

Paloma Kachel Gusso

CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR E SEUS EFEITOS NA BIONOMIA DE *Ceriodaphnia*  
*cornuta* (CLADOCERA, DAPHNIDAE)

Monografia apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências do Mar, no  
Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça G. Melão

Pontal do Sul

2004

## O Rio e o Oceano

Diz-se que, mesmo antes de um Rio cair no Oceano, ele treme de medo, olha para trás, para toda a jornada, os cumes, a montanha, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê em sua frente um Oceano tão vasto que entrar nele, nada mais é que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira, o Rio não pode voltar, voltar é impossível na existência. Pode-se apenas ir em frente, o Rio, precisa se arriscar e entrar no oceano, e somente quando ele entra no oceano, o medo desaparece, pois ele saberá então, que não se trata de desaparecer no oceano, mas sim, tornar-se o Oceano. Por um lado é desaparecimento e por outro é renascimento. Assim somos nós, voltar é impossível na existência, pode-se somente ir em frente e se arriscar.

Coragem, torne-se o Oceano.

Autor Desconhecido

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi, pela orientação e ensinamentos, mas, sobretudo por acreditar em mim;

À Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão, pela orientação;

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento do projeto;

À Patrícia, por sempre me apoiar e me ensinar quase tudo que sei dos procedimentos de laboratório;

À Irene, Gabi, Prof. Ivã, por tornarem nosso laboratório um local sempre agradável;

Aos vários amigos feitos no Cem nestes anos;

Aos amigos e “guerreiros” da turma de 2000 do curso de Ciências do Mar, pois de uma certa forma, crescemos juntos nestes cinco anos de convivência e aprendemos juntos a sempre superar as dificuldades. E acima de tudo, por terem me proporcionado lembranças e momentos que eu guardarei por toda minha vida;

Aos novos amigos de São Carlos (João e Vitelo) obrigada por me agüentar!!!

Aos amigos de Curitiba (Sil, Isa...) que mesmo eu estando quase sempre ausente nunca esqueceram de mim;

Aos amigos da República (Fer, Chileno e Allan) por tornar a nossa casa um local cheio de alegria e união e por serem além de amigos a minha segunda família;

À minha família (Mônica, tia Normina, Osmarzinho, Rê, Lucas, tio Toninho, Fabiano, Sandro e todos os outros) pelo apoio e carinho;

À minha Irmã Fer por ser tão amiga e compreensiva me agüentando em todos os momentos, consolando minhas crises e me proporcionado desde seu nascimento só alegrias;

Aos meus pais Sandra e Olivir que sempre me deram muito apoio, muito amor e muito carinho, e a quem eu dedico todas as minhas conquistas (além disto, tenho certeza que as agências de fomento têm inveja de vocês!!!!!!);

Ao Rodrigo por me ensinar o verdadeiro sentido da palavra companheirismo, estando comigo todos os segundos, mesmo que em pensamento, e por tornar a minha vida infinitamente feliz.

## SUMÁRIO

	pp
Resumo.....	01
1. Introdução.....	02
2. Objetivos.....	06
3. Materiais e Métodos.....	07
3.1. Cultura de organismos.....	07
3.1.1. Microalgas.....	07
3.1.2. Zooplâncton.....	08
3.2. Metais.....	09
3.2.1. Experimento de contaminação alimentar.....	09
3.2.2. Metal particulado.....	10
3.2.2.1. Nas microalgas.....	10
3.2.2.2. Nos organismos zooplanctônicos.....	10
3.2.3. Metal livre.....	11
3.3. Análise dos resultados.....	11
4. Resultados.....	12
5. Discussão.....	16
6. Conclusões.....	22
7. Referências Bibliográficas.....	23
Anexos.....	29

## RESUMO

Uma forma grave de poluição ambiental é o despejo de metais nos ambientes aquáticos, fato que tem sido comumente observado. O plâncton forma a base de cadeias alimentares em ambientes aquáticos e pode atuar como fonte de entrada de metais tóxicos nestas cadeias, vindo a atingir o Homem. A ingestão de quantidades excessivas de cobre pode causar ao ser humano a irritação e corrosão da mucosa, problemas hepáticos, renais, irritação do sistema nervoso e depressão. O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos do metal cobre em organismos do zooplâncton (*Ceriodaphnia cornuta*) fornecido através de alimento (microalga *Selenastrum capricornutum*) cronicamente contaminado. Para tanto, a *S. capricornutum* foi contaminada com cobre ( $\text{CuCl}_2$ ), nas concentrações nominais de  $10^{-7}\text{M}$  e  $10^{-6}\text{M}$ , e posteriormente foi fornecida como alimento para a espécie zooplanctônica *C. cornuta*. Foram investigadas a capacidade de acúmulo do metal tanto na microalga como também no zooplâncton e seus efeitos sobre a bionomia do animal, ao longo de toda sua história de vida. Resultados significativos foram encontrados, visto que estes organismos demonstraram uma alta plasticidade fenotípica em resposta ao estresse causado pelo metal. Duas estratégias de vida diferentes foram verificadas, uma focada na reprodução, ocorrida nos animais alimentados com microalgas contaminadas com cobre à concentração de  $1 \times 10^{-7}$  gCu/dia, e a outra em crescimento somático, manifestada pelos animais tratados com as algas contaminadas com a concentração de  $5 \times 10^{-8}$  gCu/dia do metal. Além disso, a presença do cobre afetou os organismos teste em termos de comprimento dos animais na primípara (idade em que o juvenil atinge a maturidade sexual) e quanto à longevidade. Observou-se também que vários ovos foram abortados, algumas fêmeas passaram seu ciclo de vida sem produzir descendentes e alguns neonatos nasceram mortos.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental causada por metais, cuja característica notável é sua persistência e tendência de concentrarem-se em cadeias alimentares através de bioacumulação (Woodwell, 1974) e biomagnificação (Reinfelder *et al.*, 1998), pode resultar em alterações na estrutura e função da comunidade de modo geral. Nos ambientes aquáticos, os seres vivos possuem uma íntima, obrigatória e recíproca relação com o meio circundante, sendo que a introdução de substâncias ou compostos tóxicos leva a alterações profundas da biota (Rocha, 2000). Como exemplo, temos a redução das taxas alimentares em consumidores primários, resultando em mudanças significativas nas populações, uma vez que a reprodução, crescimento e sobrevivência dessas espécies dependem da energia proveniente do alimento (Taylor *et al.*, 1998). Os efeitos nocivos provenientes de metais chegam ao ser humano a partir da biomagnificação do metal em níveis tróficos superiores.

Em ecossistemas aquáticos, um metal pode seguir diversos destinos, tais como interações iônicas simples, associação com partículas, precipitação e acúmulo no sedimento, oxidações e reduções químicas e biológicas, complexação com ligantes e adsorção e absorção por microorganismos dentro da cadeia alimentar.

Os elementos traços são encontrados na maior parte dos diferentes compartimentos que integram os sistemas aquáticos naturais, tais como rochas, solos, sedimentos, águas e organismos.

O cobre, elemento traço selecionado para o exercício deste trabalho, é comum em rochas e minerais da crosta terrestre e pode ser introduzido nos ambientes aquáticos através do intemperismo de minerais. No entanto, o aumento da industrialização tem disponibilizado no ambiente quantidades de metais superiores àquelas habituais aos organismos.

A contaminação nos ecossistemas marinhos, e aquáticos de maneira geral, é resultante principalmente do descarte deste elemento em rios e leitos, que acabam por desaguar nos oceanos. Entre as fontes potenciais de contaminação antropogênica

estão a corrosão de tubulações metálicas, o uso de compostos químicos que contenham o metal, tais como algicidas, o descarte inadequado de efluentes, a drenagem de água subterrânea contaminada, os usos de compostos agrícolas, como fungicidas e pesticidas, além de precipitações atmosféricas.

O cobre apresenta-se muito tóxico, mesmo em baixas concentrações, o que se deve provavelmente à sua característica nutricional, visto que ele é um elemento essencial para os organismos. Seus efeitos passam a ser deletérios aos seres humanos quando acumulado em altas concentrações, podendo causar irritação e corrosão da mucosa, problemas hepáticos, renais, irritação do sistema nervoso e depressão.

As contaminações causadas pelo metal cobre permanecem no ambiente por longos períodos visto que seu tempo de resiliência no ambiente é de aproximadamente 3 mil anos (Emsley, 1998).

