

JÉSSICA CRISTINA LUGO LADEWIG

**EFEITO DA MOD SOBRE A MOBILIDADE E TOXICIDADE DE COBRE
E ARSÊNIO EM *TETRASELMIS GRACILIS***

**PONTAL DO PARANÁ
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

JÉSSICA CRISTINA LUGO LADEWIG

**EFEITO DA MOD NA MOBILIDADE E TOXICIDADE DE COBRE E
ARSÊNIO EM *TETRASELMIS GRACILIS***

Monografia apresentada como requisito parcial a obtenção do título de Bacharel em Oceanografia com Habilitação em Pesquisa Científica, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

**PONTAL DO PARANÁ
2006**

**DEDICO ESTE TRABALHO
ÀQUELES QUE
ACREDITAM NA BELEZA
DE SEUS SONHOS.**

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Ana Teresa Lombardi, pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança e principalmente por ter acreditado em mim e no meu potencial e ter me aceito como sua orientada.

À Profa. Dra. Eunice da Costa Machado, pelas dicas, pela paciência, pela compreensão e principalmente pelo empréstimo tanto do laboratório quanto dos equipamentos, ambos essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos meus “co-orientadores”, Kleber e Marianna por me ajudarem nas inúmeras dúvidas, pelo apoio e orientação nos momentos críticos da monografia.

À Nilva e Liciane, pelas dicas, companhia e amizade durante as minhas passagens pelo laboratório de Biogeoquímica.

Ao pessoal do Laboratório de Ecotoxicologia e Biogeoquímica, pelas visitinhas, pelas conversas e bate-papos, pela alegria e por tornarem o laboratório um local de trabalho descontraído e confortável.

As melhores companheiras de Laboratório do Mundo Marianna e Manoela, pela amizade, companheirismo e paciência. Vocês foram como irmãs para mim.... Obrigado pelos bate-papos, conselhos e broncas. Lembrarei para sempre dos momentos felizes e estressantes que passamos nesses anos.....

À Stefanie (Fani), por ser minha amiga mesmo nos seus momentos de extremo mau-humor, por ser minha companheira nas madrugadas do CEM, pela amizade, confiança, por me agüentar, escutar meus desabafos, pelos nossos planos e operações (não deram muito certo, mas valeram) e por ser minha eterna vizinha!!!!

À Emanuelle (Manu), pela amizade, companheirismo, pela vizinhança agradabilíssima e por escutar minha “novelas” da vida real.

À Liana (Lia), pela imensa amizade comprovada, companheirismo e pelos planos futuros....

Aos amigos de longa data, Fernanda, Tacyana e Davi, pela grandessíssima amizade, paciência e apoio durante estes anos em Pontal.

À Terceira Turma de Ciências do Mar, vocês foram a minha segunda família tão longe de casa. Obrigado pelo carinho, alegrias, amizade e pelos inúmeros momentos de felicidade na presença de todos vocês. Com certeza foi um prazer imenso conhecer e fazer parte da vida de vocês, levarei todos vocês dentro do meu coração para sempre....

Aos meninos da sala, André, Carlos (Birigui), Daniel, Kassio e Luis Carlos (Junior), vocês foram poucos, mas presentes. Obrigado pela alegria, amizade e paciência.

Ao Juan, pelo amor, carinho, amizade e companheirismo. Obrigado pelos últimos meses de extrema felicidade e por ter trazido paz para um momento tão conturbado da minha vida. Nossos momentos serão eternos em minhas lembranças....

Às minhas grandes amigas, Marianna, Manoela, Stefanie, Emanuelle, Luana, Heliatrice, Liara, Luciana, Helenita, Liana, Ione, Maria Carolina, Andressa e Taiana, pelos anos de amizade, pelos bate-papos, apoio, risadas e pela adorável convivência.

A todos os amigos que fiz nesses cinco anos de graduação e a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho e que eu tenha esquecido de mencionar

À minha querida e amada família, Antônio, Terezinha, Luís, Ricardo, Sérgio, Roberto, Isabel e Jean, pelo apoio, amor e carinho.....

Aos meus irmãos, Rainer, Fabio e Karina, vocês foram muito importantes na minha jornada. Obrigado pelo amor, amizade, apoio, companheirismo e pela torcida. Amo vocês....

E, principalmente, aos meus pais Angela e Rainer, pelo amor, educação, apoio, pela confiança e por acreditarem nos meus sonhos. Amo muito vocês.

É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas.

Karl Marx

O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.

Thomas Huxley

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 CULTURAS DE ALGAS	7
3.2 CURVA DE CRESCIMENTO	8
3.3 DENSIDADE CELULAR	8
3.4 CLOROFILA-A	9
3.5 MOBILIDADE CELULAR.....	9
3.6 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS: COBRE E ARSÊNIO	10
3.7 MATERIAIS DE LABORATÓRIO E PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 CURVA DE CRESCIMENTO.....	12
4.2 MOBILIDADE CELULAR X COBRE	13
4.3 TOXICIDADE DE COBRE	15
4.4 MOBILIDADE CELULAR X ARSÊNIO	22
4.5 TOXICIDADE DO ARSÊNIO	24
4.6 TOXICIDADE DE COBRE X TOXICIDADE DE ARSÊNIO	30
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
6. BIBLIOGRAFIA.....	34
ANEXOS	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE ÁGUA SALGADA HARRISON <i>ET AL.</i> (1980), USADO NO PRESENTE ESTUDO. pH INICIAL AJUSTADO PARA 8,00.....	8
TABELA 02. VALORES DOS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS ATRAVES DAS EQUAÇÕES DE AJUSTE: TOXICIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL NO MEIO.....	19
TABELA 03. ESPECIAÇÃO DO COBRE NO MEIO DE CULTURA PARA <i>TETRASELMIS GRACILIS</i> SEGUNDO O MODELO MINEQL ⁺ . DO TOTAL DE COBRE ADICIONADO (CU NOMINAL), REPORTA-SE A CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA FORMA CU ²⁺ (MOL.L ⁻¹) COM MOD (MOD) E SEM MOD (*). AS FORMAS QUÍMICAS DO COBRE CU(OH) ₂ , EDTA E (CUOHEDTA) ⁻³ SÃO REPORTADAS EM VALORES PERCENTUAIS.....	20
TABELA 04. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (PH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE CUCL ₂ E NA AUSÊNCIA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).....	21
TABELA 05. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (pH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE CUCL ₂ E NA PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).....	21
TABELA 06. VALORES DOS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS ATRAVES DAS EQUAÇÕES DE AJUSTE: TOXICIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NOMINAL NO MEIO.....	28
TABELA 07. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (pH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE As(V) E NA AUSÊNCIA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).....	29
TABELA 08. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (pH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE As(V) E NA PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).....	30

