figura 6, procedendo-se com troca de posições dos recipientes testes de maneira aleatória a cada 24 horas, seguindo-se as recomendações de ABNT NBR 12648 (2011).

Figura 5 – Ensaio de Toxicidade com *R. subcapitata* em incubadora com agitação e luminosidade.



Fonte: Claudia Hitomi Watanabe

Após esse período as algas foram imediatamente preservadas em lugol e o número de células foi contado em microscópio óptico por meio de câmara de Sedgwick-Rafter, seguindo-se as recomendações da CETESB (L5.303/2012). As contagens foram realizadas para obtenção da concentração de metais incorporados em 10^5 células de *R. subcapitata*/mL, quantidade de alga cedida por organismo (ANEXO 1.B). Para contagem individual de cada amostra retirou-se 100µl da amostra com micropipeta automática e foi colocado na câmara de Sedgwick-Rafter, em seguida foi adicionado 900µl de água mili-Q e deixado em repouso por aproximadamente 15 minutos. A contagem seguiu-se por 10 quadrados aleatórios da câmara, calculando a média do número de células/mm².

Os valores brutos do número de células dos tratamentos foram comparados ao mesmo parâmetro obtido no controle por meio da análise estatística de Kruskal-Wallis.

C. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn por via de exposição aquosa e alimentar, com o organismo-teste *C. dubia*: geração parental e geração F1.

Nas mesmas condições experimentais descritas no item A, foram expostos indivíduos de *C. dubia* nas soluções de Cd e Zn. Esses organismos foram alimentados com *R. subcapitata* mantidas separadamente nas 4 soluções de metais conforme descrito no item B. Nesse experimento os itens alimentares

foram as algas da espécie *R. subcapitata* previamente contaminadas em separado com os metais Zn e Cd, cada metal em duas concentrações distintas, conforme descrito no item B do desenho experimental, e algas livres de contaminantes ministradas para o grupo controle. O alimento *R. subcapitata* foi adicionado diariamente em quantidade equivalente a 10^5 células/organismo, além de 0,02 mL/indivíduo de alimento composto ministrado 2 vezes por semana, seguindo-se as recomendações da ABNT NBR 13373 (2011).

Os neonatos da geração parental (geração F1) nasceram em solução com elementos metálicos e estiveram expostos nas primeiras horas de vida. Durante a segunda troca (144 horas) os neonatos foram retirados e introduzidos em soluções livre de contaminação (água de cultivo) e alimentadas com alga livre de metal para avaliar a capacidade biológica de recuperação na ausência de contaminante. Os experimentos foram mantidos nas condições ambientais idênticas às descritas no item A. Em seguida foram feitas análises das concentrações dos metais nos organismos.

Os parâmetros avaliados foram 1- Número de neonatos da geração parental; 2 - Viabilidade da geração F1 proveniente de exposição aquosa e alimentar; 3- Capacidade da geração F1 de recuperar se e 4- Análise quantitativa de metais em tecidos biológicos (bioconcentração) em organismos adultos e geração F1, descrito no item 4.2.2. O resumo do desenho experimental A, B e C pode ser observado na figura 6.

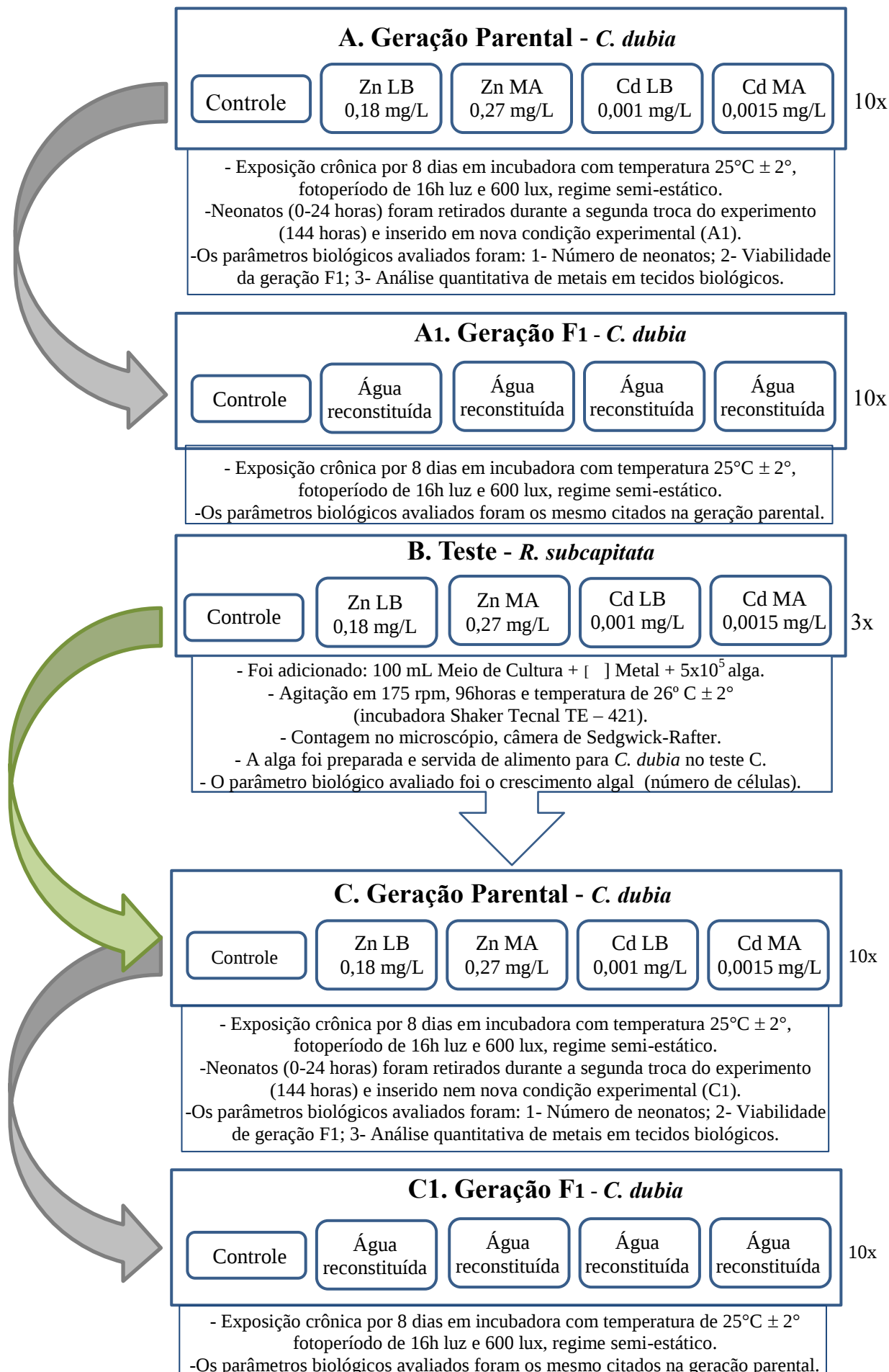


Figura 6. Desenho experimental dos ensaios ecotoxicológicos descritos nos itens A, B e C.

4.2.2 Análises Químicas

A quantificação dos metais em tecidos de *C. dubia* foi realizada baseada no método da digestão ácida, descrito por Soares (2011). Para realizar a digestão dos organismos-teste, foram utilizados 10 organismos *C. dubia* previamente lavados com EDTA para retirar o metal adsorvido, em seguida foram levados a estufa de secagem por 30 minutos. No momento da digestão, cada organismo foi dissolvido utilizando uma mistura de 150 µL de HNO₃ 65% (v/v) e 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% (v/v) por organismo, ambos de alto grau PA. A mistura permaneceu em repouso durante aproximadamente 12 horas. Seguiu-se a adição de 3000 µL de água ultrapura em cada tubo de ensaio. O preparado final foi homogeneizado e levado para as determinações dos elementos metálicos.

As concentrações de Zn foram realizadas em Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado/ICP - OES (series 720 da Agilent), seguindo o método de APHA 3111 e as de Cd em Espectrofotômetro de Absorção Atômica – Forno de Grafite/EEA - FG (Varian – 240Z), seguindo o método da EPA 29. A diferença entre equipamentos foi necessária devido aos limites de detecção do ICP – EOS não sendo possível determinar as concentrações de Cd. Todo o procedimento descrito foi também realizado controle, considerado a amostra em branco, em seguida foi feitas as análises quantitativas. Todas as análises foram feitas em parceria com o Laboratório de Química Ambiental da Unesp/Sorocaba.

4.3 Tratamento estatístico dos dados

As significâncias das comparações entre controle e contaminados foram feitas através do software Biostat 5.3, sendo realizadas as análises estatísticas com Teste de Kruskal-wallis (parâmetros reprodutivos dos tratamentos em comparação com as respostas obtidas no grupo controle) para avaliar a toxicidade crônica dos testes (AYRES et al., 2007).

4.4 Tratamento dos Resíduos

Todo resíduo gerado durante a realização da presente pesquisa foram separados em recipientes plásticos e retirado pela Comissão Resíduos da Unesp Sorocaba, posteriormente foram encaminhados para ABICAMP empresa responsável por tratamento e destinação final dos resíduos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Testes de toxicidade dos metais Cd e Zn por via de exposição aquosa com o organismo-teste *C. dubia*: Dados de reprodução dos parentais e geração F1.

Neste trabalho não ocorreram alterações nas variáveis físicas e químicas da água entre os diferentes tratamentos ao longo dos testes que pudessem invalidar os dados experimentais (ANEXO 1.A). A validação da toxicidade dos ensaios foi realizada pela constatação, no grupo controle, de taxa de sobrevivência igual ou superior a 80%, além da observação da média não inferior a 15 neonatos por organismo em todos os testes, conforme recomendações da ABNT NBR 13373 (2011).

Considerando os ensaios de toxicidade com Zn, realizados na geração parental, detectou-se toxicidade crônica por meio da redução significativa do número de neonatos em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$), em ambas as concentrações testadas, conforme figura 7. No primeiro teste, foram registrados valores médios de neonatos de 8 e 9 para Zn LB (Legislação brasileira) e Zn MA (Meio Ambiente), respectivamente, diferindo significativamente do controle, que obteve média de 17 neonatos por indivíduos adultos. No segundo teste com Zn obteve-se número médio de neonatos de 7 e 5 para Zn LB e Zn MA, respectivamente, apresentando redução ainda maior no número de neonatos em relação ao grupo controle com 18 neonatos ($p \leq 0,05$). Observou-se que o Zn, mesmo sendo um elemento essencial para os seres vivos, em concentrações acima das necessárias causou toxicidade crônica, afetando a reprodução da espécie *C. dubia*.

Para garantir a reprodutibilidade dos dados os testes foram realizados duas vezes nas mesmas condições, mas em períodos distintos, considerando a média do número de neonatos do teste I e II, a redução média da taxa reprodutiva dos organismos expostos à concentração de Zn LB foi de 57%, enquanto Zn MA reduziu 60% em relação à média do grupo controle, conforme figura 7.

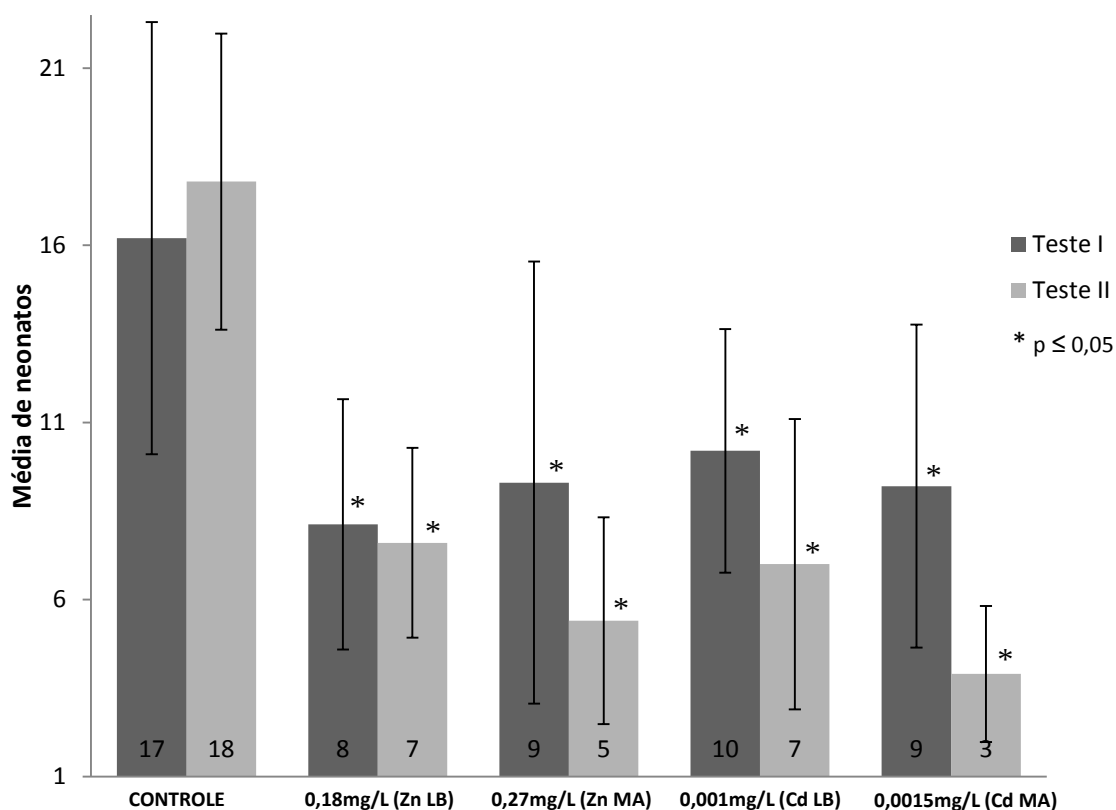


Figura 7 – Resultados de reprodução dos testes de toxicidade crônica (média de neonatos por indivíduo) na exposição da *C. dubia* (geração parental) às concentrações de metais.