Investigações de natureza ecotoxicológica cujo o objetivo seja o entendimento e avaliação da dinâmica de metais associada à sua transferência em cadeias alimentares, o que caracteriza uma contaminação crônica, são necessárias para prever adequadamente os riscos de uma contaminação ambiental ocasionada por metais. Testes de toxicidade são normalmente usados para predizer os efeitos de contaminantes na biota, comparando a resposta de uma ou mais espécies aos diferentes compostos. Tais testes podem ser de natureza aguda ou crônica.

Testes crônicos, como os utilizados neste trabalho, são os mais adequados para o estudo de contaminações via fonte alimentar, uma vez que quantificam efeitos subletais e utilizam indivíduos de diferentes níveis da cadeia alimentar aquática, investigando efeitos internos e externos ao indivíduo.

Um elemento pode agir nos processos fisiológicos e bioquímicos e conseqüentemente afetar os parâmetros bionômicos dos indivíduos, dependendo da espécie e forma que este poluente se faz presente. Portanto, o estudo das relações de ciclo de vida e possíveis suscetibilidades ao estresse é de prima importância, visto que está inteiramente ligado às dinâmicas de populações e comunidades. Isto tem levado a um interesse crescente em se conhecer o destino e os efeitos dos metais na dinâmica de cadeias alimentares.

De acordo com Rand e Petrocelli (1992), espécies que são representativas em ecossistemas que recebem poluentes devem ser utilizadas em testes de toxicidade. Os organismos zooplanctônicos entram nesta classificação, pois são consumidores que se encontram na base das cadeias tróficas de ecossistemas aquáticos naturais, constituindo o mais importante elo com os níveis tróficos superiores desses ambientes. Estes organismos são, portanto, importantes na acumulação e transferência de metais pesados ao longo dessas cadeias.

O zooplâncton é fundamental no funcionamento de ecossistemas aquáticos, sendo que sua importância em cadeias tróficas tem sido amplamente documentada (Wetzel, 1981; LeCren & Lowe-McConnell, 1980; Payne, 1986). Particularmente os microcrustáceos, como eficientes filtradores que são, atuam sobre o crescimento das microalgas através da herbivoria e, juntamente com os rotíferos, constituem a base dos recursos alimentares para estágios larvais de várias espécies de peixes (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1988, 1994; Arcifa *et al.*, 1988), além de sustentar o crescimento e a reprodução de estágios mais avançados de espécies zooplanctívoras obrigatórias e facultativas (Amarasinghe *et al.*, 1997).

Metais absorvidos pelo zooplâncton através de contaminação do alimento podem sofrer reações de competição iônica dentro do organismo. Assim, o metal pode competir com os nutrientes no interior do animal e, tendo grande afinidade pelas moléculas biológicas, tais como proteínas, exercerá sua toxicidade.

Segundo Rainbow & Darllinger (1993), nos invertebrados, pode-se considerar como metal acumulado aquele que é capturado pelo organismo e não é eliminado via excreção, ou seja, aquele que efetivamente entra em seus processos metabólicos.

A comunidade zooplanctônica de ecossistemas de água doce é dominado por três grandes grupos taxonômicos: Rotifera, Cladocera e Copepoda.

O Gênero *Daphnia* (Cladocera, Daphnidae) é amplamente usado como organismo teste para avaliação de toxicidade aguda e crônica no campo da ecotoxicologia (Baudo, 1987).

As *Ceriodaphnias* são cladóceros da classe Branchiopoda da família Daphnidae, fazem parte do euoplâncton e possuem hábitos limnéticos. São de fácil cultivo em

laboratório por serem relativamente pequenas, ter um curto ciclo de vida, alta fecundidade e reprodução paternogênica.

Os indivíduos da família Daphnidae são espécies chave em ecossistemas lacustres, pois são eficientes pastadores de fitoplâncton (maior produtor primário em lagos) e fazem parte da dieta favorita para predadores vertebrados e invertebrados (Larsson et al, 1993).

O conhecimento a respeito do crescimento, reprodução e das taxas de desenvolvimento embrionário destes organismos é particularmente importante em estudos de dinâmicas de populações, produção secundária e teias alimentares (Vijverberg, 1989).

Dados bionômicos são uma importante ferramenta para se entender as estratégias de histórias de vida de organismos zooplanctônicos em relação a condições adversas e assim predizer os efeitos de uma contaminação. No entanto, atualmente pouco se sabe sobre as relações entre bionomia e estratégias para a tolerância à situações de estresse, tal qual a presença do metal cobre.

Este estudo vem contribuir para a compreensão dos efeitos de uma contaminação alimentar crônica sobre os organismos do zooplâncton.

Para tanto, o desenvolvimento bionômico de *Ceriodaphnia cornuta* foi detalhadamente acompanhado após o oferecimento de *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) contaminado com cobre, como fonte alimentar.

## 2.0 OBJETIVOS

O objetivo principal do presente trabalho foi analisar as interações entre o cobre e uma espécie zooplanctônica (*Ceriodaphnia cornuta*), sob os aspectos fisiológicos e ecotoxicológicos, através de contaminação alimentar e desta maneira procurou-se inferir sobre sua participação como elo de transferência do cobre nas cadeias alimentares. Como consequência deste objetivo central, outros objetivos secundários foram atingidos, os quais são descritos a seguir.

- a) Cultivar as microalgas *Selenastrum capricornutum*, *Senedesmus bijugos* e *Chlamydomonas reinhardi* em laboratório.
- b) Cultivar em laboratório o organismo zooplanctônico a ser utilizado nos testes.
- c) Verificar a toxicidade crônica de cobre para os organismos zooplanctônicos através da contaminação de sua fonte alimentar.
- d) Verificar se a espécie zooplanctônica é reguladora do metal cobre ou se o acumula, contribuindo para a biomagnificação do metal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *Cultura de organismos*

##### 3.1.1. Microalgas

Para alimentação da cultura estoque de *Ceriodaphnia cornuta*, culturas unialgais de *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus bijugus* e *Chlamydomonas reinhardi* foram mantidas em laboratório em meio de cultura WC (Guillard & Lorenzen, 1972) sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e iluminação (fotoperíodo de 12/12 horas claro/escuro). O crescimento das células algais foi acompanhado através de contagem em câmara de Neubauer, e fornecido ao zooplâncton somente em fase exponencial de crescimento. Nesta situação, as algas eram centrifugadas a 2000rpm por 25 minutos (centrífuga FANEM “Excelsa II” modelo 206 MP), o *pelet* era ressuspenso em água reconstituída (U.S. Epa, 1991). A suspensão de células era fornecidas à cultura estoque de *Ceriodaphnia cornuta* três vezes por semana à concentração de  $10^5 \text{cels.ml}^{-1}$ .

Para os bioensaios de toxicidade, foi utilizado *Selenastrum capricornutum* como fonte alimentar, que foram mantidas em laboratório sob condições controladas como descrito acima. Os inóculos, obtidos no Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, foram gentilmente cedidos pelo Professor Doutor Armando Augusto Vieira, coordenador do Laboratório de Ficologia. As células foram cultivadas em meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972) modificado, sem EDTA (um agente quelante de íons), autoclavado a  $120^\circ \text{C}$  por 30 minutos e acondicionado em Erlenmeyers previamente lavados em  $\text{HNO}_3$  1M por 7 dias. O desenvolvimento da cultura algal foi acompanhado através de contagem de células em câmara de Neubauer, e, na fase exponencial de crescimento, as algas destinadas aos experimentos de toxicidade foram contaminadas com concentrações nominais de cobre de  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  ( $\text{CuCl}_2$ ). Para tanto, o cobre foi adicionado no meio de cultivo das algas e, após 48 horas, as culturas eram centrifugadas a 2000rpm por 25 minutos (centrífuga FANEM “Excelsa II” modelo 206 MP) para a retirada do meio WC. O *pellet* algal era ressuspenso então em água reconstituída (U.S. EPA, 1991). Este

procedimento de lavagem das células algais foi repetido por mais três vezes, para se garantir que o cobre estaria presente apenas na alga e não no meio. Para os experimentos controle foi adotado o mesmo procedimento, no entanto o alimento não era contaminado. As algas eram então recontadas e fornecidas aos organismos zooplanctônicos à concentração de  $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Um volume de 3mL de cada suspensão algal foi filtrado em filtros de membrana previamente lavados em ácido nítrico 1M durante 24 horas e posteriormente secos em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ , para a determinação do cobre acumulado pelas células algais. Os procedimentos laboratoriais de limpeza e preparo de amostras encontram-se descritos em Lombardi *et al.* (2002).