TABELA 09. CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO MEIO. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).	45
TABELA 10. CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).	45

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01. PADRÃO DE CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM DUAS CULTURAS ESTANQUES (TC1 E TC2). FASES DE CRESCIMENTO: 1, FASE LAG; 2, FASE EXPONENCIAL; 3, FASE ESTACIONÁRIA.....12
- FIGURA 02. EFEITO DO COBRE NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS SEM ADIÇÃO DE MOD.....14
- FIGURA 03. EFEITO DO COBRE NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS COM ADIÇÃO DE MOD.....15
- FIGURA 04. CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE, FORNECIDO ATRAVÉS DE CLORETO DE COBRE. **A)** AUSÊNCIA DE MOD. **B)** PRESENÇA DE MOD CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA DE TRÊS RÉPLICAS.....16
- FIGURA 05. DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO MEIO. **(A)** AUSÊNCIA DE MOD. **(B)** PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).18
- FIGURA 06. EFEITO DO ARSÊNIO NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS SEM ADIÇÃO DE MOD.....23
- FIGURA 07. EFEITO DO ARSÊNIO NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS COM ADIÇÃO DE MOD.....24
- FIGURA 08. CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO, FORNECIDO ATRAVÉS DE AS(V). **A)** AUSÊNCIA DE MOD. **B)** PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA DE TRÊS RÉPLICAS.....26
- FIGURA 09. DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO. **(A)** AUSÊNCIA DE MOD. **(B)** PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).27
- FIGURA 10. CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD). CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA DE TRÊS RÉPLICAS.....31

FIGURA 11. DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO MEIO. (A) AUSÊNCIA DE MOD. (B) PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (72 H DE EXPOSIÇÃO).....	43
FIGURA 12. DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO. (A) AUSÊNCIA DE MOD. (B) PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (72 H DE EXPOSIÇÃO).....	44

RESUMO

As algas marinhas planctônicas constituem a base de cadeias alimentares e freqüentemente são expostas a contaminantes ambientais. Os metais e metalóides são naturalmente encontrados na maior parte dos diferentes segmentos integrantes dos sistemas aquáticos naturais. Contudo, o aumento da concentração desses elementos devido às atividades antrópicas pode provocar efeitos adversos aos ecossistemas e contribuir para a degradação ambiental. *Tetraselmis gracilis* é uma microalga freqüentemente utilizada para alimentar herbívoros marinhos na maricultura devido ao seu alto valor nutricional e à sua habilidade de crescer em condições físicas e químicas diversas. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar os efeitos da matéria orgânica dissolvida na toxicidade de cobre e arsênio sobre o desenvolvimento de *Tetraselmis gracilis* em culturas sob condições controladas. O meio nutritivo para as culturas unialgais teve como base água do mar esterilizada por filtração e acrescida de nutrientes. Arsênio e cobre foram adicionados às culturas em uma amplitude de concentração total (nominal) de 10^{-7} M até 5×10^{-3} M. Nos experimentos cujo objetivo foi verificar o efeito da MOD sobre a toxicidade de cobre e arsênio foi adicionado, além do metal, 10 mg.L^{-1} de substância húmica comercial. Os efeitos tóxicos foram avaliados através da mobilidade da alga e curvas de toxicidade. Os resultados mostraram que a presença de MOD reduziu a toxicidade do metal e metalóide para a microalga *T. gracilis* e que sua mobilidade é alterada não somente pela presença de toxicantes, mas também por outras situações de estresse.

Palavras-Chave: Toxicidade, mobilidade, *Tetraselmis gracilis*, arsênio, cobre, MO

1. INTRODUÇÃO

A espécie humana altera profundamente o ambiente no qual se insere. Com o desenvolvimento industrial, a contaminação da água, do ar e do solo, tornou-se um problema global. Dentre os contaminantes destacam-se os metais com potencial tóxico (metais traço), cujos níveis nos ecossistemas aquáticos e terrestres vêm aumentando consideravelmente.

No final do século XX, a conscientização da população mundial em relação à preservação ambiental começa a apontar para uma remediação das conseqüências da Revolução Industrial, que, aliada à falta de responsabilidade ecológica do homem com o ambiente circundante, é o principal responsável pelos danos ambientais.

O estudo de metais pesados na coluna d'água tem grande significado ecológico, tendo em vista que os mesmos podem contribuir de forma significativa para a poluição de ecossistemas aquáticos, estressando comunidades aquáticas e associando-se aos efeitos crônicos sobre a saúde humana (SANTOS *et al.*, 2004).

A biota aquática é capaz de concentrar os metais pesados em várias ordens de magnitude acima das concentrações encontradas na coluna d'água, sendo por isso responsável por grande parte da dinâmica destes poluentes no ambiente marinho. Alguns parâmetros influem no acúmulo e concentração dos metais nos tecidos dos organismos. Pode-se considerar a concentração de metal a que o organismo está exposto através da água, sedimento e alimento como um dos parâmetros mais importantes da bioacumulação (HUCHABEE *et al.*, 1979; KEHRIG *et al.*, 1998).

O processo de assimilação de metais é influenciado por vários fatores, tais como a especiação química do metal no ambiente, e as condições físicas e químicas do meio aquático (temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido) (MURTY, 1988). Nos organismos, os processos de assimilação e eliminação de metais podem ocorrer de maneira independente (STAHAM *et al.*, 1976), a assimilação é tanto mais rápida quanto maior for a polaridade da molécula (GAKSTATTER, 1968).

Quando acumulados pelos organismos em concentrações elevadas, os metais potencialmente tóxicos inibem processos fisiológicos importantes e

consequentemente afetam o crescimento e a reprodução (CJISTER e VAN ASSCHE, 1985) podendo levar a morte dos indivíduos (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Segundo MORAES (2001) as interações que ocorrem entre os poluentes e a população podem induzir uma seqüência de mudanças estruturais e funcionais nos níveis superiores de organização. Posteriormente, cada efeito pode causar distúrbios danosos de funções integradas vitais, as quais podem afetar a população. Então a existência de uma população é uma função de todas as respostas de indivíduos às mudanças ambientais.

O metal (Cu) e o metalóide (As) são naturalmente encontrados na maior parte dos diferentes segmentos integrantes dos sistemas aquáticos naturais, tais como rochas, solos, sedimentos, águas e organismos. Contudo, o aumento da concentração destes elementos devido às atividades antrópicas, associado com seu elevado potencial tóxico, podem provocar efeitos adversos aos ecossistemas aquáticos e ao homem (SALOMONS e FORSTNER, 1984). Em termos de contaminação ambiental, os metais apresentam um risco adicional em relação à maior parte dos contaminantes de origem orgânica, pois eles não sofrem degradação, sendo apenas transferidos de um compartimento para outro dentro do ambiente (SÁ, 2003).