Do mesmo modo, nos ensaios com as concentrações de Cd, considerando se o parâmetro reprodutivo detectou-se toxicidade significativa ($p \leq 0,05$), conforme figura 7. A média no número de neonatos foi de 10 e 9, para Cd LB e Cd MA respectivamente, durante o primeiro teste, enquanto o controle apresentou média de 17 neonatos por fêmea. No segundo teste, o número de neonatos foi de 7 e 3, para Cd LB e Cd MA, respectivamente, evidenciando redução significativa no número de neonatos em relação ao grupo controle com 18 neonatos (figura 7).

Segundo CETESB (2012), as concentrações de Cd e Zn encontradas no meio ambiente aquático estão 50% em desacordo com as concentrações permitidas pela legislação, fato que corrobora para a presente pesquisa. Tendo em vista que os testes com Cd MA (Meio Ambiente) demonstraram efeito mais agressivo, pela redução média de 65% na reprodução entre o teste I e II, enquanto no Cd LB a redução foi de 51%. De acordo com Janner (2007) o Cd está entre os produtos químicos com especial atenção para as substâncias classificadas como tóxica considerando-se os aspectos reprodutivos.

Estudos recentes relacionam à presença de contaminantes metálicos com o comprometimento na reprodução e no desenvolvimento em diversos organismos aquáticos (ZARONI et. al., 2012; HOOK et. al., 2013; CHEN et. al., 2014). Segundo Zaroni et. al.(2012), concentrações de elementos metálicos como zinco e cádmio afetam a reprodução do crustáceo estuarino *Nitokra sp*, interferindo na cadeia trófica bentônica e logo em outros compartimentos do ambiente aquático.

Muyssen e Janssen (2001) estudaram o Cladóceros *C. dubia* aclimatados em concentrações de Zn que variaram entre 0 - 100µg/L, durante o ensaio crônico observou-se que concentrações mais elevadas induziram um aumento da mortalidade e em concentrações média o número de neonatos foi considerado baixo. Em outro estudo, de acordo com Muyssen et. al., (2006), vários parâmetros fisiológicos foram analisados durante a exposição crônica de *D. magna* em concentrações de Zn dissolvidos, sendo a maior concentração 340µg/L. Organismos expostos em 170µg/L não demonstraram efeito tóxico significativo, enquanto em 250µg/L foi possível notar uma tendência de efeitos tóxico, pois o crescimento dos organismos foi significativamente afetado e a reprodução foi ligeiramente afetada. A diminuição de 37% do conteúdo de Ca foi observada, sugerindo um efeito competitivo entre Zn e Ca. A hipótese da interação de Ca, provavelmente a primeira causa para efeitos da toxicidade de zinco em *D. magna*, ainda não é bem definida, sugerindo novos estudos a respeito. Tais resultados sobre efeitos de Zn relacionados à reprodução corroboram com a presente pesquisa, apresentando diversas concentrações e efeitos significativos na taxa reprodutiva, no entanto análises sobre concentração de Ca não foram realizadas, mas a hipótese de interação competitiva entre Ca e Zn deve ser mais investigada.

Palaniappan et. al. (2010) estudaram o efeito da exposição de Zn sobre o organismo *Labeo rohita*, uma espécie de peixe de água doce comum no Sul da Ásia. Os resultados do estudo sugerem que a exposição ao zinco provoca significativas alterações nas constituições bioquímicas dos tecidos e alterações nas estruturas secundárias de proteína. Observa-se que em 7 dias aproximadamente 50% zinco absorvido é eliminado do organismo por meio de depuração natural. Esse processo biológico pode ocorrer naturalmente para

deslocar os poluentes orgânicos de um organismo. A excreção de zinco incorporado ocorre lentamente provavelmente devido à elevada afinidade para metalotioneína (MTs). As MTs são proteínas que atuam nos sistemas biológicos na regulação de concentração de elementos traços livres como Zn e como agente de detoxificação para metais como Cd. A interação das MTs com Zn e sua lenta eliminação podem justificar efeito tóxico causado para ambos os elementos.

Mesmo sabendo que não é o ideal fazermos comparações entre organismos diferentes, trabalhos relacionados à reprodução de microcrustáceos e Zn são escassos na literatura, muito provavelmente por se tratar de um elemento essencial. Sendo assim, a comparação dos efeitos desse metal se torna um tanto complexa diante da particularidade de cada espécie, da necessidade fisiológica natural desse micronutriente no organismo e da capacidade individual de responder ao estresse ambiental devido a elevadas concentrações de elementos metálicos no meio ambiente. No entanto, é evidente a ação tóxica do Zn em diversos organismos do ecossistema aquático, mesmo em concentrações relativamente baixas, como no presente estudo, quando esta excede o limite natural do corpo, podendo acarretar alterações em níveis citológico e bioquímico, comprometendo a reprodução.

Considerando-se a toxicidade do Cd, Conink et. al. (2013) observaram 44% de redução na reprodução de *D. magna* em comparação ao controle após a exposição Cd em concentração de 0,008 mg/L, dados próximos dos resultados obtidos no presente trabalho onde verificou-se redução de 51% dos neonatos em concentrações de 0,001 mg/L e 65% em 0,0015 mg/L, respectivamente.

Sofyan et. al., (2007), investigaram toxicidade sobre *C. dubia* durante 7 dias em exposição aquosa com diferentes concentrações de Cd (0, 5, 10, 20, 40 e 80 µg/L) sobre *C. dubia*. Os efeitos da toxicidade de Cd foram significativos ($p < 0.05$), vistos na redução da sobrevivência, taxa de alimentação e reprodução de *C. dubia*. As implicações na reprodução foram mais observadas em relação à alimentação, sendo esta a menos sensível durante o estudo, segundo os autores. No entanto, a inibição significativa dos neonatos foi observada na menor concentração utilizada, isto é, 5 µg/L, enquanto a redução significativa sobre as taxas de sobrevivência e alimentação foi em 10 e 20 µg/L, respectivamente. A

redução observada na alimentação devido à exposição aquosa pode ser causada por vários fatores, como os efeitos sistêmicos acontecendo internamente ou respostas comportamentais, alimentos não assimilado ou taxas de filtração reduzida (BAILLIEUL E BLUST, 1999 apud. SOFYAN et. al., 2007). No entanto mesmo que a taxa de alimentação seja considerada menos sensível, qualquer interferência nesse processo pode ocasionar outros, comprometendo então o funcionamento do sistema biológico de forma geral.

De acordo com Soetaert et. al., (2007), alterações nas vias moleculares associadas aos processos de digestão, metabolismo e desenvolvimento do embrião de dafinídeos podem ser notados quando expostos as concentrações de Cd (10, 50, 100µg/L). Os efeitos observados em concentrações mais elevadas e a exposição prolongada de Cd corroboram com a presente pesquisa, onde foi possível notar efeito mais agressivo na concentração maior de Cd. Segundo Bodar et. al., (1988) houve atraso no início da reprodução de *D. magna* em concentrações de Cd entre de 5,0 – 50,0mg/L. Outros estudos também relatam efeitos sobre o sistema digestório e locomotor, mas a hipótese de que tais efeitos podem refletir na reprodução e desenvolvimento de dafinídeos deve ser mais discutida (BODAR, et. al., 1988; SOETAERT et. al., 2007).

Efeitos conjuntos da temperatura, alimentação e Cd (0.50, 1 e 2 mg/L), sobre a taxa de crescimento em população de *D. magna* revelaram que, o aumento da população ocorria com alto nível de temperatura e alimento, mas diminuiu na presença de Cd (Heugens et. al., 2006). Biesinger e Christensen (1972), avaliaram a toxicidade de diversos metais sobre *D. magna* incluindo Cd e assim como no presente trabalho foi constatada diminuição no número de neonatos, demonstrando insuficiência reprodutiva. Logo, é perceptível que muitas concentrações de metais permitidos à sobrevivência podem prejudicar a reprodução e outras funções bioquímicas que também podem variar com a exposição a diferentes metais.

Em uma análise comparativa de *Pseudosida ramosa* (espécie de Cladocera endêmica da região Neotropical), na presença de Cd demonstrou toxicidade aguda na exposição de 0,20 mg/L, enquanto para *D. magna*, segundo Guan e Wang (2006), verificou-se toxicidade em 0,38mg/L de Cd. No entanto,

quando comparada à *C. dubia*, observou-se efeito tóxico em concentração menor que 0,04 mg/L de Cd, demonstrando que o organismo-teste *C. dubia* é espécie mais sensível quando comparada à *P. ramosa* e *D. magna* (FREITAS E ROCHA, 2006; WINNER, 2009). As concentrações utilizadas nos estudos acima são elevadas se comparadas às do presente trabalho, observando que para microcrustáceos aquático a *C. dubia* apresenta maior sensibilidade ao Cd.

Biesinger et.al. (1986), avaliaram efeitos na reprodução de *Daphnia magna* expostas às concentrações de Zn, Cd e Hg individuais e em misturas. Os resultados demonstraram que Cd não afetou significativamente a reprodução em concentrações de 0,09, 0,19, ou 0,35 µg/L; no entanto, quando Hg e Cd foram testados em conjunto houve efeitos significativos sobre a reprodução. Já a mistura de Cd-Zn quando Zn é adicionados com Cd em concentrações de 0,19 e 0,35 µg/L pode ser notar efeitos significativos sobre a reprodução, mesmo o Zn sozinho em concentração de 140,3 µg/L afetada a reprodução, assim como a mistura com todas as concentrações de Cd e Hg testado. É possível notar que a toxicidade é potencializada pela interação combinada dos metais afetando significativamente reprodução de *D. magna*. É evidente que além dos efeitos individuais que cada elemento metálico pode causar para um organismo, muitos estudos ainda devem ser realizados para compreender também os efeitos em conjunto, pois de acordo os autores, mesmo em pequenas concentrações os efeitos tóxicos podem ser potencializados.

Outro aspecto importante sobre a toxicidade dos metais para organismos aquáticos está relacionado a existência ou não de recuperação depois de interrompida a exposição dos organismos a esses tóxicos. A presente pesquisa revelou que a toxicidade crônica obtida para ambos os metais e em ambas as concentrações testadas os efeitos persistiram na geração F1, mesmo os organismos sendo mantidos em condições ambientalmente saudáveis (água de cultivo) (figura 8).

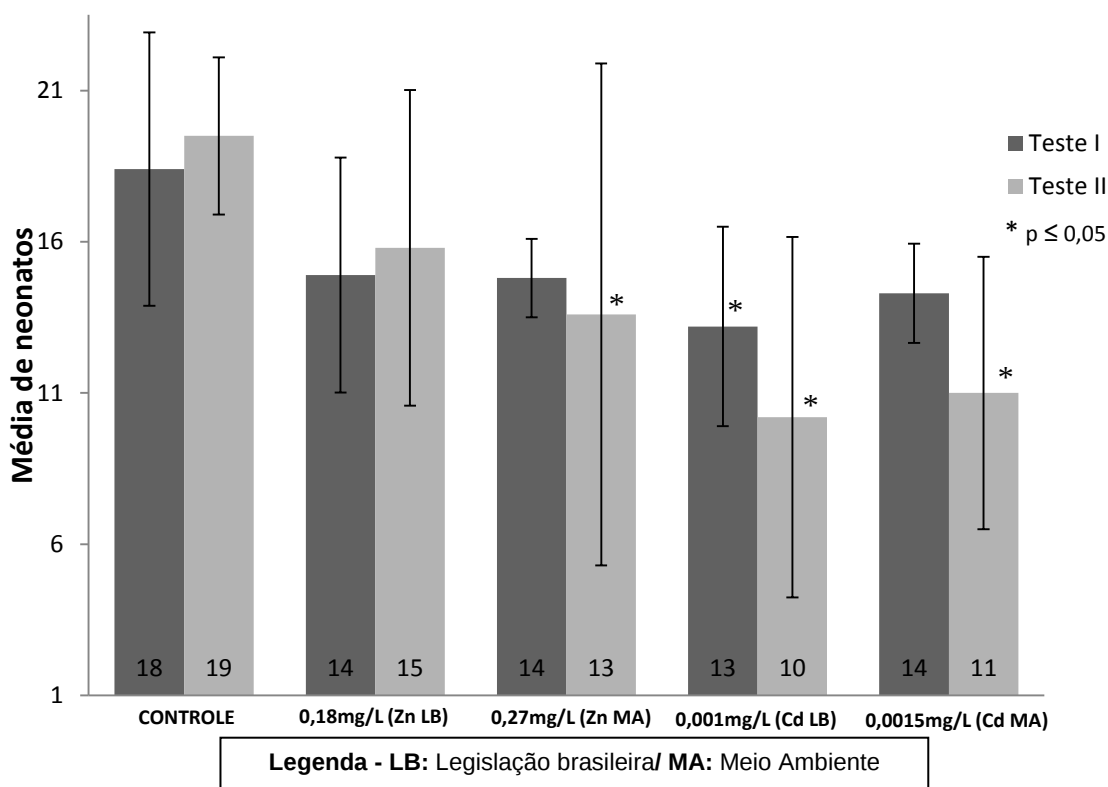


Figura 8 – Resultados de reprodução dos testes de toxicidade crônica (média de neonatos por indivíduo) da Geração F1 de *C. dubia* de pais expostos às concentrações de metais.