### 3.1.2 Zooplâncton

A espécie de zooplâncton estudada, *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera) (Figura 1) foi cultivada segundo as recomendações feitas por Bottrell *et al* (1976) e Vijverberg (1989). As populações cultivadas em laboratório foram iniciadas a partir de animais coletados em campo, sendo que o uso de populações monoclonais foi evitado, tentando-se sempre cultivar uma amostra representativa da população. Inicialmente os animais foram mantidos em água do ambiente em que foram coletados, o que, de acordo com Vijverberg (1989), é mais adequado para o cultivo sob condições naturais e semi-naturais. Antes de iniciar-se o cultivo esta água foi filtrada em membranas de microfibras de vidro com porosidade de  $1,2\mu\text{m}$  (Sartorius GMF 3) e posteriormente autoclavada a  $120^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, para se evitar a contaminação das culturas com outros organismos. O pH foi ajustado para 6,9. A água dos cultivos foi sendo gradativamente substituída por água reconstituída (U.S. EPA, 1991) com  $44\text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$  de dureza e pH aproximadamente 6,9. Esta é mais adequada para estudos envolvendo metais, uma vez que imita as condições naturais, porém apresenta menor conteúdo de contaminantes. Os organismos foram mantidos sob condições laboratoriais controladas, com temperatura constante de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12/12 horas claro/escuro além de aeração constante nos recipientes de cultivo. A água de cultivo foi renovada a cada vinte dias.

## 3.2 Metais

### 3.2.1 Experimento de Contaminação Alimentar

Dados bionômicos de *Ceriodaphnia cornuta*, tais como tempo de desenvolvimento embrionário, tempo de desenvolvimento pós-embrionário, crescimento, fecundidade, porcentagem de eclosão e intervalo na produção de ovos foram obtidos em laboratório. Buscou-se assim avaliar o estresse provocado pelo cobre no ciclo de vida dos organismos. Também foi investigada a captura de metal pelos mesmos, visto que foi simulado neste experimento uma contaminação crônica a partir do alimento contaminado. Foi utilizado alimento (*Selenastrum capricornurum*) contaminado com duas concentrações de cobre:  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ M.

Além dos tratamentos com cobre, foram realizados dois experimentos controle contendo algas livres de metal, sendo um deles com água sintética e o outro com água do ambiente natural, filtrada e autoclavada. Desta forma, as adaptações dos indivíduos à presença da água reconstituída de uma dureza inferior à do ambiente a qual eles estavam acostumados também foi investigada. A água reconstituída dos experimentos seguiu as normas da U.S. EPA (U.S. EPA, 1991). Estes tratamentos foram realizados em tubos de ensaio de vidro, enquanto os tratamentos com cobre foram realizados em copos de Becker de policarbonato, reduzindo desta forma a adsorção do cobre às paredes dos recipientes.

Para o acompanhamento do ciclo de vida dos animais, foram isoladas fêmeas ovadas de *C. cornuta* e, após a eclosão, as neonatas foram individualizadas nos recipientes de cultivo. Os recipientes continham 50 ml de meio de cultivo e o alimento foi fornecido à concentração de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Para cada tratamento foram feitas 10 réplicas. Durante o experimento, os indivíduos que morriam por condições estocásticas eram substituídos por novas neonatas.

As variáveis bionômicas foram observadas em intervalos de 12 horas, evitando ao máximo as condições de estresse ao indivíduo. Os indivíduos tiveram seu comprimento linear medido diariamente (crescimento somático). O alimento foi ressuspendido com uma pipeta de Pasteur a cada 12 horas, uma vez que as algas

decantadas tornam-se indisponíveis aos organismos. A troca de água e alimento foi feita a cada 48 horas.

Os acompanhamentos das fases de desenvolvimento e crescimento dos organismos foram realizados com o auxílio de um estéreo microscópio (Leica MZ6), que possuía uma régua micrométrica na ocular.

### **3.2.2 Metal Particulado**

#### **3.2.2.1 Nas microalgas :**

A extração do cobre celular foi baseada na metodologia descrita por Lombardi *et al* (2002).

Três ml de cultura foram filtrados usando filtros de membrana pré lavados , em seguida foram secos em estufa a 65°C durante 24 horas e congelados até a extração do cobre particulado. O filtro foi digerido usando-se dez mL de uma solução 3:1M de HNO<sub>3</sub>/ HCl (J. T. Baker) ultrapuros. O cobre total acumulado nas algas que serviram de fonte alimentar para o zooplâncton foi determinado através de espectroscopia de adsorção atômica. Para o procedimento foram usados ácidos ultrapuros.

#### **3.2.2.2 Nos organismos zooplanctônicos:**

As determinações de metal total particulado nos organismos zooplanctônicos se procedeu da seguinte forma: Ao final de seu ciclo de vida, os indivíduos foram colocados em filtros de acetato celulose com abertura de poro de 0,45µm, filtros estes previamente lavados em HNO<sub>3</sub>1M e secos em estufa por 24horas. Os filtros foram colocados em frascos de teflon com tampa e 200 µl de HNO<sub>3</sub> ultra puro (J.T. Baker) foram adicionados. Após este procedimento os frascos permaneceram em estufa a 90°C, para digestão do filtro. Após 48 horas, as amostras foram lidas no polarógrafo (Eg& G Instruments, modelo 303 ASMDE ), pelo método da polarografia de pulso diferencial obtendo-se assim a quantidade de metal particulado acumulado nos indivíduos. Para o conhecimento das concentrações de metal acumuladas em cada indivíduo foi aplicada a relação comprimento/peso:

$$W = \alpha \cdot L^b$$

Onde  $L$  é o comprimento (mm),  $W$  peso seco ( $\mu\text{g}$ ) e  $a$  e  $b$  são constantes obtidas a partir de um gráfico peso versus comprimento.

### **3.2.3. Metal livre**

O cobre livre na água foi determinado segundo a técnica de potenciometria descrita em Lombardi & Vieira (2000) utilizando-se eletrodo seletivo à íons cobre (ORION, modelo 94-29, boston, MA, USA). O tempo de equilíbrio foi determinado de acordo com a resposta do eletrodo. Para uma concentração nominal na ordem de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  M se respeitou o tempo normalmente requerido de 3 horas.

Estes valores foram averiguados pelo fato de se haver uma necessidade de constatar que o cobre livre no meio seria o mínimo possível.

### **3.3. Análise dos resultados**

Tratamento estatístico: os resultados com distribuição normal foram tratados com o teste T de Student, enquanto que para os dados sem distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para análise dos resultados foi utilizado o software Graphpad InStat 3.00.

#### 4. RESULTADOS

Para se avaliar os efeitos de uma contaminação crônica por cobre através da ingestão de alimento (*Selenastrum capricornutum*) contaminado, a história de vida dos animais (*Ceriodaphnia cornuta*) foi avaliada acompanhando-se os parâmetros: *idade da primípara (dias)*, *comprimento da primípara (mm)*, *número total de ovos por fêmea*, *número total de neonatas por fêmea*, *% de eclosão*, *tempo de desenvolvimento embrionário (dias)*, *intervalo na produção de ovos (dias)*, *comprimento final máximo (mm)*, e *longevidade (dias)*. A Tabela I apresenta os resultados obtidos a partir do tratamento dos dados obtidos (médias, desvio padrão e coeficientes de variação).

Foram obtidas diferenças significantes entre os quatro tratamentos testados: controle com água reconstituída, controle com água natural, animais alimentados com a microalga *Selenastrum capricornutum* contaminada com cobre em concentração de  $10^{-7}$ M, e animais alimentados com *Selenastrum capricornutum* contaminado com cobre em concentração de  $10^{-6}$ M.

As microalgas contaminadas com uma concentração nominal de cobre de  $10^{-7}$ M absorveram um total de cobre de  $1,0 \times 10^{-13}$  g Cu.célula<sup>-1</sup>, enquanto que aquelas contaminadas com  $10^{-6}$ M absorveram aproximadamente  $2,0 \times 10^{-13}$  g Cu.célula<sup>-1</sup>, ou seja, o dobro. Considerando que os animais foram alimentados a uma taxa de  $10^6$  células de *Selenastrum capricornutum* em dias alternados (a cada 48 horas), estes valores equivalem a uma taxa total de  $5 \times 10^{-8}$  g cobre/dia na forma de alimento contaminado fornecido e  $1 \times 10^{-7}$  g cobre/dia, respectivamente (Tabela II). Para se ter certeza de que a contaminação por cobre encontrava-se presente somente no alimento, e não na água onde os animais eram cultivados, foram feitas determinações de cobre livre na água. Estes valores foram extremamente baixos ( $10^{-10}$  M de cobre livre para os frascos com  $5 \times 10^{-8}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> e  $10^{-9}$  M de cobre livre para os frascos com  $1 \times 10^{-7}$  g Cu/dia<sup>-1</sup>), próximas àquelas presentes no ambiente natural ( $10^{-8}$ M Cu total e  $10^{-13}$ M Cu livre) de onde *Ceriodaphnia cornuta* foi isolada (Represa de Barra Bonita).