Cobre é um componente natural do ecossistema aquático e essencial para a vida. Ele é requerido em concentrações da ordem de 10^{-8} M para o crescimento saudável de microalgas. Entretanto, em concentrações pouco mais elevadas (10^{-7} M) pode ser prejudicial para a biota (NRIAGU, 1990; EDDING e TALA, 1996).

As principais fontes de poluição deste metal estão relacionadas a atividades mineradoras e beneficiadoras de cobre, e a utilização de tintas e pesticidas a base de cobre (CORREA *et al.*, 1996). O aumento da concentração de cobre nos ambientes aquáticos está relacionado tanto a fontes de origem natural, como a lançamentos de efluentes oriundos de atividades industriais, agrárias e domésticas (NOR, 1987).

Arsênio pode existir em ecossistemas aquáticos em todas as fases de oxidação e nas formas inorgânica e orgânica. Na água, arsênio está presente principalmente em formas inorgânicas, sendo o As(V) sua forma de maior estabilidade sob condições aeróbicas e em condições de equilíbrio (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, 1978). Assim como a toxicidade do cobre, a

do arsênio depende da espécie química (FUHUA *et al.*, 1994). Segundo estudos de KNAUER *et al.* (1999) arsenato (As(V)) é mais tóxico para comunidades fitoplânctônicas do que arsenito (As(III)) e, portanto as algas planctônicas podem ser alvos da toxicidade de arsênio em ambientes aquáticos.

As principais fontes de arsênio para o ambiente são oriundas do uso continuado de compostos que contém o metalóide, tais como pesticidas, de sua emissão durante a mineração e fundição de ouro, chumbo, cobre e níquel (pois ocorre habitualmente nesses minérios), da produção de ferro e aço, e da combustão do carvão, neste caso considerado um contaminante. A lixiviação de minas abandonadas de ouro pode ser ainda uma fonte significativa de poluição por arsênio nos ecossistemas aquáticos (BAIRD, 2002).

As microalgas são os principais produtores primários marinhos e a base de cadeias alimentares nesses ecossistemas. Qualquer impacto adverso nestes indivíduos pode afetar direta ou indiretamente organismos de níveis tróficos superiores. Estudos pretéritos vêm demonstrando que as microalgas marinhas são particularmente sensíveis a poluentes orgânicos e inorgânicos (FLORENCE e STAUBER, 1991; STAUBER *et al.*, 1994). As interações com os metais afetam estes organismos através da inativação enzimática, interferência no transporte celular, e/ou interferência na assimilação de nutrientes (PRICE e MOREL, 1994). Além disso, os metais contribuem para a inibição da fotossíntese e da síntese de pigmentos e, acarretam diminuição da taxa de crescimento e de reprodução (STRÖMGREN, 1980; MUNDA e HUDNIK, 1986; PELLEGRINI *et al.* 1993) em microalgas. A diminuição no crescimento das comunidades algais pode acarretar um decréscimo dos estoques pesqueiros, da qualidade dos recursos vivos e alterar a cadeia trófica dos oceanos. Além disso, muitas das substâncias poluidoras representam problemas particulares para o ambiente marinho, visto que apresentam ao mesmo tempo toxicidade, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar (BAINY e MARQUES, 2001).

Os materiais orgânicos dissolvidos são capazes de alterar a especiação de elementos metálicos/metalóides em ecossistemas aquáticos e, dessa maneira alteram a biodisponibilidade dos mesmos para microalgas. A habilidade de acumular metais na superfície celular de muitas microalgas a partir de soluções aquosas diluídas é conhecida como sendo um sistema capaz de regular a concentração

residual de íons metálicos dissolvidos em oceanos, lagos e rios (CAMPBELL *et al.*, 1997; SCHMITT *et al.*, 2001). Substâncias orgânicas são adsorvidas na superfície das células algais e, como são capazes de seqüestrar metais, controlam a toxicidade de íons específicos (GONZALEZ-DAVILA *et al.*, 1995).

A matéria orgânica é formada ao longo da teia alimentar global e nos processos regenerativos da biosfera. Na forma particulada é representada pelos organismos vivos, seus produtos de excreção e restos após a morte. No entanto, a maior parte da matéria orgânica encontra-se sob a forma dissolvida em grandes depósitos, como os de combustíveis fósseis, nos solos, ou disperso no meio aquático marinho e lacustre (LOMBARDI, 1995).

As relações metais – microalgas sofrem modificações em presença de materiais orgânicos dissolvidos tais como as substâncias húmicas. No entanto, os processos ecofisiológicos em microalgas relacionados à presença de materiais orgânicos dissolvidos são poucos entendidos (LOMBARDI e VIEIRA, 1999; 2000). Segundo WANGERSKY (1994), as transformações químicas em ambientes marinhos serão entendidas por completo somente quando se considerar as reações com os materiais orgânicos dissolvidos naturais ou por eles mediados. De acordo com TAYLOR *et al.* (1998), o material orgânico particulado suspenso na coluna d'água pode atuar como sumidouro ou fonte de metais para os ecossistemas aquáticos.

Na biota aquática a matéria orgânica dissolvida e a concentração dos íons hidrogênio têm frequentemente demonstrado afetar a toxicidade dos metais, em parte através de sua influência na especiação dos metais (KUWABARA, 1986), e em parte através da alteração da carga da superfície de células fitoplanctônicas (CAMPBELL e STOKES, 1985; MEADOR, 1991; WELSH *et al.*, 1993). Outros fatores como alcalinidade, dureza, pH, estado redox, e complexação com ligantes orgânicos são importantes para determinar a especiação, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados.

Estudos envolvendo as interações de uma espécie de fitoplâncton com metais pesados e matéria orgânica dissolvida natural (MOD) são uma importante ferramenta para estudos de impactos ambientais (EIA), monitoramento e valoração de danos ambientais em ecossistemas marinhos, trazendo assim respaldo para

medidas legislativas para prevenir ou reduzir a poluição marinha acarretadas por atividades antrópicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

O objetivo principal deste estudo foi investigar as interações entre MOD, *Tetraselmis gracilis* e os elementos cobre e arsênio.