A exposição de parentais pode ter influenciado na taxa reprodutiva da geração F1, no entanto esta geração nascida em ambiente contaminado também permaneceu em exposição aquosa aos elementos metálicos nas primeiras horas de vida, levando a um efeito em conjunto. O resultado no primeiro teste foi de 14 neonatos tanto em Zn LB quanto Zn MA, enquanto o controle obteve em média 18 neonatos, não apresentando efeito significativo em relação ao grupo não contaminado. No segundo teste obteve-se número médio de neonatos de 15 e 13 para Zn LB e Zn MA*, respectivamente, enquanto o grupo controle registrou-se 19 neonatos por fêmeas. Considerando as médias dos testes I e II, os organismos provenientes de pais expostos ao Zn e expostos nas primeiras horas de vida apresentaram diminuição significativa da capacidade de gerar neonatos em 21,5% Zn LB e 27% Zn MA em relação ao grupo controle, conforme figura 8.

Nos organismos provenientes da exposição parental às concentrações de Cd, a média no número de neonatos foi de 13 (Cd LB)* e 14 (Cd MA), no primeiro teste, já o controle apresentou média de 18 neonatos por organismo. Durante o segundo teste a média de neonatos foi de 19 para o grupo controle, 10 e 11, para

Cd LB* e Cd MA*, respectivamente, demonstrando efeito significativo na reprodução da geração não exposta a concentrações de Cd, exceto a concentração ambiental do teste I. Estatisticamente houve diferença significativa ($p \leq 0,05$)* na maioria das concentrações de Cd, apresentando redução média no número de neonatos entre teste I e II de 35% Cd LB e 32% Cd MA (figura 8).

Os resultados demonstraram que concentrações ambientalmente representativas podem comprometer a reprodução do organismo-teste, bem como a reprodução de seus descendentes. Tais efeitos podem ter sido ocasionados pela exposição nas primeiras horas de vida somado com a exposição dos pais aos metais. Efeitos parentais e no desenvolvimento de seus descendentes expostos a elementos metálicos demonstram alterações na sobrevivência, reprodução, comportamento, fisiologia e morfologia (TSUI&WANG 2005; MARSHALL 2008).

O interesse no estudo de impactos no desenvolvimento não só observando os efeitos parentais como também em gerações não é comum, pois a maior parte avalia a exposição da geração parental e das seguintes na mesma condição, ou seja, na presença de contaminante também. Porém, informações sobre a resposta das gerações não exposta proveniente de pais e ambiente contaminado são insuficientes, mostrando a necessidade de outros ensaios com este perfil. Na União Europeia foi aprovada a lei EC 1907/2006 no encontro sobre Autorização de Substâncias Químicas (REACH), que duas gerações testes são necessárias para verificar a capacidade reprodutiva da primeira geração, depois de uma completar a vida útil, para tornar o estudo ainda mais completo. (REACH, 2006; JANNER, 2007).

De acordo com Plautz e Salice (2013), os efeitos dos parentais são influências não genóticas na descendência que ocorrem por meio de fenótipos parentais ou ambientais, pois o processo de desenvolvimento ocorre durante o crescimento à resposta aos estímulos ambientais. Os autores destacam que a exposição aos tóxicos ambientais durante o desenvolvimento podem, em alguns casos, ter um forte efeito tóxico subsequente sobre a geração de exposições parentais. Os efeitos parentais podem alterar a resposta biológica da geração, demonstrando a importância na compreensão de como os descendentes vão

responder aos contaminantes químicos e como será seu desenvolvimento a não exposição.

Nos estudos de entre gerações com concentrações de Cd e Zn verificaram-se correlações significativas ($p < 0,5$) negativas entre as gerações de microinvertebrados aquáticos. Organismos cladóceros da espécie *Daphnia magna*, em testes de gerações Zn demonstraram que o aumento na concentração (800 µg/L) levou a redução da tolerância crônica, resultando em diminuições na sobrevivência e reprodução (Muyssen e Janssen, 2001). Um estudo semelhante com concentrações entre 0 e 250 µg/L de Cd, verificou-se que os organismos apresentaram taxas de reprodução baixas e alta mortalidade nas concentrações maiores (Muyssen e Janssen, 2004). Os autores afirmam que estudos de gerações são importantes para a avaliação dos efeitos em longo prazo de poluentes no ambiente aquático (Muyssen e Janssen, 2001 e 2004).

Os efeitos de metais potencialmente tóxicos são evidentes em todos os níveis aquáticos tanto na geração parental quanto nas gerações seguintes apresentando diversas implicações no desenvolvimento e na reprodução. No entanto, estudos sobre a resposta das gerações F1 provenientes de pais expostos, porém não exposta, são escassos e esses dados são relevantes para avaliar a capacidade de recuperação biológica simulando um ambiente saudável e visando a perpetuação das espécies.

Considerando a capacidade de organismos provenientes de ambientes contaminados de se recuperarem. Observou-se que cladóceros expostos a concentrações de metais podem apresentar recuperação quando o ambiente se torna favorável (Mangas-Ramirez, 2004). No entanto, poucos trabalhos possuem esse enfoque. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os do referido autor, quando analisamos a relação entre a geração parental exposta e a geração F1 proveniente, pois é possível perceber que houve uma melhora significativa em relação ao número médio de neonatos após a inserção dos organismos em condição favorável, neste caso livre de contaminante metálico. Essa informação pode ser observada na figura 9, sendo apresentado pela sobreposição dos gráficos 7 e 8, que estão relacionados aos dados reprodutivos da parental e geração F1 (em destaque com borda vermelha).

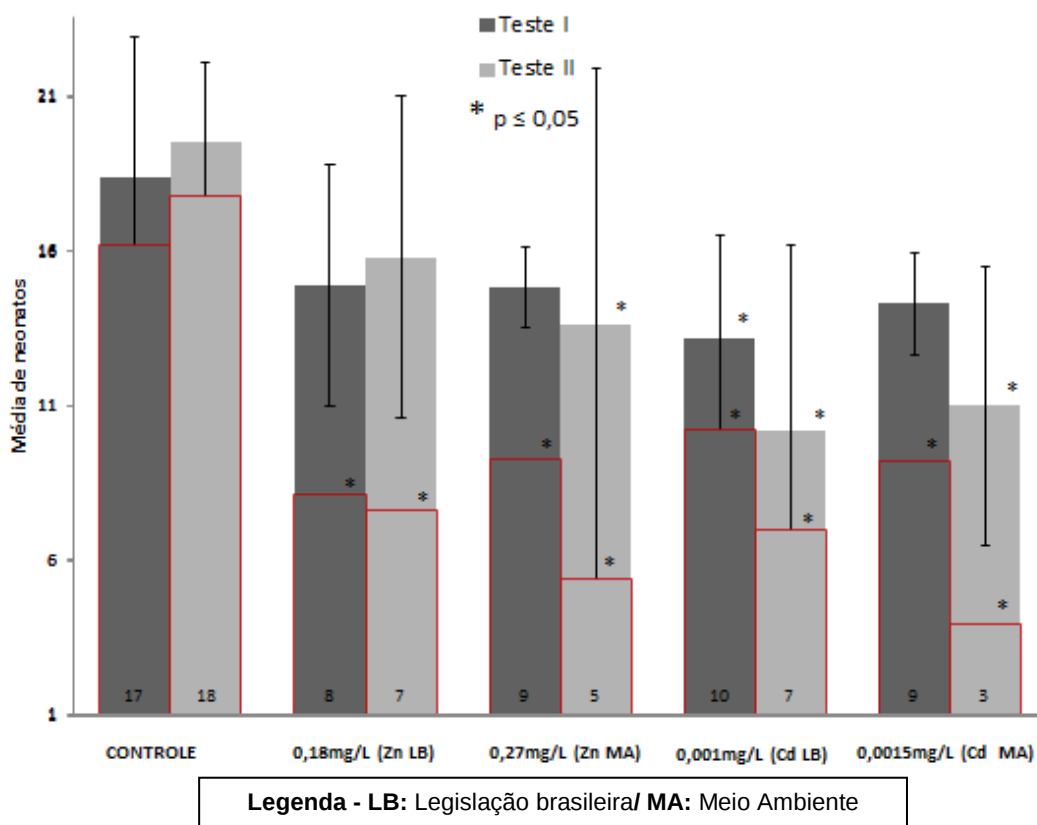


FIGURA 9: Dados de reprodução, com sobreposição dos gráficos 8 e 9. Apresenta o efeito significativo $*(p \leq 0,05)$ na redução do número de neonatos da geração parental (com borda vermelha) em relação à geração F1.

Nos ensaios com organismos provenientes de adultas expostas ao Zn, geração F1, observou-se um aumento no número de neonatos correspondente a 55,5% na concentração Zn LB e 30% na condição de exposição parental ao Zn MA, em comparação ao número de neonatos detectados na geração parental. Tal condição de aumento no número de neonatos da geração F1, proveniente de pais expostos ao cádmio também foi observado, com valores de 55% Cd LB e 75% Cd MA acima das porcentagens de neonatos obtidos na geração parental. Os resultados demonstram a viabilidade na geração seguinte, quando não exposta em contaminante, possibilitando uma chance maior de se recuperar e prosseguir gerando descendentes.

Diante de tais afirmações e dos resultados do presente estudo, verifica-se que Zn e Cd causaram toxicidade crônica para a espécie *C. dubia*, comprometendo a reprodução da geração parental e refletindo sobre a geração seguinte.

B. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn com o organismo-teste *R. subcapitata*: Dados de crescimento.

O impacto dos metais em ambientes aquáticos é usualmente determinado através de testes de toxicidade utilizando invertebrados ou peixes, no entanto, o conhecimento da toxicidade em diferentes níveis tróficos é muito importante para poder mensurar a magnitude dos riscos para o meio ambiente. O interesse crescente na aplicação de algas na realização de testes toxicológicos tem sido evidenciado devido à rapidez e simplicidade com que os testes podem ser executados e, ainda, devido ao seu baixo custo. O efeito de inibição resultante sobre a população de algas pode ser observado após um intervalo de tempo pré-estabelecido (geralmente entre 3 e 4 dias), e é determinado comparando-se o crescimento observado na presença de agente tóxico com o crescimento normal observado em uma solução livre de agente tóxico (BRITTO, 2011).

Os testes de toxicidade com a alga *R. subcapitata* exposta a concentrações de Zn e Cd não apresentaram inibição no crescimento de células para essas concentrações testadas, em relação ao número de células obtidas na condição controle (Figura 10). Para garantir a reprodutibilidade dos dados os testes foram realizados duas vezes nas mesmas condições, mas em períodos diferentes, então serão apresentadas médias entre I e II de cada concentração. Considerando-se os dados brutos observou-se uma redução no número de células de cada tratamento do metal Zn em relação ao grupo controle. A redução média foi de 11% Zn LB e 3,5% Zn MA, o que não foi suficiente para atestar a toxicidade desse metal nas concentrações estudadas.

Em relação à exposição às concentrações de Cd, observou-se um tênue aumento no número de células correspondentes a 4,5% Cd LB, enquanto em Cd MA apresentou redução média de 4%, conforme figura 10.