Os animais cultivados no experimento controle com água reconstituída e água natural, apresentaram idade na primípara (Figura 2) estatisticamente diferente e maior

do que aqueles submetidos aos tratamentos com contaminação alimentar ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis).

O comprimento dos animais na primípara foi significativamente menor quando confrontado o tratamento  $5 \times 10^{-8}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> com os demais tratamentos ( $p < 0,001$ , ANOVA), no entanto os tratamentos controle não demonstraram diferença significativa quando comparados entre si e com o tratamento  $1 \times 10^{-7}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ , ANOVA).

O número total de neonatas (Figura 4) e o número total de ovos foram significativamente diferentes para os quatro tratamentos ( $p < 0,001$ , ANOVA), sendo que a maior quantidade de ovos foi observada para o tratamento  $1 \times 10^{-7}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> e a menor para o tratamento controle com água reconstituída.

A porcentagem de eclosão (Figura 5) não foi significativamente diferente quando comparados os controles (água reconstituída e água natural) com aqueles que receberam alimento contaminado ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis).

O tempo de desenvolvimento embrionário e intervalo de produção de ovos do controle com água reconstituída foram estatisticamente semelhantes aos submetidos à contaminação alimentar ( $p > 0,05$ , Kruskal-Wallis). No entanto, foi obtida uma diferença significativa quando confrontado o tratamento controle feito com água natural e os tratamentos de contaminação alimentar ( $p < 0,01$ , Kruskal-Wallis).

As análises estatísticas dos dados mostraram que os animais do controle feito com água natural cresceram (crescimento final) mais do que aqueles cultivados na água reconstituída, que por sua vez cresceu de modo semelhante àqueles submetidos a uma contaminação de cobre de  $1 \times 10^{-7}$  g Cu/dia ( $p < 0,01$ , Kruskal-Wallis). Já os animais cultivados com contaminação alimentar de  $5 \times 10^{-8}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> apresentaram crescimento maior do que todos os outros testes realizados ( $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis), (Figura 3).

A longevidade dos animais foi significativamente maior para os tratamentos com cobre em relação ao tratamento controle com água reconstituída ( $p < 0,001$ , ANOVA). Já, o tratamento controle com água natural não apresentou diferença significativa quando comparado ao tratamento que recebeu alimento contaminado em taxa de  $5 \times 10^{-8}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ , ANOVA). No entanto, quando comparado com o tratamento que

recebeu  $1 \times 10^{-7}$  g Cu/dia<sup>-1</sup>, o controle com água natural apresentou menor crescimento ( $p < 0,01$ , ANOVA).

Os resultados de cobre particulado acumulado por *Ceriodaphnia cornuta* (Figura 6) durante os experimentos encontram-se descritos na Tabela II.

Durante o desenvolvimento experimental foram feitas observações sucessivas dos vários aspectos da bionomia dos animais. Estas observações resultaram em informações importantes sobre o efeito do cobre na história de vida de *Ceriodaphnia cornuta* para os dois tratamentos com o metal e nos auxiliam a focalizar a discussão para diferentes estratégias de vida em situações de estresse crônico, induzido por alimento contaminado.

Para os animais que receberam  $5 \times 10^{-8}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> foram encontrados os comportamentos/características descritos a seguir (10 réplicas).

1. Um indivíduo com a abertura da carapaça deformada e com problemas na reprodução. Este apresentou três formações de ovos incompletas, no caso abortivas, não produziu descendentes durante todo seu ciclo de vida, e teve seu crescimento estagnado em 0.5228 mm a partir do oitavo dia. Além disso sua longevidade foi curta, com 19 dias.
2. Dois indivíduos apresentaram pontos pretos em sua carapaça. Em um animal, este ponto foi detectado no sétimo dia de vida, enquanto que em outro o ponto preto foi detectado no segundo dia.
3. Um indivíduo apresentou deformidades em sua carapaça morrendo no sétimo dia sem produzir descendentes.

Observações semelhantes para os experimentos contaminados com  $1 \times 10^{-7}$  g Cu/dia<sup>-1</sup> mostraram os seguintes comportamento/características (10 réplicas):

1. Dois indivíduos com a carapaça deformada e com problemas na reprodução, um apresentou três formações de ovos incompletas (abortivas), e teve seu crescimento estagnado em 0.5048 mm a partir do oitavo dia. Além disso, sua longevidade foi de dez dias. O outro indivíduo apresentou oito formações de ovos incompletas (abortivas),

teve seu crescimento estagnado em 0.504 mm a partir do nono dia, e sua longevidade foi de 33 dias.

2. Um indivíduo com a carapaça deformada, morrendo aos cinco dias sem produzir ovos.

3. Três indivíduos apresentaram pontos pretos em sua carapaça, um aos 24 dias de vida morrendo três dias depois, o segundo aos nove dias, morrendo com a carapaça deformada e com baixo comprimento final, e o terceiro apresentou pontos pretos aos dois dias de vida e permaneceu com vida.

4. Seis neonatas de fêmeas diferentes apresentaram bolhas em suas carapaças morrendo logo após ao nascimento.

## 5. DISCUSSÃO

Os parâmetros bionômicos ou da história de vida, tais como longevidade, idade da primípara, comprimento da primípara, desenvolvimento embrionário, crescimento somático e número de descendentes são critérios comumente usados para avaliar o efeito de poluentes em organismos zooplancônicos. No entanto, poucos trabalhos utilizam parâmetros bionômicos para verificar o efeito de alimentos contaminados com metais pesados sobre organismos do zooplâncton. Partindo-se do princípio de que tais parâmetros refletem as respostas dos animais a agentes ambientais e portanto são passíveis de modificação (Threlkeld, 1987), e centrado nos efeitos de uma contaminação alimentar crônica, o presente estudo analisou cada parâmetro bionômico em *Ceriodaphnia cornuta* frente à contaminação de seu alimento (*Selenastrum capricornutum*).

O papel das diferentes estratégias em histórias de vida das *Ceriodaphnias* não tem sido muito estudado do ponto de vista ecotoxicológico. Entretanto, este tipo de estudo pode fornecer indicações do nível de contaminação ambiental, uma vez que as estratégias podem refletir uma tentativa do indivíduo em superar o estresse causado pelo agente contaminante.

De maneira geral, as diferenças em estratégias nas histórias de vida obtidas para os diversos tratamentos aos quais *Ceriodaphnia cornuta* foi submetida no presente estudo foram evidentes. Respostas distintas foram obtidas frente a diferenças na contaminação alimentar. Os animais tratados com alimento contaminado em taxa de  $5 \times 10^{-8}$  g cobre/dia<sup>-1</sup> superaram os efeitos deletérios do metal investindo em crescimento somático, enquanto que os animais tratados com alimento contaminado em taxa de  $1 \times 10^{-7}$  g<sup>-1</sup> cobre/dia empregaram sua energia na reprodução. Verificou-se então, que a concentração de cobre influenciou a forma de alocação de energia do organismo, se em reprodução ou crescimento somático.

Diferenças em estratégias de vida em dafinídeos em situações de estresse já foram verificadas por outros autores, seja este estresse ocasionado por uma predação exaustiva (Abrantes e Gonçalves, 2003; Caraballo, 1992; Lynch, 1980) ou pela

interação sinérgica ente um metal (cádmio) e o alimento (Chandini, 1989). As opções de estratégias de vida demonstradas pelos animais do presente estudo que receberam alimento contaminado com cobre podem ser classificadas, de acordo com Caraballo (1992), de duas maneiras:

- a) Espécies com um maior comprimento da primípara, que depois da maturidade canalizam a energia para a reprodução, como ocorreu com os animais do presente estudo alimentados com *Selenastrum capricornutum* contaminada com  $1 \times 10^{-7}$  g cobre/dia<sup>-1</sup>;
- b) Animais que atingem a maturidade rapidamente, com um menor comprimento linear na primípara, e posteriormente alocam suas reservas energéticas para o crescimento somático, como foi verificado nos animais do presente estudo alimentados com *S. capricornutum* contaminada com  $5 \times 10^{-8}$  g cobre/dia<sup>-1</sup>.

O presente estudo mostrou que a taxa de reprodução em animais tratados com alimento contaminado com cobre foi superior àquela dos indivíduos dos controles. Antes de justificar tal comportamento, deve ser observado que estes resultados não refletem uma maior saúde dos animais tratados com alimento contaminado, uma vez que foram observados efeitos deletérios nos seus descendentes. Como exemplo pode-se citar neonatas nascidos mortos, alterações nos indivíduos adultos (deformações nas carapaças e manchas), menor porcentagem de eclosão, além de deficiências nutritivas resultando em não postura de ovos durante toda a vida de alguns indivíduos.