2.2 Objetivos Específicos

Além do objetivo principal, esta pesquisa teve quatro objetivos secundários:

- a. Toxicidade de arsênio para a microalga *Tetraselmis gracilis*.
- b. Toxicidade de cobre para a microalga *Tetraselmis gracilis*.
- c. Efeito da MOD (substância húmica) na toxicidade de cobre e de arsênio para *Tetraselmis gracilis*.
- d. Efeito da MOD (substância húmica) na mobilidade de cobre e arsênio para *Tetraselmis gracilis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Culturas de Algas

Este estudo foi realizado utilizando-se a microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae) gentilmente cedida pelo Laboratório de produção de larvas de marisco da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). As células algais foram mantidas em Erlenmeyers de 500 ml (previamente esterilizadas em autoclave a 120 °C por 20 minutos) contendo 200 ml do meio de cultura descrito em HARRISON *et al.* (1980). Para a confecção do meio de cultura, água do mar natural foi filtrada em filtros de membrana (S&S – Schleicher & Schüell) com 0,22 µm de diâmetro de poro que foi utilizada como base na qual foram acrescidos os nutrientes (TABELA 1). O meio nutritivo contém EDTA em sua composição. EDTA é um agente quelante de íons metálicos que tem por finalidade evitar a precipitação de ferro e outros micronutrientes no meio nutritivo. Conseqüentemente, é também capaz de seqüestrar cobre e arsênio, os agentes tóxicos usados nos experimentos.

Experimentos de toxicidade com culturas da microalga foram realizados com três réplicas, na presença de cobre ou de arsênio e, acrescidos ou não de matéria orgânica dissolvida (MOD). Como MOD utilizou-se substância húmica adquirida através da International Humic Substances Society, obtida do Suwannee River. É uma substância húmica padrão amplamente caracterizada físico-quimicamente, motivo pelo qual foi escolhida. As culturas foram mantidas em condições controladas de luminosidade ($180 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperatura (20-22°C) e com ciclo claro-escuro de 12-12 h. O crescimento populacional foi monitorado através de contagem das células algais ao microscópio e determinação da concentração de clorofila-a diariamente durante as primeiras 96 horas após a introdução de contaminante. Além do crescimento populacional, as células algais foram monitoradas quanto à sua mobilidade sob o microscópio óptico.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE ÁGUA SALGADA HARRISON *ET AL.* (1980), USADO NO PRESENTE ESTUDO. pH INICIAL AJUSTADO PARA 8,00.

Composto	Quantidade (g.L ⁻¹)	Concentração Final
NaNO ₃	9,334	549,09
NaSiO ₃ . 9H ₂ O	6,0	105,60
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,30	21,74
Na ₂ EDTA	1,106	14,86
H ₃ BO ₃	0,76	61,46
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 6H ₂ O	0,468	5,97
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,032	5,92 x 10 ⁻¹
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,108	2,42
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0073	2,54 x 10 ⁻¹
CoSO ₄ . 7H ₂ O	0,0032	5,69 x 10 ⁻²
Vitaminas		
Tiamina HCL	10 ml	
Biotina	2 ml	
B ₁₂	2,0 mg	

3.2 Curva de crescimento

Uma curva de crescimento padrão de *Tetraselmis gracilis* em cultura foi obtida inoculando-se 10⁴ cels/mL em um frasco Erlenmeyer de policarbonato antes de efetuar os testes de toxicidade. Em dias alternados, uma alíquota da cultura era retirada para o acompanhamento celular através da contagem de células ao microscópio.

3.3 Densidade celular

O crescimento celular foi acompanhado através de contagem de células algais ao microscópio (número de células por ml de cultura). Foram retirados cinco ml de cada cultura e fixados com uma gota de lugol (iodeto de potássio: iodo: água

destilada - proporção 1:2:20). As amostras foram armazenadas em frascos de vidro de 10 ml vedados com tampa de borracha e contadas posteriormente com o uso de um Hemocítmetro Fuchs-Rosenthal (0,0625mm²) sob microscópio óptico.

3.4 Clorofila-a

As concentrações de clorofila-a foram utilizadas como um parâmetro para o acompanhamento do crescimento populacional durante os bioensaios.

Para a quantificação da clorofila-a foram realizadas amostragens em 0h, 72h e 96h após o inóculo. Amostras de 5 ml de cada cultura algal foram filtradas em filtros de fibra de vidro (GF525-C, S&S), armazenados em envelopes de papel alumínio e congelados para posterior análise. A extração da clorofila-a foi feita adicionando-se aos filtros 10 ml de acetona 90% e incubando-os em geladeira no escuro por 12 horas. Depois desse período foram centrifugadas por 15 minutos (2500 rpm) (centrifuga EXCELSA BABY I – FANEM) e em seguida a fluorescência da amostra foi quantificada em 665 nm e 750 nm utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-160. O procedimento descrito acima obedece a metodologia descrita em CARMOUZE (1994).

Os dados finais apresentaram incongruências quando comparados à densidade celular, motivo pelo qual se apresentam apenas dispostos no anexo.

3.5 Mobilidade Celular

A mobilidade celular foi verificada ao microscópio a cada concentração de metal. Para tanto as células foram classificadas em uma das três modalidades: células totalmente paradas, células que apresentaram um movimento lento em comparação às culturas controle e células que apresentaram um movimento ágil, semelhante ao do experimento controle.

3.6 Testes Ecotoxicológicos: cobre e arsênio

O efeito tóxico dos elementos cobre e arsênio foram avaliados isoladamente sobre a microalga *Tetraselmis gracilis*. Os ensaios foram realizados de modo a avaliar a toxicidade aguda (EC50), quantificada durante as primeiras 96 horas após a introdução do agente tóxico no meio nutritivo.

A especiação dos elementos cobre e arsênio foram verificadas teoricamente através do uso do modelo de especiação MINEQL+. Neste, são colocados todos os parâmetros presentes no meio de cultura (TABELA 1) e a análise do modelo nos fornece as espécies químicas predominantemente presentes. Os resultados referentes à aplicação do modelo MINEQL+ ao metalóide arsênio foram incongruentes, motivo pelo qual não estão incluídos no presente estudo.

Para os experimentos de toxicidade, foram usados Erlenmeyers de policarbonato, reduzindo-se assim a adsorção de cobre e arsênio nas paredes do frasco. Cada frasco tem capacidade para 250 ml, e conteve 100 ml do meio HARRISON *et al.* (1980).