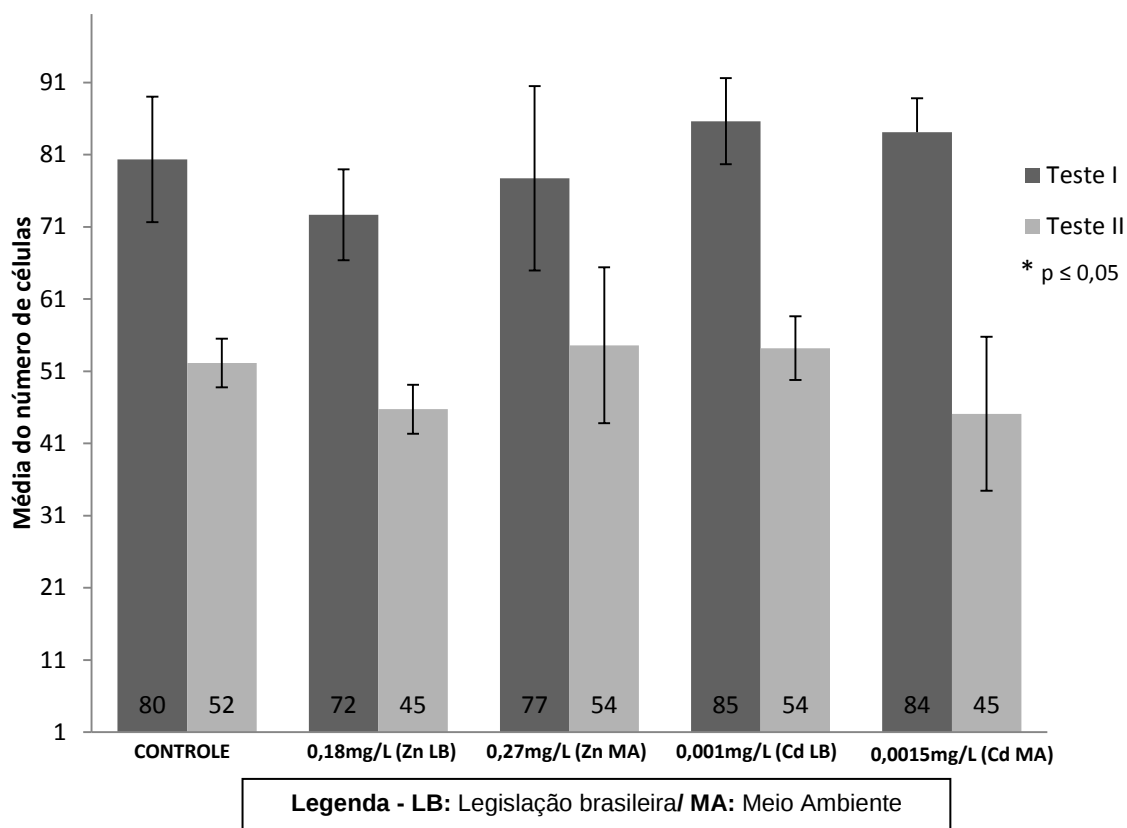


Figura 10 – Resultados dos testes de toxicidade crônica (média da contagem do número de células) de *R. subcapitata* expostas às concentrações de metais.

De acordo com Taylor (1998), algas de água doce, como todas as partículas em suspensão na coluna de água, apresentam uma carga negativa líquida resultando em uma afinidade para as espécies carregadas positivamente, assim como os metais tóxicos, o que será imediatamente adsorvido a superfícies de células de algas. Desta maneira, a capacidade de interação da alga com contaminantes metálicos é relativamente rápida, porém, devido às concentrações baixas utilizadas no presente estudo tais interações não foram possíveis de serem visualizadas.

Segundo Britto (2011), na ausência de metais, a alga *R. subcapitata* cresceu exponencialmente durante cerca de 3 dias, na presença de baixa concentração de Cd (150 nmol/L, o que corresponde a 17 µg/L), não provocando qualquer efeito sobre o crescimento. Para esta concentração de metal o número de células ao fim de 72h foi idêntico ao do controle (na ausência de metal), enquanto na exposição de Zn (300 nmol, o que corresponde a 20 µg/L) ao meio de cultura também não provocou efeito significativo sobre o crescimento da alga.

Com esta concentração de metal, o número de células ao fim de 72h sofreu uma pequena variação em relação ao do controle, mantendo-se similar na presença ou ausência de metal. Neste ensaio as concentrações utilizadas são extremamente baixas, sendo que as concentrações de Zn testadas por Britto (2011) foram 9 vezes menores que as concentrações utilizadas, enquanto as concentração de cádmio foram mais de 50 vezes menores em relação à concentração do presente estudo, não apresentando qualquer efeito tóxico.

As concentrações utilizadas por Britto (op. cit.) são extremamente baixas, não apresentando efeito na média de crescimento algal, assim como no presente estudo. Os dados apontam que a alga *R. subcapitata* apresenta tolerância a exposição de Zn e Cd em concentrações consideradas baixas (ppb). Algumas espécies podem amenizar ou impedir o efeito tóxico, quando o metal está no interior da célula, devido ao mecanismo natural de detoxificação de compostos metálicos. Este mecanismo é regulado pelas proteínas Metalotioneínas (MTs), que atuam na regulação de metais essenciais como zinco e a detoxificação de metais tóxicos como cádmio. Já foram identificadas em espécies de algas como a *C. vulgaris* sendo induzida na presença de Zn e/ou Cd, no entanto quando a concentração do metal ultrapassa os limites naturais do sistema metabólico, a capacidade da alga de responder a estes metais é inibida, iniciando o processo de toxicidade e bioacumulação (RAND&PETROCELLI, 2004).

Em ensaios com sulfato de cobre a partir de diluições da concentração 2,0 mg/L, foi possível observar que ocorreu diferença estatística no crescimento algal entre o controle e todas as diluições. O CuSO_4 mesmo na menor concentração, 3,1% (0,062 mg/L), não foi suficiente para diminuir a toxicidade do cobre para a alga *R. subcapitata*, causando inibição no crescimento das algas (CARVALHO, 2009). Tais dados demonstram toxicidade sobre algas quando expostas à elementos metálicos, no entanto nas concentrações propostas pelo presente trabalho não houve efeito tóxico, talvez pela solução teste possuir concentrações pequenas de zinco e cádmio. A taxa de crescimento das algas *R. subcapitata* também foi avaliada durante bioensaio de 96h de exposição à concentrações variadas de Cd (0,06, 0,15, 0,29, 0,68 e 1,29 mmol/L) e Cr (1,82, 3,57, 7,36, 14,9 e 27,4 mmol/L). Ao término do ensaio observou-se que mesmo em concentrações

extremamente baixas o Cádmio foi considerado mais tóxico que cromo (RODGHER et. al., 2012).

Embora efeitos significativos sobre a alga neste experimento não tenham sido identificados, outros efeitos não observados a olho nu, como efeitos moleculares, químicos, tamanho celular foram citados em outros trabalhos quando a *R. subcapitata* é exposta a diversos metais.

C. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn por vias de exposição aquosa e alimentar com o organismo-teste *C. dubia*: Dados de reprodução dos parentais expostos e geração F1.

Durante o teste de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia* houve a exposição simultânea dos organismos às soluções-teste de metais e alimento natural previamente contaminado com os metais Cd e Zn nas condições descritas no item C do desenho experimental. Para os parâmetros reprodutivos houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos da geração parental, conforme Figura 11. Comparando-se a média de neonatos do grupo controle com os demais tratamentos obteve-se uma redução de 32% para Zn LB e 32% para o Zn MA 45% para o Cd LB e 36% para o Cd MA.

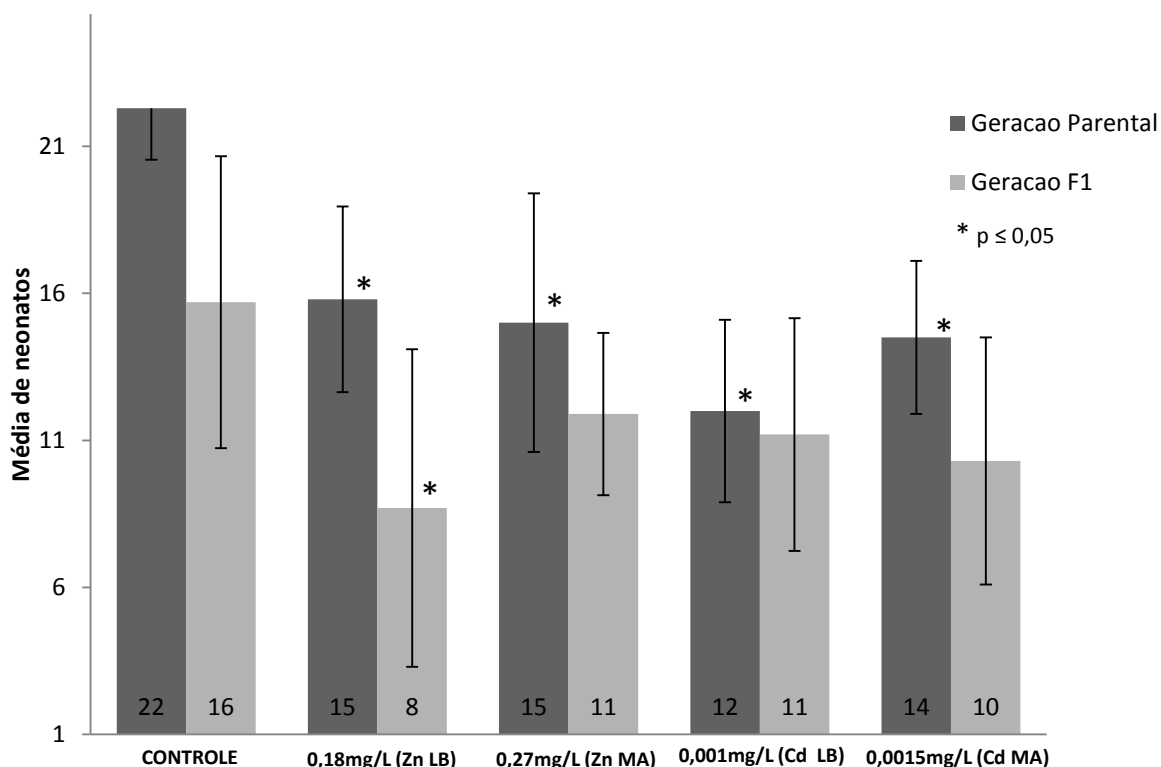


Figura 11 – Resultados de reprodução dos testes de toxicidade crônica de *C. dubia* na exposição de metais por via aquosa e alimentar, geração parental e geração F1.

Segundo Zagatto (2006) a toxicidade por metais nos ambientes aquáticos se deve ao fato de que, na maioria das vezes, ocorre a partir da exposição crônica, ou seja, em baixas concentrações por período de tempo prolongado. Eventos agudos podem causar maior transtorno para os organismos afetados, mas são raros. Por isso a importância de se conhecer os efeitos a partir da exposição em diferentes níveis na cadeia trófica em concentrações baixas e representativas para o meio ambiente, para poder ter uma visão completa do efeito dos contaminantes metálicos no ecossistema aquático. No entanto, muitos testes ecotoxicológicos, de forma geral, consideram apenas a exposição do metal na fase aquosa, sem considerar a importância relativa da captação dietética e da toxicidade nos organismos (MEYER et. al., 2005).

Taylor et. al., (1998) realizou um estudo de toxicidade semelhante ao da presente pesquisa, onde expôs *Chlorella vulgaris* a um gradiente de concentrações de Cd entre 0,1 e 1.000 mg/L para avaliar os efeitos da exposição alimentar com *Daphnia magna*. O autor concluiu que a ingestão das algas contaminadas levou à redução do crescimento e da reprodução de *D. magna*. Na presente pesquisa com duas vias de exposição, sendo aquosa e a alimentar,

simulando uma situação real, também pôde-se observar o efeito deletério do Cd sobre a reprodução de *C. dubia*.

De Schamphelaere et al. (2004) fazem crítica sobre a pouca atenção que tem sido dirigida para a toxicidade alimentar por metais para invertebrados de água doce. Sendo assim, apresentaram um estudo sobre a toxicidade crônica de Zn na dieta para *D. magna*, e obtiveram como resultado uma redução significativa de 40% do total de reprodução dos organismos alimentados com algas expostas às concentrações de 28 e 61 µg/L. Sofyan et. al. (2007) também observaram efeitos significativos sobre a sobrevivência, taxa de alimentação e reprodução de *C. dubia* após exposição crônica de água e alimento contaminados em diferentes concentrações de Cd (5, 10, 20, 40 e 80 µg/L), sendo que observaram efeito tóxico significativo na reprodução de *C. dubia*, apesar de que em concentrações mais elevadas (no mínimo 5x) do que no presente estudo, corroborando com a presente pesquisa apresentando efeito não inibitório em concentrações consideradas baixas.

A exposição de *D. magna* a 0.5, 1, 2, 4 e 10 µg/L de Cd através da abordagem integrada via alimento e contato direto com água contaminada foi avaliado por Barata et. al., (2002). Os autores demonstraram que a acumulação de Cd no organismo-teste foi duas vezes maior por exposição à água do que na ingestão de algas contaminadas. Também evidenciou-se que os efeitos deletérios na taxa de reprodução foram mais evidentes na exposição apenas de água comparados com a exposição simultânea de alga e água. Na presente pesquisa à exposição simultânea (aquosa e alimentar) também revelaram toxicidade menor quando comparados geração parental de *C. dubia* exposta via aquosa e alimento não contaminado dos primeiros testes, com a geração parental exposta via aquosa mais alimento contaminado com concentrações dos metais Zn e Cd (segundo teste), ambos considerando-se os aspectos reprodutivos, conforme figura 12.