Alguns fatores poderiam fundamentar uma maior produção de ovos nos animais tratados com o metal, no entanto, sabe-se pouco sobre os efeitos de uma contaminação alimentar crônica sobre a bionomia de organismos do zooplâncton. Sabe-se que células de microalgas cronicamente estressadas por razões nutricionais e de luminosidade acumulam grande quantidade de lipídios (Lombardi e Wangersky, 1991; Parrish e Wangersky, 1987). Se, de maneira similar, células de microalgas cronicamente estressadas por um metal-nutriente tal qual o cobre, acumularem lipídios, então poderia estar havendo uma maior ingestão de material nutritivo pelo zooplâncton

através do alimento contaminado. De fato, há dados da literatura que mostram alteração no metabolismo de lipídios mediante estresse induzido por metais (Cu, Zn e Cd) em células de *S. capricornutum* (McLarnon-Riches *et al*, 1998). Desse modo, poderia ser esperada uma maior produção de ovos pelos organismos contaminados. Outro fato que poderia justificar tal aumento na produção de ovos, seria a simples alocação de energia para a reprodução por parte do zooplâncton, quando este percebe-se em situação desfavorável.

No presente estudo, os organismos cultivados com água reconstituída (controle) apresentaram, em algumas situações, respostas que nos remetem para uma situação de estresse. De maneira semelhante, diversos autores também encontraram problemas em experimentos com água reconstituída. Abrantes e Gonçalves (2003) obtiveram resultados considerados insatisfatórios para *C. pulchella*, tais como maturação mais lenta, menor comprimento, baixo número de ovos, baixa longevidade, menor comprimento na maturidade. Girling & Garford (1989), usando água reconstituída em seus estudos de comparação de meios de cultivo para *Daphnia magna*, obtiveram resultados inferiores nos organismos dos tratamentos com água reconstituída em relação aos animais dos tratamentos com água natural. Santos (2004), em diferentes tratamentos para *Ceriodaphnia silvestrii*, também observou resultados insatisfatórios nos tratamentos com água reconstituída.

Outro aspecto que pode ter influenciado negativamente o tratamento controle com água reconstituída, é o fato deste ser um meio sintético puro, livre de bactérias e matéria orgânica. Caraballo (1992), Vijgverberg (1989) e Jayatunga (1986), concluíram que cladóceros não se desenvolvem bem em culturas puras, mas sim em culturas contendo bactérias e matéria orgânica. Isso pode explicar o fato de que os animais do tratamento controle com água natural apresentaram melhores resultados para os parâmetros bionômicos em comparação com os animais no tratamento com água reconstituída.

Comprimento e fecundidade na primípara fornecem indícios importantes sobre as condições nutricionais, temperatura, pressão e predação no ambiente (Melão, 1999).

O comprimento da primípara pode ser alterado fenotipicamente pelos dafnídeos (Abrantes & Gonçalves, 2003), podendo ser reduzido com variação alimentar. Valores semelhantes àqueles obtidos no presente estudos podem ser encontrados em outros estudos. Bottrell (1975) e Choueri (2004) mostraram que há variação no comprimento da primípara em função do tipo de alimento ingerido pelo zooplâncton.

O comprimento da primípara para ambos os tratamentos com cobre demonstrou ser um importante traço para o “fitness” dos animais em tais situações, uma vez que os organismos responderam ao estresse do metal com um maior comprimento da primípara. Além disso foi observado um adiantamento na idade da primípara. A união destes dois aspectos (comprimento e idade da primípara) confirma a situação de estresse induzida pela presença de cobre introduzido através de contaminação alimentar, ainda que em baixa concentração. Estes resultados confirmam outros da literatura, que mostram que estresse induzido por metais resultam em uma alteração da maturidade em organismos do zooplâncton (Chandini, 1989; Koivisto & Ketola, 1995). Sabe-se ainda que em situações de estresse alimentar, dafnídeos normalmente alocam toda sua energia para a produção de ovos, que processa-se de maneira imediata (Lynch, 1980; 1983).

A idade da primípara nos animais dos tratamentos controle está de acordo com dados da literatura. Javatunga (1986) obteve valor médio de idade de primíparas de *Ceriodaphnia cornuta* em torno de 3,3 dias quando cultivadas em uma temperatura de 32°C e utilizando 1,0 mg C L<sup>-1</sup> de alimento. Melão (1999), em temperatura de 25°C e utilizando *Scenedesmus sp* como fonte alimentar, obteve o valor de 3,86 dias para idade de primíparas do mesmo organismo. Investigando os aspectos bionômicos de *C. cornuta* mantida a 25°C e alimentada com exopolissacarídeos da cianobactéria *Anabaena spiroides*, Choueri (2004) registrou uma idade média de primíparas de 3,63 dias.

Tem sido demonstrado (Munro & Whete, 1975 apud Bottrell *et al*, 1976) que diferenças no tempo de desenvolvimento embrionário podem estar relacionadas a diferenças de tamanho dos ovos, sendo que ovos maiores estão relacionados a tempos de desenvolvimento embrionário maiores. No presente estudo, o tempo de

desenvolvimento embrionário foi um dos aspectos bionômicos que não foi afetado mediante a contaminação alimentar com cobre. Caraballo (1992) obteve resultados semelhantes ( $1,27 \pm 0,05$  dias) ao do presente estudo quanto ao tempo de desenvolvimento embrionário para *C. cornuta* quando o organismo foi cultivado a uma temperatura de 29°C. Melão (1997) obteve tempo de desenvolvimento embrionário de 1,66 dias para *C. cornuta* quando mantida a 25°C. Choueri (2004) encontrou valores de 1,36 e 1,47 dias para o tempo de desenvolvimento embrionário de *C. cornuta* cultivada a 25°C.

Diversas características fenotípicas foram observadas durante os tratamentos com o cobre, características estas não observadas em qualquer um dos tratamentos controle. Indivíduos com carapaças mais abertas do que normal (comparando-se com os controles) foram observados com relativa frequência. Sabe-se que modificações na carapaça refletem uma estratégia específica de sobrevivência e superação ao estresse (Maciej & Siedlar, 1980). Estes autores registraram uma diminuição na abertura da carapaça em dafinídeos que sobreviveram a florações de algas tóxicas.

Outra característica observada nos experimentos contaminados com cobre e não observada no controle foi a presença de fêmeas que não atingiram a maturidade, desse modo não produzindo descendentes durante todo o período de vida. O efeito tóxico do metal pode ter afetado as gônadas dos indivíduos ou afetado severamente suas taxas de filtração, limitando a ingestão do alimento. O alimento consumido produziria, então, energia apenas para manter os requerimentos metabólicos. Dessa maneira a maturação dos juvenis tornar-se-ia impossível. Esta hipótese é particularmente apresentada e discutida em Hall, (1964); Rocha (1983) e Jayatunga (1986). Chandini (1989) observou em *Daphnia carinata* que, em contaminações com cádmio, algumas fêmeas apresentaram o mesmo comprimento final de outros indivíduos não expostos ao metal, mas não produziram neonatas durante todo seu ciclo de vida.

A concentração de cobre por unidade de biomassa (mg cobre. g de animal seco<sup>-1</sup>) está de acordo aos valores comumente encontrados na literatura (Choueri, 2004). No entanto, como não se conhece ainda o destino final de um íon metálico dentro dos animais, presume-se que o metal presente no alimento seja liberado dentro do trato

intestinal devido à sua natureza ácida. Em seguida o metal pode ser assimilado ou excretado junto com as fezes do animal. Capacidade de detoxificação de metal em diferentes organismos aquáticos têm sido amplamente relatadas na literatura. Blasco, Arias & Sáenz (2002) verificaram que a concentração de cobre e zinco no corpo *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda), coletados em diferentes pontos com diferentes concentrações de metais, não variavam significativamente sugerindo alguma capacidade de regulação dos organismos para os metais. Timmermans (1993) verificou uma situação semelhante para organismos bentônicos afetados por contaminações do metal cobre. Rainbow & White (1989) obtiveram dados que sugerem a regulação da concentração de cobre em *P. elegans*. Borgmann *et al.* (1993) concluíram que *Hyaella azteca* é capaz de regular o cobre durante longos períodos de tempo. Em acordo com os dados da literatura supra citada, o presente estudo mostrou que a concentração de metal acumulado nos organismos permaneceu praticamente constante durante todo o período experimental, ainda que os animais foram contaminados a uma taxa de  $5 \times 10^{-8}$  gCu/dia e  $1 \times 10^{-7}$  gCu/dia durante um período total que variou de 25 a 32 dias. Concluiu-se deste estudo que *Ceriodaphnia cornuta* apresenta capacidade de regular a concentração de cobre interna.