A adição dos metais foi realizada somente quando a microalga inoculada nas culturas experimentais atingiu o início da fase exponencial de crescimento, garantindo saúde celular das células. Neste ponto, foram adicionadas 8 concentrações diferentes de cobre ou arsênio, estando contidas na amplitude de 10^{-7} a 5×10^{-3} M. Tanto para cobre quanto para arsênio, tais concentrações foram 10^{-7} , 5×10^{-7} , 5×10^{-6} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} e 5×10^{-3} M. Cobre foi oferecido na forma de CuCl_2 e arsênio na forma de As (V). Nos experimentos cujo objetivo foi verificar o efeito da MOD sobre a toxicidade de cobre e arsênio foi adicionado, além do metal, 10 mg.L^{-1} de substância húmica para 100 ml de meio de cultura, concentração esta considerada padrão para a realização de testes ecotoxicológicos. Todos os experimentos foram realizados com três réplicas. No experimento controle não foi adicionado nenhuma concentração de arsênio. Segundo descrição em HARRISON *et al.* (1980), apesar do cobre não ter sido adicionado ao meio nutritivo, sua presença em concentração suficiente ao crescimento algal é garantida através de contaminações presentes nos outros reagentes e sais utilizados para a confecção do meio de cultura.

A concentração inicial de células algais nas culturas teste foi de cerca de 10^6 cels/mL, obtidas de uma cultura em fase exponencial de crescimento. Alíquotas diárias foram retiradas dos bioensaios para a determinação da concentração de clorofila-a (5 ml) e contagem de células ao microscópio (5ml). O pH das culturas foi monitorado ao início e fim de cada bioensaio.

3.7 Materiais de laboratório e procedimentos de limpeza

Todo o material utilizado nas culturas algais foi esterilizado em autoclave (120 °C por 20 minutos) antes de inocular a microalga, o que, aliado à filtração da água do mar em filtros de 0.22 μ m, garantiu baixa contaminação microbiana nas culturas.

Todo o material utilizado nas manipulações laboratoriais foram previamente imersos em ácido clorídrico (HCl) 1,0 M por 24 horas, enxaguados com água destilada, seco em estufa e guardados em sacos plásticos vedados. Dessa forma reduziu-se as contaminações por metais. Entre um bioensaio e outro, os frascos de cultura foram descontaminados através de lavagem com detergente líquido (neutro), imerso em ácido clorídrico (HCl) por sete dias, e posteriormente enxaguados com água destilada. Para evitar possíveis contaminações aéreas e por microorganismos (bactérias e fungos) fez-se uso de uma cabine de fluxo laminar (VLFS12–VECO) para as manipulações envolvendo as culturas de microalgas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de Crescimento

A curva de crescimento de *Tetraselmis gracilis* mostrada na FIGURA 1 ilustra as fases de crescimento típicas obtidas em culturas de microalgas com volume limitado (culturas estanques). Para os bioensaios foi utilizada a fase exponencial de crescimento, onde as células são consideradas saudáveis, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se replicando. Nesta fase a taxa de crescimento é máxima e a quantidade de produtos finais do metabolismo ainda é pequena.

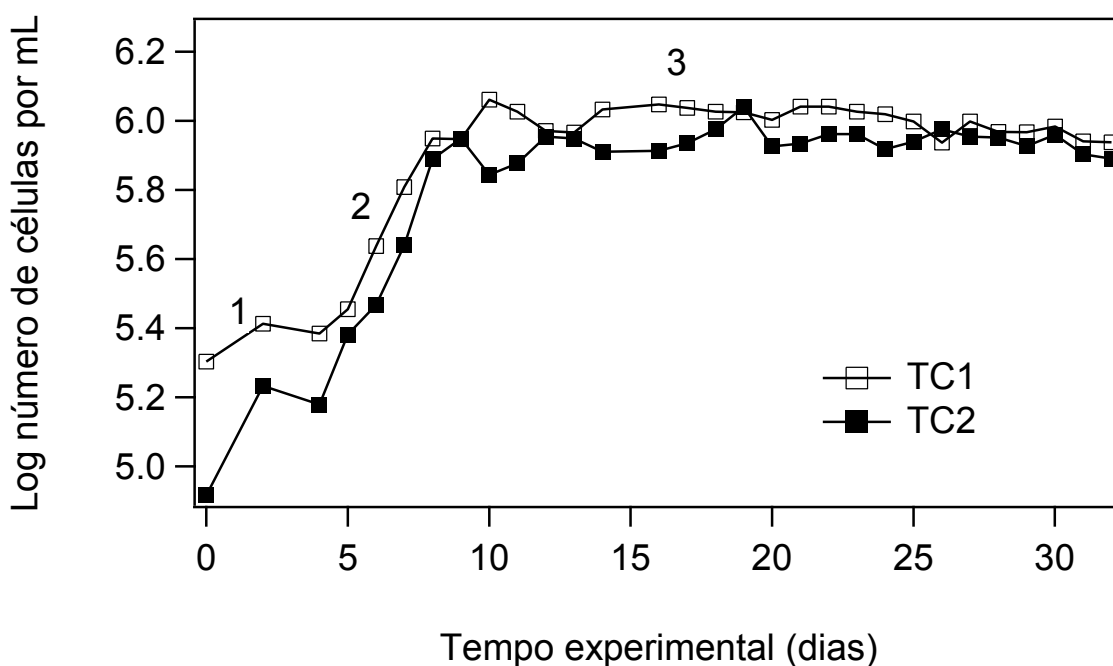


FIGURA 01. PADRÃO DE CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM DUAS CULTURAS ESTANQUES (TC1 E TC2). FASES DE CRESCIMENTO: 1, FASE LAG; 2, FASE EXPONENCIAL; 3, FASE ESTACIONÁRIA.

4.2 Mobilidade celular x Cobre

O monitoramento do movimento flagelar pode ser uma rápida e sensível técnica para a avaliação de risco ambiental e avaliação química em termos de toxicidade (SHITANDA E TATSUMA, 2006). De acordo com SOMMER (1988), a mobilidade pode ter um grande impacto na habilidade da célula para reagir às condições ambientais, assim como no aumento de seu consumo de nutrientes.

Em relação à mobilidade da alga, os resultados (FIGURAS 02 e 03) observados a partir dos testes de toxicidade mostraram diferenças comportamentais em relação ao cobre e MOD. Sem a adição da MOD, as células do controle apresentaram maior mobilidade (70%, células com movimento ágil) do que na presença de MOD (70%, células totalmente paradas). Os resultados sugerem que tal comportamento deve-se ao seqüestro de cobre disponível no meio de cultura, reduzindo dessa maneira sua concentração. Portanto, através do seqüestro do cobre (micronutriente), a presença de MOD pode induzir a uma situação de estresse às células. Em se tratando de macronutrientes, sabe-se que sua ausência ou presença em concentração inferior àquela requerida para o desenvolvimento normal da microalga, induz o organismo ao estresse. No caso de um micronutriente, sabe-se que tanto seu excesso como sua falta ocasionam situações de estresse, o que poderia levar à redução na mobilidade das algas. Esta explicação é corroborada pela maior movimentação das células na presença de MOD na amplitude de concentração de 10^{-7} M até 5×10^{-6} M de cobre. Nessa amplitude de concentração, cerca de 70% das microalgas apresentaram-se totalmente paradas na ausência de MOD, enquanto que na presença de MOD, o valor foi de 50%. Portanto, confirma-se o seqüestro do metal disponível e a conseqüente redução de toxicidade.