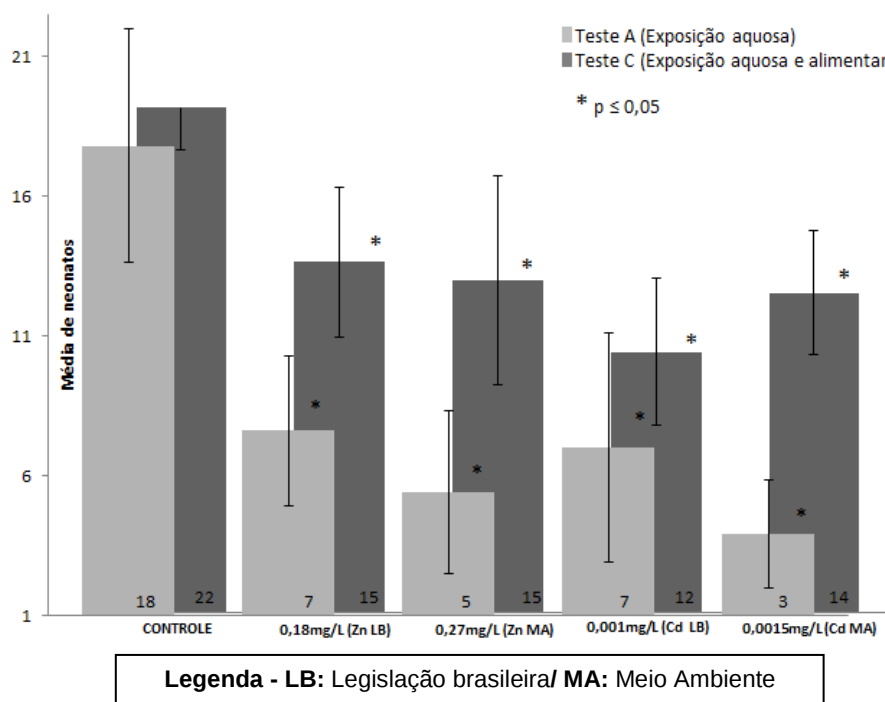


Figura 12 – Dados de reprodução geração parental *C. dubia* dos gráficos 7 e 11. Apresentando a diferença significativa na redução do número de neonatos expostos apenas por via aquosa em relação à exposição aquosa e alimentar.

Rodgher e Espíndola (2008), verificaram a diminuição da sobrevivência e do número de neonatos pela exposição de *C. dubia* ao alimento com diferentes densidades da alga *P. subcapitata* (atual *R. subcaptata*) expostas na fase de crescimento exponencial à níveis de Cd dissolvidos em concentrações (0, 0.60, 1.40, 2.70×10^{-7}). As concentrações de Cd dissolvidos utilizados nos testes de toxicidade crônica com zooplâncton foram 0, 0,11, 0,19, 0,44, 0,87, $1,78 \times 10^{-7}$ e alimentados com 1×10^4 células/mL, 1×10^5 células/mL e 1×10^6 células/mL. Segundo os autores as algas são uma importante via de exposição ao metal e diferentes densidades algais tem considerável influência sobre a toxicidade de metais para dafinídeos.

Em outro estudo experimental Rodgher e Espíndola (2007), observaram efeitos tóxicos significativos na sobrevivência e reprodução de *C. dubia* quando exposta à 8,73, 18,22 e 34,04 mg/L Cr e alimentada com diferentes densidades algais contaminada (concentrações entre 94 a 774 mg/L Cr). Foi possível observar que a qualidade e quantidade do alimento são fatores significativos na toxicidade aos dafinídeos. Apesar de no presente estudo não ser possível afirmar

que a alimentação desencadeou a toxicidade, possivelmente contribuiu para os efeitos deletérios observados. Tais dados corroboram com a presente pesquisa, onde os organismos foram expostos por multivias de contaminação, mesmo sendo com metais diferentes é possível observar efeitos reprodutivos negativos em microcrustáceos de água doce.

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

Na presente pesquisa, considerando-se o teste da geração F1 (neonatos provenientes de pais expostos aos metais por via aquosa e alimentar simultaneamente), neonatos foram introduzidos em meio livre de contaminante, e alimentados com alga pura não contaminada. Foi possível observar que os neonatos não se reproduziram como no grupo controle e a exposição da geração parental interferiu na taxa de reprodução da geração F1, uma vez que se registrou a redução no número de neonatos, em relação ao número de neonatos obtido na condição controle, em 47%, 27%, 27% e 33% quando a geração F1 foi proveniente de pais expostos aos Zn LB, Zn MA, Cd LB e Cd MA, respectivamente (figura 11). Essa redução no número de neonatos da geração F1 mostra que a atuação do Zn e Cd podem comprometer as gerações seguintes, pois seus descendentes mesmo livres de contaminantes não apresentaram recuperação biológica entre as gerações. No entanto a exposição dos organismos nas primeiras horas de vida pode ter contribuído também na redução de neonatos da geração F1.

A recuperação dos organismos parece estar diretamente relacionada aos mecanismos de regulação de metais essenciais e não-essenciais encontrados em invertebrados de modo geral (RAINBOW, 2002). A tolerância ou a resistência à toxicidade por metais é realizada através da especiação dentro da célula. O sequestro por ligantes celulares tais como as metalotioneínas e acúmulo em

organelas específicas são estratégias comuns adotadas pelos invertebrados (WALLACE et. al., 2003).

A possibilidade de regulação da concentração de metais nos organismos é considerada efetiva apenas para os metais essenciais como Zn e Cu (De SCHAMPHELAERE et. al., 2004; 2007). Outros estudos demonstram a capacidade de controle dos efeitos tóxicos, mesmo para metais não-essenciais, como Cd (RAINBOW, 2002). No entanto a existência de recuperação de organismos expostos a metais é pouco conhecida pela literatura. Diante de tais fatos visto que este é um dos primeiros trabalhos de recuperação realizado entre gerações, sugere-se que novos ensaios sejam feitos para embasar melhor a discussão desses dados.

D. Análises químicas da concentração de metal em tecido biológico de *C. dubia* em testes de toxicidade com os metais Cd e Zn.

As análises químicas das amostras de tecido biológico digeridos para quantificação de metais incorporados no organismo demonstraram que nas amostras analisadas os valores dos metais Zn e Cd encontraram-se bem abaixo das concentrações iniciais em que os organismos foram expostos. Sendo assim, as concentrações detectadas pelos aparelhos foram irrelevantes não constatando bioconcentração dos elementos metálicos pelo método nos testes de toxicidade com organismo *C. dubia* na etapa A e C, conforme tabela 5 e 6.

Tabela 5. Resultados das análises químicas do teste de toxicidade com o organismo-teste *C. dubia* (parentais e geração F1) por via de exposição aquosa.

Concentração de metais em tecido biológico (µg/L)					
	[] teste	1º Teste	2º Teste	3º teste	Média
Zn LB	180 µg/L	21.44	27.05	22.31	23.60 ± 4.30
Zn MA	270 µg/L	23.96	22.52	26.40	24.29 ± 2.25
Cd LB	1 µg/L	0.63	0.223	0.097	0.32 ± 0.001
Cd MA	1.5 µg/L	0.733	0.704	0.709	0.72 ± 0.001
Zn LB F1	-	28.15	33.11	34.80	32.02 ± 0.41
Zn MA F1	-	28.04	28.95	24.10	27.03 ± 0.72
Cd LB F1	-	0.529	0.211	0.062	0.27 ± 0.001
Cd MA F1	-	0.559	0.441	0.063	0.35 ± 0.001

Tabela 6. Resultados das análises químicas dos testes de toxicidade com *C. dubia* (parentais e geração F1) por via de exposição aquosa e alimentar.

Concentração de metais em tecido biológico (µg/L)				
	[] Teste	1º Teste	2º Teste	Média
Zn LB	180 µg/L	28.98	23.45	26.22 ± 1.4
Zn MA	270 µg/L	23.26	33.36	28.31 ± 4.87
Cd LB	1 µg /L	0.028	0.041	0.03 ± 0
Cd MA	1.5 µg/L	0.041	0.028	0.03 ± 0

Zn LB F1	-	25.78	22.46	24.12 ± 4.11
Zn MA F1	-	27.91	25.50	26.70 ± 3.10
Cd LB F1	-	0.37	0.096	0.23 ± 0
Cd MA F1	-	0.39	0.58	0.49 ± 0

Segundo Castro et. al. (2008), a concentração de contaminantes é o processo pelo qual uma substância química é absorvida do ambiente aquático para os tecidos biológicos. Essa exposição ao contaminante pode ser por meio das áreas dérmicas e respiratórias do organismo e segundo a autora a dieta alimentar não é inclusa como proposto pelo item C na parte experimental da pesquisa. Já Sofyan et. al. (2007) apresentam dados indicando que o cádmio foi acumulado tanto através da exposição de água quanto através da dieta sobre *C. dubia*, afetando a alimentação e produção de neonatos. Além disso, observou-se transferência de Cd na cadeia trófica entre os produtores primários (*R. subcapitata*) e consumidores primários (*C. dubia*), indicando a importância de estudos sobre multivias de exposições como as fontes de captação e toxicidade do metal, além dos ensaios tradicionais apenas por via aquática. No entanto, para avaliação de bioconcentração fatores como concentração e tempo de exposição são relevantes. Neste caso, as concentrações utilizadas foram consideradas extremamente baixas, sendo alguns valores encontrados abaixo do limite de detecção dos aparelhos, deste modo para tal avaliação sugere-se que novas concentrações sejam testadas, assim como também o tempo de exposição.

Algumas metodologias de digestão ácida com microcrustáceos sugerem de 0,5 ou 1 grama da amostra seca de massa corporal, porém, para obtenção dessa quantidade de massa seca seriam necessários milhares de organismos para cada

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

Soares (2012) realizou e validou a metodologia com larvas de invertebrados bentônicos, no entanto, devido ao tamanho do organismo e as concentrações dos contaminantes serem extremamente baixas, o processo de digestão dos organismos e análise quantitativa de metal incorporado pode levar a erros na realização desta etapa da pesquisa, sendo essencial a escolha da metodologia mais adequada para o organismo-teste.

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

6 CONCLUSÕES

Nas concentrações testadas de Zn e Cd para *R. subcaptata* não houve inibição no crescimento, enquanto para *C. dubia* nas concentrações testadas para ambos os metais evidenciou-se a toxicidade crônica pela redução na taxa reprodutiva. Tanto nos experimentos com a geração parental quanto com a geração F1, que permaneceu em condição livre de contaminante metálico, houve efeito significativo na média neonatal quando comparada à média obtida no grupo controle. No entanto, os organismos provenientes de exposição parental e exposição temporária aos metais na etapa A do desenho experimental apresentaram aumento no percentual de reprodução quando comparado com a geração parental, demonstrando possibilidade de recuperação e condições biológicas viáveis quando não exposta a contaminantes metálicos.

A geração F1 dos experimentos do item C, em que os organismos provenientes de pais expostos por via dupla, também foram expostos por curto período de tempo em condições semelhantes aos pais, apresentaram dificuldade em demonstrar viabilidade e recuperação. Embora não haja contradições sobre o potencial tóxico dos metais na dieta de organismos aquáticos, há evidências crescentes de que a exposição do metal na dieta pode provocar efeitos adversos tanto para organismos expostos, quanto para sua geração.

As análises químicas demonstraram valores dos metais Zn e Cd bem abaixo das concentrações iniciais em que os organismos foram expostos, sendo assim, não houve bioconcentração dos elementos metálicos em *C. dubia* para as concentrações testadas que pudessem ser significativas, sendo necessárias análises mais aprofundadas com outras metodologias.

A toxicidade crônica de metais Zn e Cd para invertebrados de água doce influencia diretamente na taxa de reprodução, reduzindo significativamente o número de neonatos, comprometendo assim a espécie estudada, e logo o ecossistema aquático como um todo. Podemos concluir que mesmo em baixas concentrações (tanto de Zn quanto Cd) podem comprometer a biota aquática, então faz-se necessária a revisão dos atuais padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando que a existência de recuperação de organismos expostos a metais é pouco conhecida pela literatura, sendo este um dos primeiros trabalhos entre gerações, onde a geração seguinte é mantida em condição diferente, livre de contaminante, sugere-se que análises mais aprofundadas sejam realizadas, expondo mais do que uma geração e outras concentrações de elementos metálicos, para embasar melhor a discussão desses dados ampliando o conhecimento sobre as possibilidade de recuperação biológica e permitindo compreender mais sobre o comportamento dessas substâncias no organismo.

8 BIBLIOGRAFIA

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13.373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera), Rio de Janeiro, 2011.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12.648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), Rio de Janeiro, 2011.

ADAMS, W. J. Aquatic Toxicology Testing Methods. In: Hoffman, D. J. et. el. *Handbook Of Ecotoxicology*. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995. P. 25-46.

AMADO-FILHO et al. Heavy metals in benthic organisms from Todos os Santos Bay, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 68(1): 95-100, 2008.

ARAGÃO, M.A; ARAÚJO, R.P.A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, Pedro A.; *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Carlos: Editora Rima, 2008.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A. A. *Bioestat 5.0 Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: IDSM, 2007.

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

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

BERRYMAN, A.A. Population: a central concept for ecology? *Oikos* v. 97, p.439-442, 2002.

BIELMYER, G.K., GROSELL, M., BRIX, K.V. Toxicity of silver, zinc, copper, and nickel to the copepod *Acartia tonsa* exposed via a phytoplankton diet. *Aquatic Toxicology Environ. Sci. Technol*, 2006.