## 6 CONCLUSÕES

Embora o zooplâncton seja pouco usado como um indicador de sistemas, sua importância não pode ser ignorada no que diz respeito a evolução do enriquecimento de metais em cadeias alimentares. O presente estudo demonstrou que, apesar do animal ter sido submetido a uma contaminação crônica e ter mostrado ser capaz de regular a concentração corpórea do metal, efeitos significativos foram detectados em sua história de vida. A ingestão da microalga *Selenastrum capricornutum* contaminada com íons cobre por *Ceriodaphnia cornuta* influenciou diretamente o ciclo de vida, as estratégias de história de vida e a saúde desses animais, resultando até em nascimento de indivíduos mortos. Considerando que o zooplâncton forma o segundo nível trófico em cadeias alimentares em ambientes aquáticos, tais alterações podem modificar a dinâmica desses ecossistemas.

Os resultados deste estudo demonstraram que a água reconstituída não é um meio ideal para o cultivo de cladóceros. Porém, seu uso é bastante comum devido à sua pureza e a possibilidade de controle de suas características, fatores relevantes em estudos de laboratório. Em se tratando de estudos com metais, o emprego de água com alta pureza é fundamental, pois agentes contaminantes e quelantes de metais encontram-se presentes na maioria das águas oriundas do ambiente natural. Estes agentes causariam modificações indesejadas nos resultados experimentais, e por isso indica-se a água reconstituída apesar dos problemas apontados no presente estudo.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. (2003) The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecol.**, Paris, v. 24, p. S245-S249.
- AMARASINGLE, P. B.; BORSMA, M.; VIJVERBERG, J. (1997) The effect of temperature, and quality on the growth and development rates in laboratory – cultured copepods and cladocerans from a Sri Lankan reservoir. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 350, p. 131-144.
- ARCIFA, M. S., O.; FROEHLICH, T.G.; NORTHCOTE. (1988) Distribution and feeding ecology of fishes in a tropical Brazilian reservoir. **Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle**, [S.l.], v. 48, p. 301-326.
- BAUDO, R. (1987) Ecotoxicological testing with *Daphnia*. **Mem. Ist. Ital. Idrobiol.** [S.l.], v. 45, p. 461-482.
- BLASCO J.; ARIAS, A. M.; SÁENZ, V. (2002) Heavy metal concentrations in *Squilla mantis* (L.) (Crustacea, Stomatopoda) from the Gulf of Cádiz: Evaluation of the impact of the Aznalcollar mining spill. **Environ. Int.**, [S.l.], v. 28, p. 111 –116.
- BORGMANN, U., NORWOOD, W. P., CLARKE, C. (1993) Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. **Hydrobiologia**, Dordrecht ,v. 259, p. 79-89.
- BOTTRELL, H. H. (1975) Generation time, length of life, instar duration and frequency of moulting, and their relationship to temperature in eight species of Cladocera from the River Thames, reading. **Oecologia**, Berlin, v. 19, p. 129-140.
- BOTTRELL, H. H. et al. (1976) A review of some problems in zooplankton production studies. **Borw. J. Zool.**, [S.l.], v. 24, p. 419-456.
- CARABALLO, P. (1992) **História de vida e dinâmica e vida populacional de *Daphnia gessneri* e *Ceriodaphnia cornuta* (Crustacea, Cladocera) no lago calado, AM.** 145 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas.
- CHANDINI, T. (1989). Survival, grown and reproduction of *Daphnia carinata* (Crustacea, Cladocera) exposed to chronic cadimium stress at diferent food (Chorella) levels. **Environ. Pollut.**, Kidlington, v. 60, p. 29-45.
- CHOUERI, R. B. (2004) **Consumo e influência de exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) sobre a toxicidade e captura de cobre em *Ceriodaphnia cornuta* (Cladocera, Daphnidae).** São Carlos. 87 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos.

- EMSLEY, J. (1998) **The elements**. 3. Ed. Oxford: Claredon Press. p 62-63.
- GIRLING, A. E.; GARFORTH, B. M. (1989) Influence of variations in culture medium on the survival and reproduction of *Daphnia magna*. **Bull. Envir. Contam. Toxicol.**, [S.I.], v. 42, p. 119-125.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide-c. **J. Phycol.**, [S.I.], v. 8, p. 10-14.
- HALL, D. J. (1964) An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata* Mendotae. **Limnol. Oceanogr.**, Waco, v. 18, p. 331-333.
- JAYATUNGA, Y. N. A. (1986) **The influence of food and temperature on the life cycle characteristics of tropical cladoceran species from Kalawewa Reservatoir, Sri Lanka**. London. Tese (Doutorado) - University of London.
- KOIVISTO, S.; KETOLA, M. (1995). Effects of copper on life-hystory traits of *Daphnia pulex* and *Bosmina longirostris*. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 32, p. 255-269.
- LE CREN, E. D., LOWE-MCCONNELL, R. H. (1980) **The functioning of freshwater ecosystems**. Cambridge: Cambridge University Press. 588 p.
- LOMBARDI, A. T.; WANGERSKI, P.J. (1991) Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in the turbidostat cage cultures. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, Oldendorf, v. 77, p.39-47.
- LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. (2000) Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia.**, Lawrence, v. 39, p. 118-125.
- LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, L. A. (2002) Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales), **J. Phycol.**, Lawrence, v. 38, p. 332-337.
- LYNCH, M. (1980) The evolution of cladoceram life histories. **Q. Rev. Biol.**, Chicago, v. 55, p. 23-42.
- \_\_\_\_\_. (1983) Estimation of size-specific mortality rates in zooplankton population by periodic sampling. **Limnol. Oceanogr.**, Waco, v. 28, n. 3, p. 533-545.
- MACLARNON – RICHES, C. J.; GREENWAY, D. L. A.; ROBINSON, P. K. (1998) Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. **Phytochemistry.**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 1241-1247.

MELÃO, M. G. G. (1999). **A comunidade planctônica (fitoplâncton e zooplâncton) e produtividade secundária do zooplâncton de um reservatório oligotrófico**. São Carlos. 152 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.

PARRICH, C.C., WANGERSKY, P. J. (1987) Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* grown in cage cultures turbidostats with a range of nitrogen supply rates. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** Oldendorf, v. 35, p. 119-128.

PAYNE, A. I. (1986) **The ecology of tropical lakes and rivers**. Chichester: John Wiley. 301 p.

RAINBOW, P.S.; DALLINGER, R. (1993) Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: DALLINGER R.; RAINBOW P.S. (Eds.). **Ecotoxicology of metal in invertebrate**. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 119-131.

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

REINFELDER, J.R.; FISHER, N. S.; LUOMA, S. N.; NICHOLS, J. W.; WANG, W. X. (1998) Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. **Sci. Total Environ.**, [S.l.], v. 219, p.117-135.

ROCHA, O. (1983) **The influence of food temperature combinations on the duration of the development, body size, grown and fecundity of *Daphnia* Species**. London. 337 f. Tese (Doutorado) - Royal Holloway College.

\_\_\_\_\_. (2000) A poluição química e a biodiversidade. In: ENCONTRO DE ECOTOXICOLOGIA. ECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL: PERSPECTIVAS PARA O SÉCULO XXI. São Carlos. **Resumos...** São Paulo:USP. p. 25.

SANTOS, M. A. P. F. (2004) **Influência de substâncias húmicas nas características bionômicas, toxicidade e bioacumulação de cobre por *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera)**. São Carlos. 102 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., ROCHA, O. (1988) Estudo do crescimento das larvas de *Oreochromis niloticus* alimentadas exclusivamente com algas e zooplâncton cultivados em laboratório. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE AQUICULTURA, 6., Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.]. p. 453-458.

\_\_\_\_\_. (1994) Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para a alimentação de larvas e alevinos de peixes: I-algas clorofíceas. **Biotemas**, [S.l.], v. 6, p. 11.

TAYLOR, G.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V. (1998). Surface binding contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. **Environ. Toxicol. Chem.**, Pensacola, v. 17, n. 3, p. 412-419.

THRELKELD, S. T. (1987) *Daphnia* life history strategies and resources, allocation patterns. In R.H. Peters and R. De Bernardi (Eds.). **Mem. Ist. Ital. Idrobiol.**, [S.l.], v. 45, p. 353-366.

TIMMERMANS, K. R. (1993) Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: DALLINGER, R.; RAIBOW, P. S. (Eds.). **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. [S.l.]: Lewis Publisher, p. 134-145.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1991) **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 4. Ed. [S.l.]: Weber. EPA-600/4-90/027.