O cultivo de *Tetraselmis gracilis* foi realizado mediante a presença de EDTA. Testes preliminares mostraram um crescimento insatisfatório na ausência do agente quelante sintético. No entanto, os protocolos de testes ecotoxicológicos (ABNT) com algas recomendam a omissão de EDTA no meio de cultura pelo fato do mesmo complexar os metais e reduzir sua toxicidade (WEBER *et al.*, 1989; CHIAUDANI e VIGHI, 1978). Convém mencionar que a ausência de um agente quelante em meio

nutritivo sintético leva à precipitação de Fe e outros micronutrientes, tornando-os indisponíveis às microalgas.

Observando as FIGURAS 02 e 03 constata-se que o cobre, fornecido sob a forma de CuCl_2 em concentração total (nominal) de $5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ foi suficiente para causar cerca de 100% de imobilidade na microalga. Segundo NULSTCH *et al.* (1986) cobre é conhecido como um reagente inibitório, que se liga com os canais de cálcio da superfície flagelar, bloqueando o fluxo de cálcio e assim, causando a imobilidade da célula.

Na FIGURA 02 observa-se que na ausência de MOD, somente o controle apresentou a mobilidade esperada. Segundo análise obtida através do modelo MINEQL+, a concentração de Cu^{2+} livre no meio de cultura era de cerca de $1 \times 10^{-20} \text{ mol.L}^{-1}$, sendo que 90% encontrava-se ligado ao EDTA

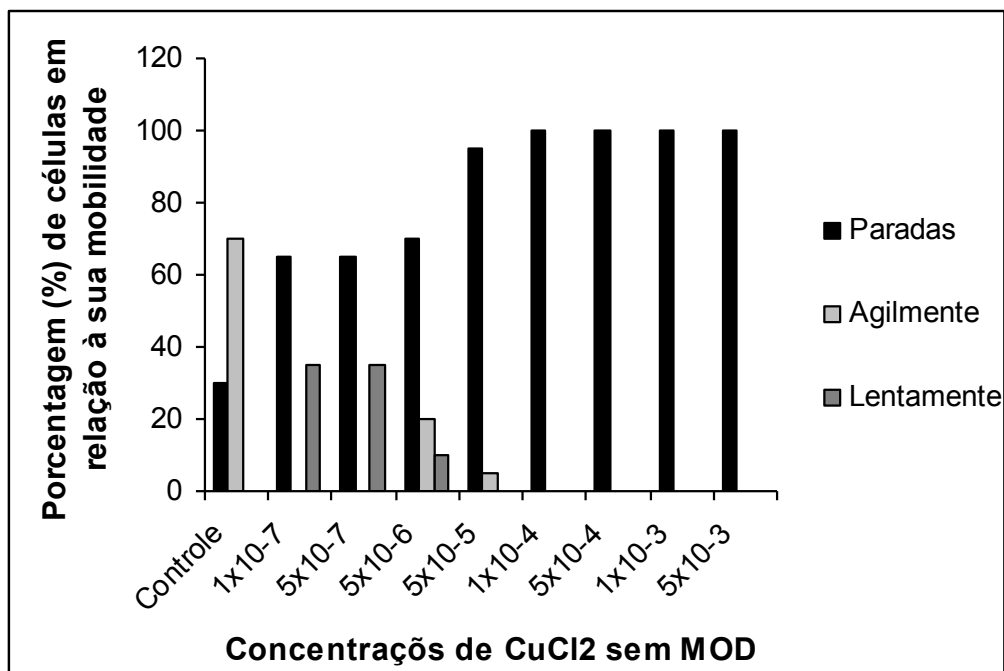


FIGURA 02. EFEITO DO COBRE NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS SEM ADIÇÃO DE MOD.

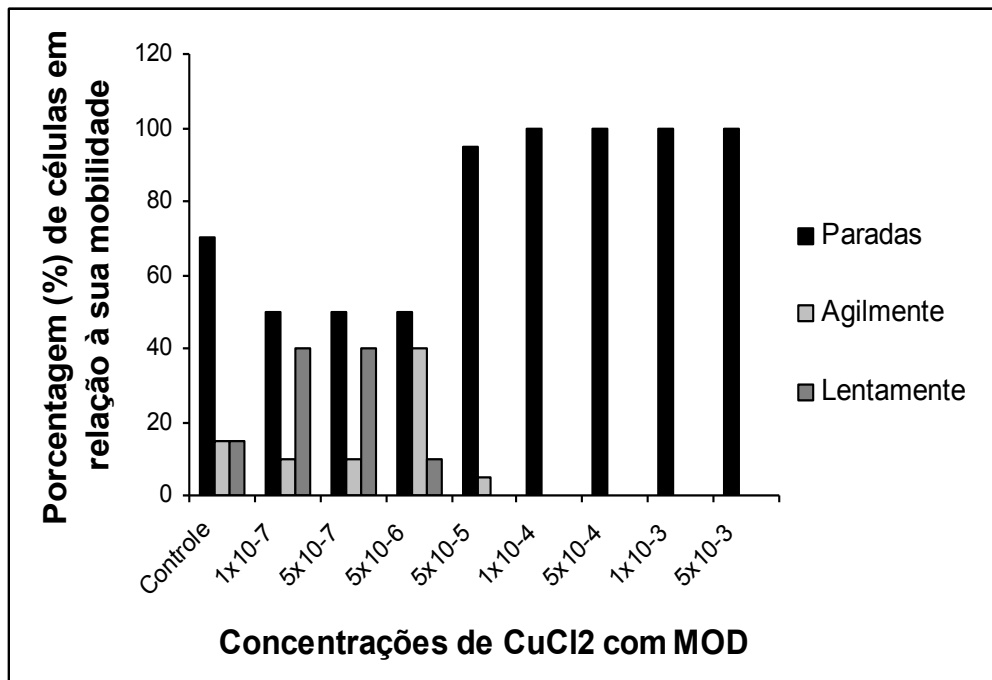


FIGURA 03. EFEITO DO COBRE NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS COM ADIÇÃO DE MOD.