BIESINGER, K.E.; CHRISTENSEN, G. M. Effects of Various Metals on Survival, Growth, Reproduction, and Metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1972.

BIESINGER, K. E., CHRISTENSEN, G. M., FIANDT, J. T. Effects of metal salt mixture on *Daphnia magna* reproduction. *Ecotox Envir. Safety* 11, p.9-14, 1986.

BILA, M.D.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no Ambiente: Efeitos e Consequências. *Revisão. Quim. Nova*, v. 30, 2007.

BODAR, C.W.M.; Der Sluis, I. V.; Voogt, P.A.; Zandee; D.I. Effects of cadmium on consumption, assimilation and biochemical parameters of *Daphnia magna*: possible implications for reproduction. *Comp. Biochemistry and Physiology* v. 90, Issue 2, p. 341-346, 1988.

BORGMAN, C. L. From Gutenberg to the Global Information Infrastructure: Access to Information in the Networked World. London: MIT Press, 2003.

BRITTO, N. R. B., Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, Programa de Pós-graduação em tecnologias de engenharia ambiental. ISEP, 2011.

CAMPBELL, C.; BORGLIN, E.; STRINGFELLOW, W.T.; GREEN, B.; GRAYSON, A. Review of Bioassays for monitoring Fate and Transport of Estrogenic Endocrine Disrupting, Compounds in Water. Lawrence Berkeley National Laboratory, 2004.

CARVALHO, S.C. Toxicidade do sulfato de cobre para a tilápia *Oreochromis niloticus* e teste ecotoxicológico com *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CARVALHO, M. M.; FRACÁCIO, R. Interferentes endócrinos no meio ambiente comprometendo a saúde humana e ambiental. XIII EPG – Encontro Latino Americano de Pós Graduação. UNIVAP – São José dos Campos, 2013.

CASTRO, A.M., CASTILHOS, Z.C., RAMOS, A.S., LIMA, C.S., RODRIGUES, P.C. Avaliação do risco à Saúde Humana: Conceitos e Metodologia. Serie de Estudos e documentos n.65. Ed. Centro de Tecnologia Mineral, Ministério da Ciência de Tecnologia, 2005.

CASTRO, C. R. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova, Vol. 31, No. 7, 1820-1830, 2008.

CESTESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de Qualidade das águas superficiais do Estado de SP. Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB, 2012.

CHEN, C. FOLT, C. Bioaccumulation and Diminution of Arsenic and Lead in a Freshwater Food. 2010.

CHEN, T. H.; LIN, C. C.; MENG, P. J. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of Hazardous Materials. v. 277, p. 34–140, 2014.

CHEN, Y. Y.; ZHU, J. Y.; CHAN, K. M. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. Aquatic Toxicology. v. 157. p. 196 – 206. 2014.

CONDESSA, S.S. Toxicidade subcônica em lambaris *Astyanax aff. Bimacullatus* Exposto ao Zinco. Dissertação. Minas Gerais, 2009.

CONAMA: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução 357 – 17 de março de 2005.

CONINK. D.I, JANSSEN, C.R., DE SCHAMPHELAERE, K.A. An investigation of the inter-clonal variation of the interactive effects of cadmium and Microcystis

aeruginosa on the reproductive performance of *Daphnia magna*, Aquatic Toxicology, 2013.

COSTA, R. C.; OLIVI, P.; BROTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova vol. 31 no. 7, São Paulo, 2008.

CUNHA, S.R.; PAZETO, F.D.; CRESTANI, D.E.V.; LIMA, G.B.; NASCIMENTO, J.; SANT'ANNA, F.; MANZONI, G.C.; MARENZI, A. W. C. & MAFRA Jr., L.L. Potencial de crescimento de macroalgas cultiváveis presentes na enseada de armação itapocoroy. NOTAS TÉCN. FACIMAR, 3: 17-25, 2010.

DAMSTRA, T. Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. Clin Toxicol. 2002.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., CANLI, M., VAN LIERDE, V., FORREZ, I., VANHAECKE, F., JANSSEN, C.R., Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 233–244p. 2004.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., FORREZ, I., DIERCKENS, K., SORGELOOS, P., JANSSEN, C.R., Chronic toxicity of dietary copper to *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 409–418p. 2007.

DORNFELD, C.B. Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

EVENS, R., SCHAMPHELAERE, K. A.C., JANSSEN, C. R. The effects of dietary nickel exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, p.138–144, 2009.

EPA – ENVIRONMENTAL AGENCY PROTECTION. Test Method 29: DETERMINATION OF METALS EMISSIONS FROM STATIONARY SOURCES - Test Methods in water.

FERREIRA, C.P. Bioquímica Básica. Ed. 5. (rev. e ampl), São Paulo: MNP, p.453, 2003.

FREITAS, E.; ROCHA, O. Toxicidade aguda do cloreto de cádmio ao cladóceros *Pseudosida ramosa* Daday, São Carlos, 2006.

FUCHSMAN, P.C; BARBER, T.R. Spiked sediment toxicity testing of hydrofobicorganic chemicals: bioavailability, technical considerations, and applications. Soil and Sediment Contamination, p.197-218, 2000.

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

HEUGENS ET. AL., Population growth of *daphnia magna* under multiple stress conditions: joint effects of temperature, food, and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 5, p.1399–1407, 2006.

HOFFMAN, D.J. Wildlife toxicity testing. In: Hoffman *et. al.* Handbook of Ecotoxicology. Washington: CRC Press LLC. 2a. ed., Cap.4, 2003.

HOOK, S.E., FISHER, N.S. Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* p.568–574, 2001.

HOOK, S.E., FISHER, N.S. Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. *Mar. Biol.* 138, p.1131–1140, 2013.

HUTCHINSON, T.H. Small is useful in endocrine disrupter assessment—four key recommendations for aquatic invertebrate research. *Ecotoxicology - Springer Science*, 2007.

ICHME – International Conference on the heavy metals in the environment. Heavy metals in the environment - proceedings. Third International Conference on the Heavy Metals in the Environment, Amsterdam, 1981.

KALAY, M.; ERDEM, C. Effect of cadmium accumulation on total protein levels in *Tilapia nilotica*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, Ankara, Turkey, 2003.

JANNER, G.; HAKKERT, B. C. THEO VERMEIRE, W.S., PIERSMA, A. H. A retrospective analysis of the two-generation study: What is the added value of the second generation? *Reproductive Toxicology*, v.24, p.97–102, 2007.

JESUS, T. B; CARVALHO, C. E. V; São relatadas alterações no sistema reprodutivo em populações de espécies de peixes e outros microinvertebrados. *Oecol. Bras.* 12(4): 680-693. Rio de Janeiro, 2008.

KHAN, R.; ISRAILI, S.H.; AHMAD, H.; MOHAN, A. Heavy Metal Pollution Assessment in Surface Water Bodies and its Suitability for Irrigation around the Neyveli Lignite Mines and Associated Industrial Complex, Tamil Nadu, India. *Mine Water and the Environment* v. 24, p.155–161. 2005

LAWSON, N.M., MASON, R.P. Accumulation of mercury in estuarine food chains, *Biogeochemistry*, p. 235. 1998.

LAVICOLI, I.; FONTANA, L.; BERGAMASCHI, A. The effects of metals as endocrine disruptors. *Toxicol Environ Health B Crit Rev* 12:206–223, 2009.

LEEWEN, C.J.V; VERMEIRE, T.; VERMEIRE, T.G. *Risk Assessment of chemicals. An Introduction.* Springer, 2a. ed. 686p. (2007). < <http://books.google.com.br>>. Acesso: 01/09/2013.

LINS, J. A. P.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba*, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

MANGAS-RAMÍREZ, E., SARMA, S; NANDINI, S. Recovery patterns of *Moina macrocopa* exposed previously to different concentrations of cadmium and methyl parathion: Life table demography and population growth studies. *Hydrobiologia*, 526, p.255-265, 2004.

MARSHALL, D.J. Transgenerational plasticity in the sea: context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology* 89:418–427, 2008.

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

MELÃO, M. G. G. 1999. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos dos cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. *In*: POMPEO, M. L. M. ed. *Perspectivas na Limnologia do Brasil*. São Luís, Gráfica e Editora União.

MEYER, J.S., ADAMS, W.J., BRIX, K.V., LUOMA, S.N., MOUNT, D.R., STUBBLEFIELD, W.A., WOOD, C.M., Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. *In*: *Proceedings from the Pellston Workshop on Toxicity of Dietborne Metals to Aquatic Organisms*, Allen Press, Springs, British Columbia, 2005.

MISHRA, V.K.; UPADHYAY, A.R.; PANDEY, S.K.; TRIPATHI, B.D. Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. *Environ Monit Assess* . v. 141, p.49–58. 2008.

MOREIRA, R. V. Efeitos anatomopatológicos após contaminação in vitro por cloretos de mercúrio e de cádmio em testículos do peixe teleósteo *gymnotus carapo* (tupiaçu) (LINNAEUS, 1758). UENF/RJ, 2010.

MORILLO-VELARDE R. Effects of Cadmium on Locomotor Activity Rhythms of the Amphipod *Gammarus aequicauda*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 60, Issue 3, p.444-451, 2010.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO P. A. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. *In*: Zagatto, Pedro A.; Bertolotti, Eduardo (Eds). *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos-SO:Ed. Rima, 2a. ed. p.251-267, 2008.

MUNGER C, HARE L. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ Sci Technol* 31:891–895, 1997.

MUYSEN, B.T.A., JANSSEN, C.R. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* v.20, p.2053–2060, 2001.

MUYSEN, B.T.A., JANSSEN, C.R. Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in *Daphnia magna* Straus. *Environmental Pollution*, v.130, p.309-316, 2004.

MUYSEN, B.T.A.; DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, v. 77, p. 393–401, 2007.

NORDBERG GF, NOGAWA K, NORDBERG M, FRIEDMANN JM. Cadmium. In: *Handbook on the Toxicology of Metals* (Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, eds). Amsterdam:Elsevier, 445–486, 2007.

OMS: RELATÓRIO MUNDIAL DA SAÚDE. Ministério da Saúde Direção-Geral da Saúde. 1.^a edição, Lisboa, 2001.

PALANIAPPAN, PL.RM., NISHANTH, T. RENJU, V.B. Bioconcentration of zinc and its effect on the biochemical constituents of the gill tissues of *Labeo rohita*: An FT-IR study. p.103–111, 2010. Disponível em: www.elsevier.com/locate/infrared. Acessado em: 03.2015.

PATNAIK, P. Propriedades nocivas das substâncias químicas (Guia geral). Belo Horizonte: Ergo, v. 1, 2002.

PLAUTZ, S.C.; SALICE, C. J. Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology*, p.847–853. Springer Science, 2013.

QUINÁGLIA, G. A. Caracterização dos Níveis Basais de Concentração de Metais nos Sedimentos do Sistema Estuarino da Baixada Santista. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade de São Paulo-USP. p. 269, 2006.

RAMIREZ, A. Toxicología Del Cadmio. Conceptos Actuales para Evaluar Exposición Ambiental y Ocupacional con Indicadores Biológicos. *Anales de La Facultad de Medicina*, v.6, p.51-64, 2002.

RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application*. Washington USA, Hemisphere Publishing. 666p, 1985.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why so What? *Environmental Pollution*, p. 497-507, 2002.

REIS, R.W.F; ARAUJO, J.C AND VIEIRA, E.M. Hormônios Sexuais Estrógenos: Contaminantes Bioativos. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, 817-822. 2006.

REACH - European Chemicals Agency Regulation. EC 1907/2006. Disponível em: <http://www.reach-compliance.eu/greek/legislation/docs/launchers/launch-2006-1907-EC-06.html>. Acesso em: 12.2015.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for *Ceriodaphnia dubia* Richard (Cladocera, Crustacea). *Braz. J. Biol.*, 68(2): p.341-348, 2007.

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

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; SIMÕES, F.C.F. TONIETTO, A.E. Cadmium and Chromium Toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Microcystis aeruginosa*, Brazilian Archives of Biology and Technology, v.55, n. 1: p.161-169, 2012.

SANTOS, D. C. M. Toxicidade aguda de Zinco em lambaris *Astyanax aff. Bimaculatus* (LINNAUS,1758). Voçosa - Minas Gerais, 2009.

SARKAR, B. (Ed.). Heavy Metals in the Environment. New York: M. Dekker, 725p. 2002.

SILVA, M. A. Ensaio de toxicidade aguda e crônica com Cd, Cu (Cd + Cu) em Tilápias do Nilo. Universidade de São Paulo Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2013.

SOARES, W.A.A. Estudo Da Distribuição de Metais em Água, Sedimento e Organismos Aquáticos e Rios E Reservatórios Pertencentes à Rede De Monitoramento da Qualidade Dos Sedimentos do Estado SP, Brasil, 2011.

SODRE, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F.; Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. *Caderno Temático*, v. 6, IQ-UNICAMP, 2007.

SOETAERT A, VANDEBROUCK T, VAN DER VEN K, MARAS M, VAN REMORTEL P, BLUST R, ET AL. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquat Toxicol.*; 83: 212–222, 2007.