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

WETZEL, R.G. (1981). **Limnología**. Barcelona: Omega. 679 p.

WOODWELL, G. M. (1974) Toxic substances and ecological cycles. In: **ECOLOGY evolution and population biology**. [S.l.]: Scientific American. 270 p.

# Anexos

Tabela I: Médias, desvio padrão e coeficiente de variação (%) dos parâmetros analisados da história de vida de *Ceriodaphnia cornuta* para os quatro tratamentos (n=10).

Variáveis Bionômicas	Controle Água Reconst.			Controle Água Natural			5x10-8gCu/dia			1x10-7gCu/dia		
	Média	Desv.Pad	C.V.	Média	Desv.Pad.	C.V.	Média	Desv.Pad.	C.V.	Média	Desv.Pad	C.V.
<b>Idade da primípara (dias)</b>	3,46	0,09	2,73	3,28	0,09	2,69	2,61	0,40	15,22	2,85	0,57	19,92
<b>Comp. da primípara (mm)</b>	0,420	0,020	5,470	0,44	0,010	2,54	0,377	0,020	5,300	0,418	0,020	4,650
<b>N ovos total/fêmea</b>	25,57	3,69	14,43	61,25	15,59	25,45	80,89	11,43	14,13	118,50	21,05	17,76
<b>N neonatas total/fêmea</b>	25,49	4,22	16,78	61,25	15,59	25,45	79,20	11,17	14,00	113,60	20,59	17,77
<b>Eclosão (%)</b>	99,71	0,76	0,76	100,00	0,00	0,00	97,82	2,17	2,22	96,99	2,45	2,53
<b>Tempo desenv. embrion. (dias)</b>	1,50	0,13	8,43	1,70	0,13	7,40	1,41	0,06	4,13	1,43	0,04	2,75
<b>Interv. Prod. Ovos (dias)</b>	1,50	0,13	8,43	1,70	0,13	7,40	1,41	0,06	4,13	1,43	0,04	2,75
<b>Comprimento máximo (mm)</b>	0,564	0,01	1,67	0,69	0,03	4,83	0,72	0,02	2,36	0,648	0,01	1,91
<b>Longevidade (dias)</b>	20,14	1,68	8,32	27,5	3,34	12,14	25,89	2,37	9,15	31,50	1,84	5,84

Tabela II: Concentração de cobre capturado por *Ceriodaphnia cornuta* ( $\eta\text{g Cu.}\mu\text{g PS}^{-1}$ ) e acumulada pelas células de *Selenastrum capricornutum* ( $\eta\text{g Cu.célula}^{-1}$ ).

Tratamentos	$\eta\text{g Cu.}\mu\text{g PS}^{-1}$ de animais	$\eta\text{g Cu.célula}^{-1}$		
		Média	Desv Pad	C.V.
Controle Água Reconstituída	3,34E-1	Abaixo do limite de detecção	-	-
Controle Água Natural	5,73E-1	Abaixo do limite de detecção	-	-
$5 \times 10^{-8}$ gCu/dia	4,45E-01	1,14E-04	2,43E-05	21,3
$1 \times 10^{-7}$ gCu/dia	1,04	1,93E-04	3,60E-05	18,7



Figura 1: Aspecto geral de uma fêmea de *C. cornuta*.

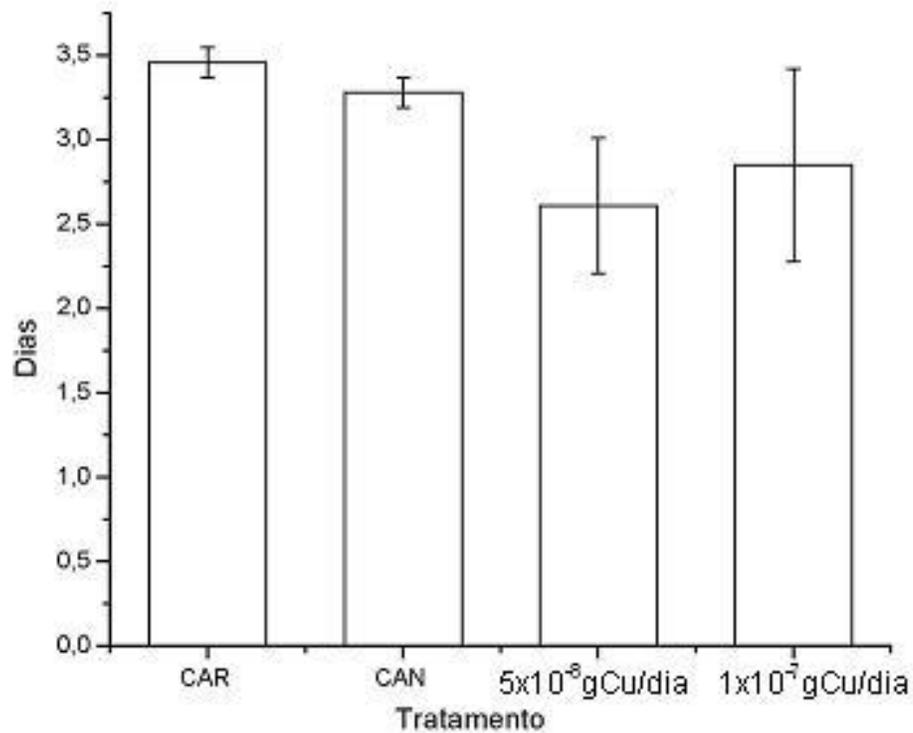


Figura 2: Idade da primípara dos animais (dias) para os quatro tratamentos; CAR = controle com água reconstituída; CAN = controle com água natural;  $5 \times 10^{-8} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado;  $1 \times 10^{-7} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado. Os valores representam a média e desvio padrão (n=10).

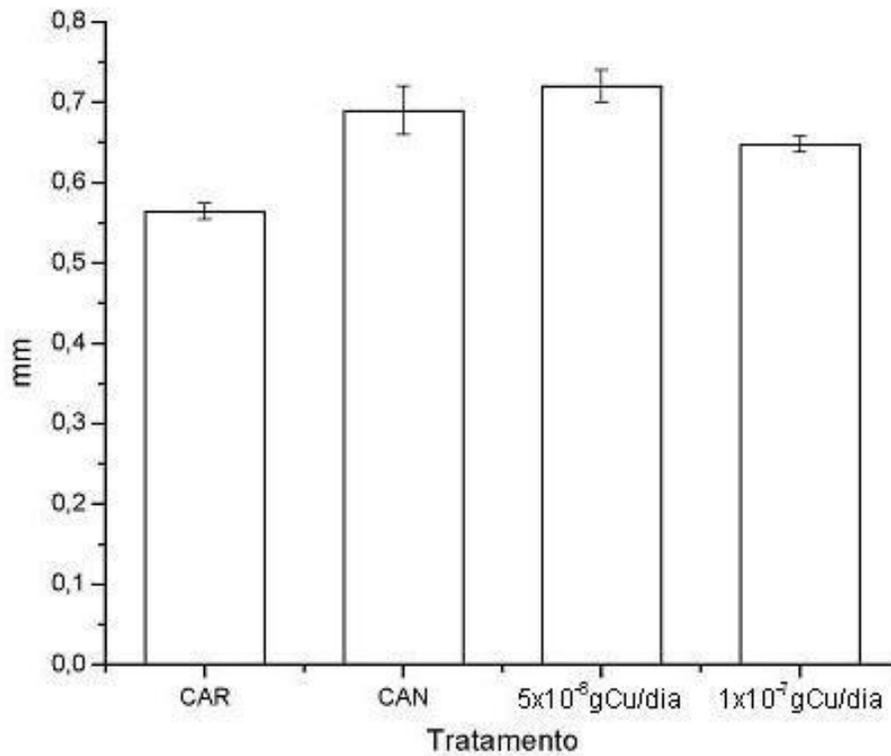


Figura 3: Comprimento máximo dos animais (mm) para os quatro tratamentos; CAR = controle com água reconstituída; CAN = controle com água natural;  $5 \times 10^{-8} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado;  $1 \times 10^{-7} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado. Os valores representam a média e desvio padrão (n=10).