4.3 Toxicidade de Cobre

O crescimento de *Tetraselmis gracilis*, nas diversas concentrações de cobre (CuCl₂) é ilustrado na FIGURA 04. Nesta estão representados a densidade celular para as diversas concentrações do metal em função do tempo de exposição, não foram utilizados os desvios padrões para não poluir a figura e para que houvesse uma melhor compreensão do gráfico. A FIGURA 4A mostra os efeitos do metal na ausência da MOD, enquanto que a FIGURA 4B, em sua presença. Quer na presença, como na ausência do material orgânico nota-se que o maior rendimento final foi obtido nos experimentos controle. De acordo com ERICKSON (1972), o cobre é um micronutriente essencial para o crescimento, metabolismo e atividade enzimática de muitas algas, entretanto, ele também é um inibidor do crescimento algal em altas concentrações; a concentração de cobre que afeta o crescimento em microalgas é largamente variável e dependente da espécie de microalga, da densidade celular, composição do meio, condições físicas da cultura, etc. (WHITTON, 1968; STAUBER e FLORENCE, 1985a).

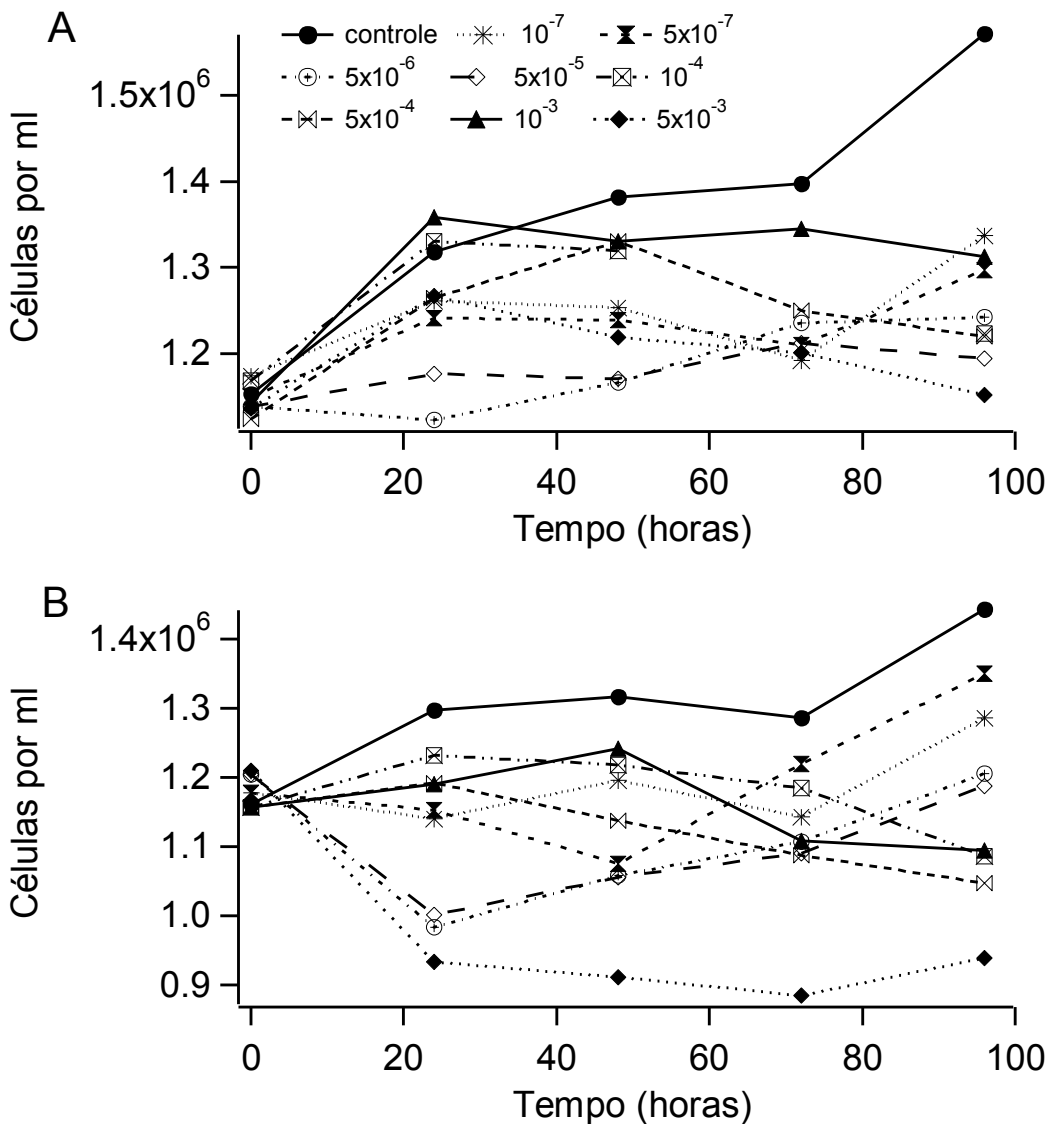


FIGURA 04. CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE, FORNECIDO ATRAVÉS DE CLORETO DE COBRE. **A)** AUSÊNCIA DE MOD. **B)** PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA DE TRÊS RÉPLICAS.

Em todas as concentrações testadas, exceto 10^{-4} M e 5×10^{-4} M observa-se um crescimento das culturas após as 72 horas de tempo experimental. Isto pode relacionar-se a uma recuperação do crescimento algal, devido ao seqüestro dos íons cobre no meio de cultura provavelmente por produtos excretados pelas microalgas (LOMBARDI *et al.*, 2002). Quando há retomada de crescimento pelas microalgas, considera-se um efeito algistático e não algicida. As implicações ecológicas desse

fato são várias, desde a seleção dos organismos até redução na biodiversidade local quando o agente é aplicado em ambiente natural (BONFIM, 2005).

A microalga *Tetraselmis gracilis* apresentou-se consideravelmente resistente ao cobre quando comparada a outras espécies de microalgas. Concentrações de cobre total e/ou nominal da ordem de 10^{-8} M são muitas vezes suficientes para reduzir o crescimento de muitas microalgas (RAI *et al.*, 1981; HARRISON, 1986; MORENO-GARRIDO *et al.*, 2000; LOMBARDI *et al.*, 2002; MA *et al.*, 2003). No entanto, a tolerância do cobre para células de microalgas varia conforme o organismo.