SOFYAN, A.; SHAW, J.R.; BRIGE, W.J.; Effects of aqueous, dietary and combined exposure of cadmium to *Ceriodaphnia dubia*. *Science of the Total environmental*, v385, p.108-116, 2007.

SOUZA, J. P. Toxicidade do cádmio em uma cadeia alimentar constituída por uma microalga (*Scenedesmus quadricauda*), um cladóceros (*Simocephalus serrulatus*) e um peixe (*Hyphessobrycon eques*). Tese de doutorado/ Universidade Federal de São Carlos, 2012.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Baiano. *Química Nova*, v. 15, n. 2, 1992.

TAYLOR G, BAIRD DJ, SOARES AMVM. Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environ Toxicol Chem* p.412– 419, 1998.

TSUI MTK, WANG W. Influences of maternal exposure on the tolerance and physiological performance of *Daphnia magna* under mercury stress. *Environ Toxicol Chem* 24:p.1228–1234, 2005.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. National Recommended Water Quality Criteria. 2000. Disponível em:

<<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm#d>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

VERSLYCKE et. al. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology - Springer Science* 16:205–219, 2007.

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

WINNER, R., Evaluation of the relative sensitivities of 7-D *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests for cadmium and sodium pentachlorophenate. v. 7, Article first published online: 20 OCT 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620070209>_Acesso: 21/07/2015.

ZAGATTO, P. Validação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, Pedro A.; Bertoletti, Eduardo (Eds). *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos-SO:Ed. Rima, 2a. ed. p.251-267, 2008.

ZARONI, L.P.; LOTUFO, G.; GASPARROTO, M.; SOUSA, E. C.; O copépodo nitokra sp como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos marinhos e estuarinos. *Sociedade Brasileira*

9 ANEXOS

TABELAS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E REPRODUTIVOS.

A. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn, por meio de bioconcentração, com o organismo-teste *C. dubia*: Dados de reprodução dos parentais.

25.03.15			I Teste - Geração F							
	Zn Conama		Zn Amb.		Cd Conama		Cd Amb.		Controle	
1	1	15	0	0	1	8	1	4	1	17
2	1	6	1	17	1	8	0	0	1	14
3	1	4	1	9	1	13	1	13	1	8
4	0		0	0	1	11	1	13	1	12
5	1	11	1	4	1	8	1	8	1	25
6	1	6	1	14	1	16	1	14	1	24
7	0	4	1	12	1	16	1	12	1	26
8	1	11	1	15	1	9	1	10	1	17
9	1	4	0	0	0	2	1	13	1	14
10	0		1	17	1	6	0	0	0	0
MEDIA	1	8	1	9	1	10	1	9	1	16
DESVIO	4		6		3		5		6	

	montagem		1ª Troca				2ª Troca				Desmontagem			
	Dureza	pH	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD
Zn C			45	8,40	171,8	5,2	46	8,50	114,9	5,0	47	8,50	282,40	5,30
Zn A			44	8,20	184,1	5,1	45	8,1	136,2	4,9	46	8,3	190,5	5,2
Cd C			46	8,30	199,7	4,9	47	8,30	174,2	4,9	49	8,2	203,4	4,7
Cd A			47	7,90	189,3	4,8	46	8,40	177,6	4,8	50	8,10	201,70	4,90
C	45	7,0	47	8,50	157,4	5,1	45	8,40	179,9	4,9	48	8,30	200,10	4,40

I Teste - Geração F1										
02.04.15	Zn Conama		Zn Amb.		Cd Conama		Cd Amb.		Controle	
1	1	18	1	16	1	20	1	16	1	6
2	1	19	1	17	1	9	1	12	1	23
3	1	12	1	15	1	16	1	15	1	13
4	1	19	1	15	1	13	1	15	1	20
5	1	10	1	14	1	16	1	16	1	13
6	1	21	1	13	0	7	1	10	1	20
7	1	13	1	12	1	15	1	13	1	17
8	1	9	1	13	1	11	1	12	1	21
9	1	12	1	13	1	8	1	14	1	23
10	1	11	1	15	1	12	1	15	1	23
Media	1	14	1	14	1	13	1	14	1	18
Desvio	4		1		3		2		5	

	montagem		1ª Troca				2ª Troca				desmontagem			
	Dureza	pH	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD
Zn C			46	8,60	197,6	5,8	46	8,30	132,9	7,2	48	8,20	221,90	32,00
Zn A			47	8,40	198,3	5,7	47	8	191,6	7,92	49	8,3	217,6	33,09
Cd C			47	8,20	197,6	5,30	45	8,40	172,6	8,3	48	8,2	269,1	25,26
Cd A			48	8,30	200,2	5,10	47	8,20	191,9	4,0	47	8,30	227,60	27,72
C	44	7,1	48	8,50	178,6	4,70	44	8,10	159,3	6,7	47	8,40	267,90	21,08

10.04.15			II Teste - Geração F							
	Zn Conama		Zn Amb.		Cd Conama		Cd Amb.		Controle	
1	1	9	1	6	1	11	1	5	1	24
2	1	5	0	0	0	0	1	5	1	17
3	0	5	1	7	1	11	1	4	1	19
4	1	11	0	3	0	0	0	4	1	19
5	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0
6	1	9	1	2	1	8	0	0	1	14
7	1	8	1	6	1	5	0	0	1	19
8	0	0	1	9	1	10	0	1	1	18
9	1	8	1	8	1	2	1	3	1	22
10	1	11	0	8	1	13	1	8	1	21
MEDIA	1	7	1	5	1	7	1	3	1	17
DESVIO	3		3		4		2		4	

	montagem		1ª Troca				2ª Troca				desmontagem			
	Dureza	pH	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD
Zn C	41	7,6	44	8,10	185,7	31,4	43	8,60	180,22	19,9	42	8,20	174,90	16,42
Zn A			45	8,00	188,0	14,9	43	8,3	169,53	12,2	41	8,1	173,2	12,61
Cd C			46	7,90	190,7	13,2	45	8,50	229,80	18,6	43	8,1	174,2	12,6
Cd A			45	7,90	198,0	10,9	44	8,50	197,80	20,8	41	8,20	171,80	12,15
C			45	7,90	201,2	21,6	45	8,50	187,10	16,5	41	8,50	175,80	12,15

17.04.15			II Teste - Geração F1											
	Zn Conama		Zn Amb.		Cd Conama		Cd Amb.		Controle					
1	1	27	1	23	1	14	1	13	1	9				
2	1	15	0	3	0	0	1	10	1	19				
3	0	27	1	27	0	0	1	17	1	23				
4	1	18	0	20	0	6	1	16	1	25				
5	0	0	1	16	1	13	1	16	1	20				
6	1	15	0	2	0	13	0	13	1	20				
7	0	13	1	5	1	17	1	9	1	19				
8	0	14	1	13	0	3	0	6	1	19				
9	1	9	0	21	1	15	0	3	0	16				
10	1	15	0	1	1	16	0	2	1	20				
Media	1	15	1	13	1	10	1	11	1	19				
Desvio	5		8		6		5		3					
	montagem		1ª Troca				2ª Troca				desmontagem			
	Dureza	pH	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD
Zn C	43	7.8	60	8,60	233,3	5,8	51	8,30	196,1	5,8	56	8,20	197,20	5,92
Zn A			59	8,65	235,2	5,5	53	8,2	203	5,9	52	8,1	201,4	6,1
Cd C			58	8,62	240,7	7,3	52	8,00	212,0	6,3	54	8,3	209,61	5,2
Cd A			60	8,58	273,3	6,1	54	8,20	207,6	5,9	57	8,10	215,90	6,00
C			63	X	X	X	54	8,10	206,6	6,0	58	8,00	174,20	5,10

B. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn, por meio de bioconcentração, com o organismo-teste *R. subcapitata*: Dados de crescimento.

27.05.15															
I Teste															
	Zn Conama			Zn Meio Amb.			Cd Conama			Cd Meio Amb.			Controle		
1	76	59	58	68	61	91	102	37	72	95	98	59	91	71	46
2	57	72	47	83	58	89	105	87	58	88	112	71	102	88	61
3	72	71	60	78	62	96	93	81	69	86	96	87	98	104	67
4	60	81	63	79	51	109	90	95	73	81	56	83	59	91	64
5	67	89	62	73	54	89	76	76	77	94	89	82	64	102	78
6	69	91	69	70	73	101	92	79	65	87	95	93	59	98	63
7	74	93	59	79	69	97	79	104	86	83	93	64	99	89	81
8	77	96	67	81	64	101	95	106	89	82	54	97	84	94	56
9	62	81	79	72	56	89	80	102	94	93	96	59	67	82	63
10	85	83	86	63	59	102	106	107	79	94	71	71	89	96	89
	70	82	65	75	61	96	92	87	76	88	86	77	81	92	67
Media	72			77			85			84			80		
Desvio	6			13			6			5			9		

30.05.15															
II Teste															
	Zn Conama			Zn Meio Amb.			Cd Conama			Cd Meio Amb.			Controle		
1	49	28	50	63	51	24	63	47	48	45	30	54	47	59	38
2	54	30	54	60	46	42	61	64	57	20	19	60	42	52	42
3	38	39	56	62	48	36	60	51	59	44	24	57	41	46	59
4	42	49	48	66	69	38	58	55	50	58	26	49	39	54	56
5	40	41	34	69	61	40	54	30	39	72	30	55	42	49	71
6	43	66	51	67	56	32	60	49	42	22	28	63	59	66	62
7	35	44	48	66	64	37	69	53	52	41	48	61	46	66	47
8	53	41	50	67	69	43	49	59	54	34	29	71	49	52	51
9	39	53	58	69	68	46	64	61	48	39	39	66	50	56	60
10	38	32	54	61	62	41	65	46	44	32	52	70	51	39	58
	43	42	50	65	59	38	60	52	49	41	33	61	47	54	54
Media	45			54			54			45			52		
Desvio	3			11			4			11			3		

C. Testes de toxicidade com os metais Cd e Zn, por meio de bioconcentração e biomagnificação com o organismo-teste *C. dubia*: Dados de reprodução dos parentais expostos, geração F1 e recuperação biológica.

17.05.15			Teste - Geração Parental											
	Zn Conama		Zn Amb.		Cd Conama		Cd Amb.		Controle					
1	1	17	1	16	1	9	0	8	1	25				
2	1	21	0	11	0	9	0	17	1	21				
3	1	13	1	13	0	8	1	12	1	20				
4	1	12	1	11	0	12	1	12	1	20				
5	1	18	1	1	1	9	1	14	1	22				
6	1	13	1	20	1	15	1	17	1	21				
7	1	14	1	15	1	17	1	14	1	21				
8	1	15	1	19	1	17	1	15	1	19				
9	1	9	1	20	1	12	1	11	1	24				
10	1	21	1	19	0	7	1	20	1	25				
Media	1	15	1	15	1	12	1	14	1	22				
Desvio	3		4		3		3		2					
Zn C Zn A Cd C Cd A C	montagem		1ª Troca				2ª Troca				desmontagem			
	Dureza	pH	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD
	43	7,9	46	8,10	187,9	8,1	46	8,30	187,6	4,5	44	8,20	179,62	7,36
			46	8,00	181,1	8,2	44	8,3	195,18	4,28	44	8	178,68	7,35
			47	7,90	188,9	8,0	45	8,40	187,0	4,9	45	8	178,45	5,99
			48	7,90	199,13	8,1	44	8,60	186,4	4,7	44	8,90	180,20	5,09
		46	8,20	185,6	8,3	45	8,60	184,92	5,5	45	8,50	178,82	7,00	

.05.15			Teste - Geração F1											
			Zn Conama		Zn Amb.		Cd Conama		Cd Amb.		Controle			
1	1	14	1	12	1	20	1	14	0	0				
2	0	0	1	19	1	10	1	13	1	22				
3	1	17	1	17	0	0	1	16	1	22				
4	1	15	1	10	1	9	0	0	1	17				
5	1	12	0	8	1	12	1	7	1	16				
6	1	6	1	11	0	4	1	12	1	18				
7	1	4	1	10	1	16	1	7	1	21				
8	0	0	1	10	1	12	1	8	1	15				
9	1	4	1	11	0	13	1	6	1	10				
10	1	10	1	6	1	11	1	15	1	11				
Media			1	8	1	11	1	11	1	10	1	15		
Desvio			5	3	4	4	5							
Zn C Zn A Cd C Cd A C	montagem		1ª Troca				2ª Troca				desmontagem			
	Dureza	pH	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD	Dur.	ph	cond.	OD
			47	8,7	197,7	6,0	43	7,60	200,4	8,3	48	8,00	186,21	5,22
			48	8,5	200,0	4,0	42	7,7	183,8	9,2	44	7,97	185,8	5,13
			48	8,58	208,4	6,4	44	7,80	176,5	8,7	50	8,01	185,65	6,09
			46	8,7	200,3	6,3	43	7,90	189,2	8,3	48	8,04	186,51	6,03
	44	7,1	51	8,9	217,5	5,4	44	8,10	190,3	7,4	50	8,00	186,20	5,00