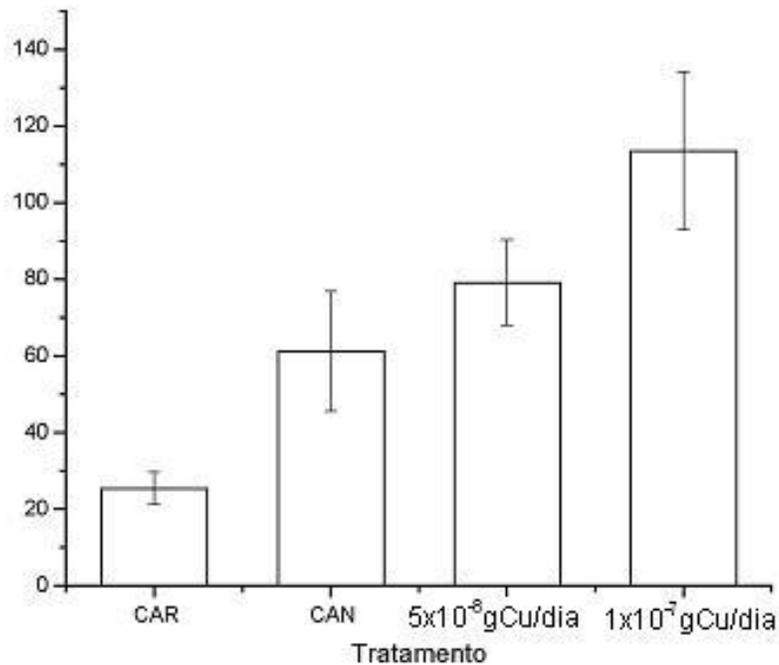


Figura 4: Número de descendentes produzidos para os quatro tratamentos; CAR = controle com água reconstituída; CAN = controle com água natural;  $5 \times 10^{-8} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado;  $1 \times 10^{-7} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado. Os valores representam a média e desvio padrão (n=10).

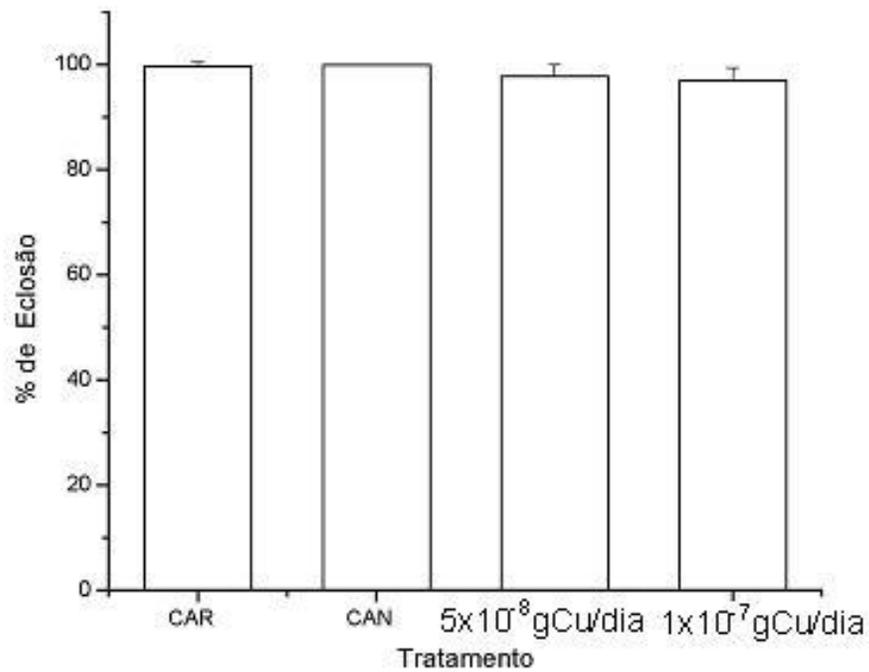


Figura 5: Porcentagem de eclosão para os indivíduos nos quatro tratamentos; CAR = controle com água reconstituída; CAN = controle com água natural;  $5 \times 10^{-8} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado;  $1 \times 10^{-7} \text{ gCu/dia}$  = em forma de alimento contaminado. Os valores representam a média e desvio padrão (n=10).

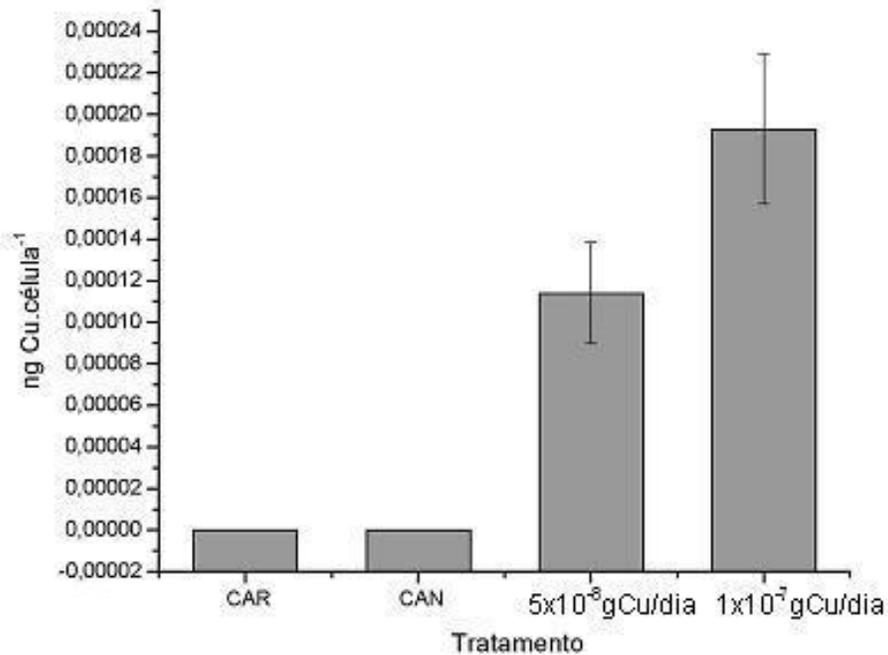


Figura 6: Concentração de cobre acumulado por célula de *Selenastrum capricornutum* (ng Cu.célula<sup>-1</sup>); quatro tratamentos; CAR = controle com água reconstituída; CAN = controle com água natural; 5x10<sup>-8</sup>gCu/dia = em forma de alimento contaminado; 1x10<sup>-7</sup>gCu/dia = em forma de alimento contaminado. Os valores representam a média e desvio padrão (n=10).

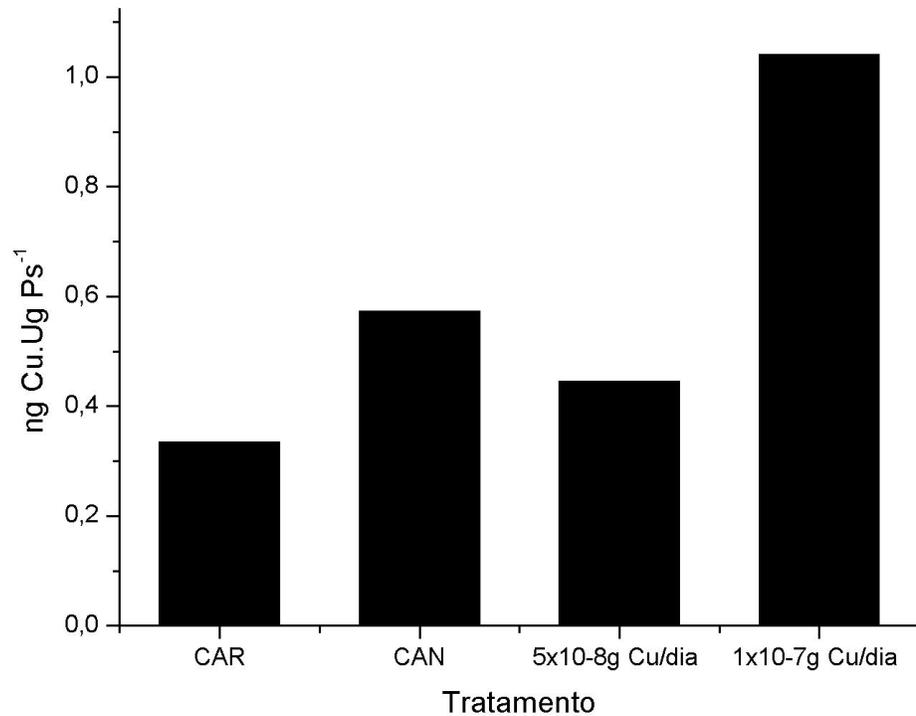


Figura 7: Concentração de cobre ( $\text{ng Cu} \cdot \mu\text{g PS}^{-1}$ ) capturado pelos organismos para os quatro tratamentos; CAR = controle com água reconstituída; CAN = controle com água natural;  $5 \times 10^{-8} \text{g Cu/dia}$  = em forma de alimento contaminado;  $1 \times 10^{-7} \text{g Cu/dia}$  = em forma de alimento contaminado ( $n=10$ ).