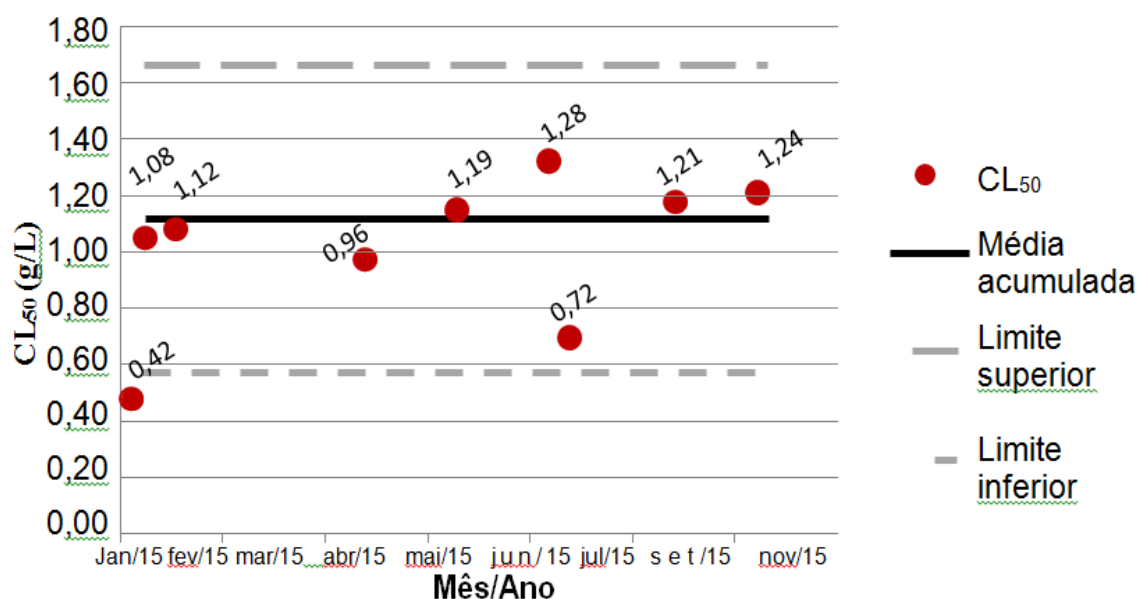
ANEXO 2 - Carta controle

Através dos testes de Sensibilidade com *C. dubia*, determinou-se a CL₅₀ dos testes de toxicidade utilizando-se o método Trimmed Spearman-Kärber segundo Hamilton (1977), conforme tabela abaixo.

Valores de CL ₅₀ determinados por meio dos Testes de Sensibilidade com <i>C. dubia</i>			
Data do teste	CL₅₀ (g/ L)	Limite inferior (g/L)	Limite superior (g/L)
Dezembro de 2014	0,42	0,35	0,65
Janeiro de 2015	-	-	-
Fevereiro de 2015	1,08	0,81	1,33
Março de 2015	1,12	0,55	2,09
Abril de 2015	0,98	0,58	0,78
Maio de 2015	1,19	1,10	1,38
Junho de 2015	1,28	1,16	1,39
Julho de 2015	0,83	0,65	0,96
Agosto de 2015	-	-	-
Setembro de 2015	1,21	1,08	1,27
Outubro de 2015	-	-	-
Novembro de 2015	1,24	1,07	1,4

A partir dos valores de CL₅₀ supracitados elaborou-se uma carta-controle preliminar, ilustrada na figura 13. Segundo Carvalho (2016) os valores de CL₅₀ referentes aos meses de janeiro, agosto e outubro de 2015, não foram incluídos na Carta Controle, pois os dados dos testes não apresentaram requisitos suficientes para geração do valor de CL₅₀. Sendo realizados durante esse período procedimentos de otimização da cultura para garantir a reprodutibilidade dos testes posteriores.

Figura 13 – Controle de sensibilidade das culturas de *Ceriodaphnia dubia* à substância de referência cloreto de sódio. Média acumulada (média das CL_{50} obtidas mensalmente) = 1,11 g/L; Limite superior = 1,65 g/L; Limite inferior = 0,55 g/L.



Fonte: Carvalho, 2016.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. **Trimmed Spearman- Karber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays**. Environmental Science & Technology. p. 714-719. jul. 1977. Disponível em: <<http://www.math.montana.edu/~jimrc/classes/stat524/notes/TrimmedSpearmanKarber.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2015.

Carvalho, Marcela Merides. **ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DE METAIS ZINCO E CÁDMIO SOBRE OS ASPECTOS REPRODUTIVOS DE CERIADAPHNIA DUBIA GERAÇÃO PARENTAL E F1**. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Ciência e Tecnologia Sorocaba, Sorocaba, 2016.

Anexo 3 – Resultados dos Testes de Sensibilidade com *C. dubia* – 2015.

Dezembro de 2014					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	10	8,2 $\pm$ 0,3	166,5 $\pm$ 15,1	-	46 $\pm$ 1
0,3	60	8,2 $\pm$ 0,3	871,1 $\pm$ 66,6	-	47 $\pm$ 0
0,45	80	8,2 $\pm$ 0,3	1.085,4 $\pm$ 13,2	-	47 $\pm$ 2
0,67	90	8,1 $\pm$ 0,3	1.539,7 $\pm$ 50,8	-	47 $\pm$ 0
1	90	8,0 $\pm$ 0,3	2.174,3 $\pm$ 115,4	-	47 $\pm$ 1
1,5	90	8,1 $\pm$ 0,3	3.471 $\pm$ 308,2	-	45 $\pm$ 1
Janeiro de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	8,4 $\pm$ 0,3	160,0 $\pm$ 14,1	-	45 $\pm$ 5
0,3	10	8,1 $\pm$ 0,2	735,6 $\pm$ 25,1	-	44 $\pm$ 1
0,45	20	7,4 $\pm$ 1,6	1.018,3 $\pm$ 29,7	-	44 $\pm$ 1
0,67	70	8,2 $\pm$ 0,3	1.440 $\pm$ 42	-	44 $\pm$ 0
1	60	8,1 $\pm$ 0,1	2.195,6 $\pm$ 195,7	-	43 $\pm$ 1
1,5	60	8,1 $\pm$ 0,2	3.017,1 $\pm$ 214,7	-	43 $\pm$ 1
Fevereiro de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	7,9 $\pm$ 0,2	164,9 $\pm$ 4,9	3,6 $\pm$ 0,5	46 $\pm$ 2
0,3	10	7,8 $\pm$ 0,1	770,8 $\pm$ 50,5	3,7 $\pm$ 0,5	45 $\pm$ 2
0,45	10	7,6 $\pm$ 0,0	955,9 $\pm$ 33,2	5,2 $\pm$ 1,1	44 $\pm$ 1
0,67	10	7,6 $\pm$ 0,2	1.398,8 $\pm$ 7,3	5,4 $\pm$ 0,9	44 $\pm$ 1
1	0	7,7 $\pm$ 0,2	2.035,7 $\pm$ 38,2	5,5 $\pm$ 0,4	42 $\pm$ 1
1,5	80	7,7 $\pm$ 0,0	3.201,5 $\pm$ 578,7	5,1 $\pm$ 0,5	39 $\pm$ 3
Março de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	8,1 $\pm$ 0,1	211,7 $\pm$ 57,2	8,6 $\pm$ 0,0	48 $\pm$ 2
0,3	0	8,1 $\pm$ 0,0	819 $\pm$ 53,9	8,6 $\pm$ 0,0	45 $\pm$ 4
0,45	10	8,0 $\pm$ 0,1	1.086,6 $\pm$ 98,7	8,3 $\pm$ 0,0	47 $\pm$ 4
0,67	50	8,0 $\pm$ 0,0	1.542,3 $\pm$ 132,9	8,3 $\pm$ 0,0	46 $\pm$ 4
1	50	7,9 $\pm$ 0,1	2.542,0 $\pm$ 485,5	8,6 $\pm$ 0,0	46 $\pm$ 5
1,5	100	7,7 $\pm$ 0,1	3.440,0 $\pm$ 91,0	8,2 $\pm$ 0,0	44 $\pm$ 2
Abril de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	8,2 $\pm$ 0,0	156,4 $\pm$ 42,4	-	47 $\pm$ 4
0,3	0	7,9 $\pm$ 0,1	801,4 $\pm$ 30,9	-	47 $\pm$ 4
0,45	10	7,9 $\pm$ 0,1	1.028,4 $\pm$ 39,6	-	48 $\pm$ 5
0,67	40	7,7 $\pm$ 0,1	1.434,5 $\pm$ 91,3	-	47 $\pm$ 4
1	100	7,8 $\pm$ 0,1	1.841 $\pm$ 0,0	-	48 $\pm$ 5
1,5	100	7,5 $\pm$ 0,0	3.671 $\pm$ 0,0	-	48 $\pm$ 5

Maio de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	8,2 $\pm$ 0,1	206,4 $\pm$ 6,3	7,2 $\pm$ 0,0	46 $\pm$ 1
0,3	20	7,9 $\pm$ 0,0	867,5 $\pm$ 5,6	8,1 $\pm$ 0,0	45 $\pm$ 2
0,45	30	7,6 $\pm$ 0,2	1.091,8 $\pm$ 7,5	8,4 $\pm$ 0,0	41 $\pm$ 1
0,67	20	7,9 $\pm$ 0,1	1.524,8 $\pm$ 32,6	8,7 $\pm$ 0,0	44 $\pm$ 1
1	0	7,9 $\pm$ 0,0	2.259,0 $\pm$ 42,0	8,5 $\pm$ 0,0	45 $\pm$ 0
1,5	80	7,9 $\pm$ 0,0	2.179,0 $\pm$ 50,0	8,2 $\pm$ 0,0	44 $\pm$ 1
Junho de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	7,7 $\pm$ 0,2	164,9 $\pm$ 29,8	6,1 $\pm$ 0,7	45 $\pm$ 2
0,3	0	7,7 $\pm$ 0,3	882,1 $\pm$ 57,1	5,2 $\pm$ 0,8	44 $\pm$ 1
0,45	40	7,6 $\pm$ 0,3	1.131,9 $\pm$ 184,6	5,8 $\pm$ 1,1	44 $\pm$ 1
0,67	0	7,6 $\pm$ 0,4	1.456,9 $\pm$ 34,7	8,7 $\pm$ 2,9	44 $\pm$ 1
1	0	7,5 $\pm$ 0,4	2.124,7 $\pm$ 105,5	6,5 $\pm$ 0,3	43 $\pm$ 1
1,5	40	7,5 $\pm$ 0,3	2.888,0 $\pm$ 658,0	7,9 $\pm$ 2,3	42 $\pm$ 2
Junho de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	0	7,2 $\pm$ 0,2	114,9 $\pm$ 22,2	6,5 $\pm$ 0,5	45 $\pm$ 2
0,3	0	7,2 $\pm$ 0,3	772,1 $\pm$ 52,4	5,9 $\pm$ 0,9	44 $\pm$ 1
0,45	40	7,7 $\pm$ 0,3	1.221,9 $\pm$ 143,1	5,6 $\pm$ 1,1	44 $\pm$ 1
0,67	0	7,5 $\pm$ 0,4	1.457,9 $\pm$ 32,1	7,7 $\pm$ 2,5	44 $\pm$ 1
1	0	7,5 $\pm$ 0,2	2.654,7 $\pm$ 102,1	6,8 $\pm$ 0,3	43 $\pm$ 1
1,5	40	7,5 $\pm$ 0,5	2.867 $\pm$ 518,0	7,3 $\pm$ 2,7	42 $\pm$ 2
Setembro de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	10	8,1 $\pm$ 0,1	235,4 $\pm$ 24	8,8 $\pm$ 2,8	54 $\pm$ 2
0,3	10	8,1 $\pm$ 0,1	860,1 $\pm$ 25,3	9,3 $\pm$ 2,1	49 $\pm$ 2
0,45	20	7,8 $\pm$ 0,1	1.185,5 $\pm$ 103,5	9,0 $\pm$ 2,5	48 $\pm$ 1
0,67	0	7,6 $\pm$ 0,1	1.608,7 $\pm$ 36,9	8,7 $\pm$ 2,9	48 $\pm$ 1
1	20	7,9 $\pm$ 0,1	2.263,7 $\pm$ 57,8	8,8 $\pm$ 2,5	46 $\pm$ 2
1,5	100	8,0 $\pm$ 0,0	3.414 $\pm$ 0,0	4,4 $\pm$ 0,0	47 $\pm$ 0
Novembro de 2015					
Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL^{-1})	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	10	8,3 $\pm$ 0,1	194,4 $\pm$ 101	-	46 $\pm$ 1
0,3	10	8,1 $\pm$ 0,1	758 $\pm$ 49,0	-	45 $\pm$ 2
0,45	20	8,1 $\pm$ 0,2	1.042,0 $\pm$ 93,1	-	46 $\pm$ 2
0,67	0	8,1 $\pm$ 0,2	1.496,6 $\pm$ 175,3	-	45 $\pm$ 2
1	30	8,0 $\pm$ 0,1	1.951,9 $\pm$ 31,4	-	44 $\pm$ 2
1,5	80	8,1 $\pm$ 0,3	3.136 $\pm$ 515,0	-	44 $\pm$ 3