Optou-se neste trabalho por analisar os efeitos tóxicos, não em relação ao EC50, mas sim em relação ao coeficiente angular obtido a partir dos resultados apresentados nas FIGURAS 5A e 5B. Esta opção está fundamentada na presença de EDTA no meio nutritivo e ao uso de concentrações totais adicionadas de cobre (nominais). Em presença de EDTA, elevada concentração de cobre é necessária para o surgimento de um efeito tóxico, uma vez que muito daquilo que é adicionado passa a ser seqüestrado pelo agente quelante. Nesta situação, valores de EC50 têm pouco significado ambiental.

Os resultados dos testes de toxicidade para 96 horas de exposição ao cobre nos experimentos com e sem a adição de MOD são ilustrados na FIGURA 05 e na TABELA 02. Observa-se que um maior efeito tóxico do cobre foi obtido na ausência de MOD (FIGURA 5A, Tabela 02) em 96 horas de exposição. Na presença de MOD 96h de exposição, houve redução da toxicidade (FIGURA 5B, Tabela 02). Ao comparar-se o efeito tóxico da exposição na presença de MOD em 96 horas e em 72 horas, observa-se uma pequena diferença, sendo o efeito tóxico menor em 72 horas de exposição. Estes resultados confirmam outros da literatura, que mostram o seqüestro de íons cobre pela MOD e seu conseqüente efeito sobre a toxicidade em microalgas.

Vários estudos mostram que a matéria orgânica dissolvida (MOD) tem um significativo papel na biodisponibilidade de metais para organismos aquáticos. MOD age como um agente complexador, o que tem demonstrado uma diminuição da toxicidade de metais para vários organismos (ERICKSON *et al.*, 1996; MA *et al.*, 2001; DE SCHAMPHELAERE *et al.*, 2002, 2003, 2004; DE SCHAMPHELAERE e JANSSEN, 2004 a, b; HEIJERICK *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2005).

Há muitas evidências experimentais de que a toxicidade de metais para as algas relaciona-se melhor com a concentração de íons metálicos livres do que com a concentração total do metal (SUNDA e GUILLARD, 1976; BATES *et al.*, 1982; SUNDA e HUNTSMAN, 1992). No presente estudo foi realizada uma análise de modelagem empregando-se o modelo MINEQL⁺ como ferramenta para a obtenção de dados de cobre livre, na presença e ausência de MOD. Estes resultados são mostrados na TABELA 03 e revelaram que, na ausência de MOD, uma concentração de 10^{-7} mol.L⁻¹ de cobre total equivale a uma concentração de Cu²⁺ livre de 1×10^{-20} mol.L⁻¹.

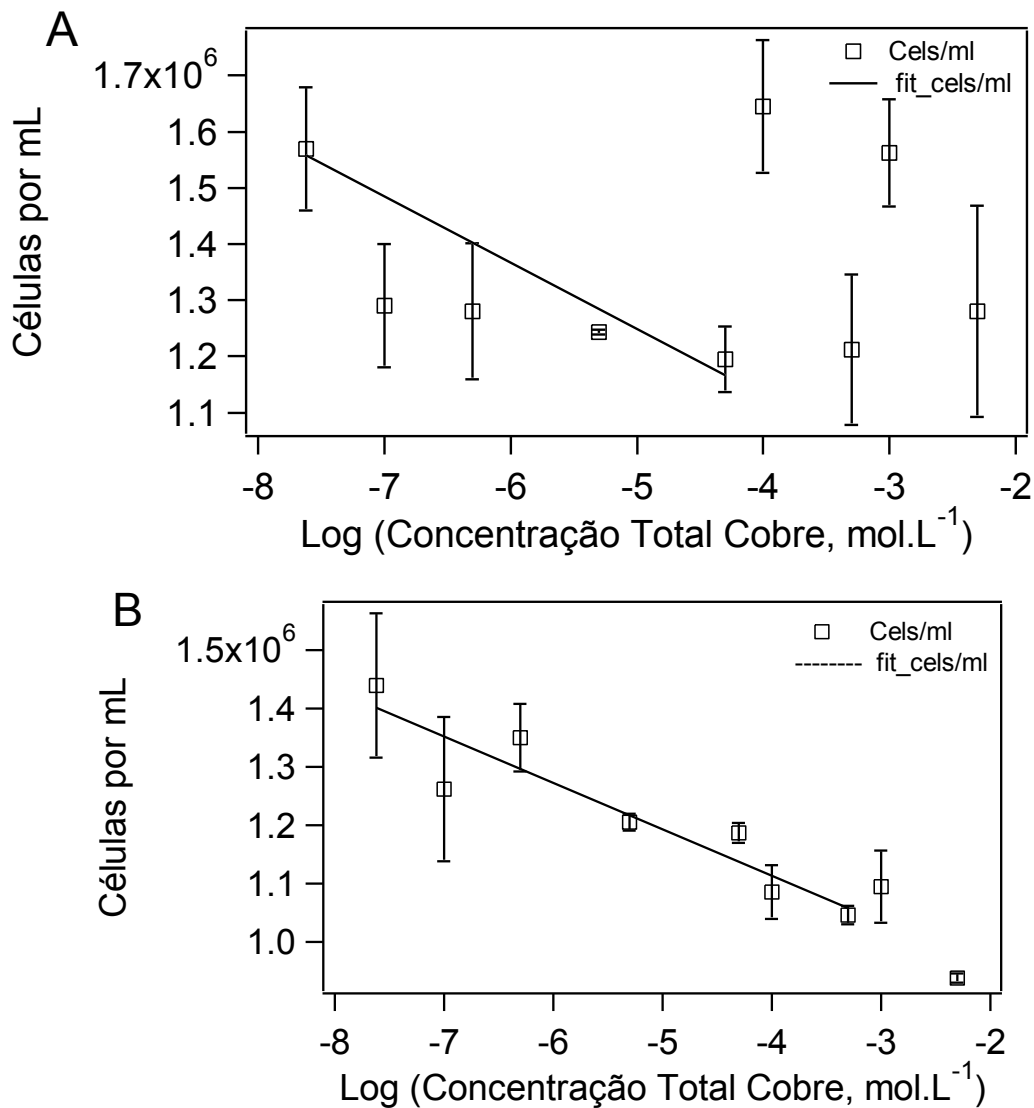


FIGURA 05. DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO MEIO. (A) AUSÊNCIA DE MOD. (B) PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

TABELA 02. VALORES DOS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS ATRAVES DAS EQUAÇÕES DE AJUSTE: TOXICIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NOMINAL NO MEIO.

	Coeficiente angular
72 h com MOD	$-0,69 \times 10^5$
72 h sem MOD	Sem regressão
96 h com MOD	$-0,79 \times 10^5$
96 h sem MOD	$-1,18 \times 10^5$

Alguns estudos reportam que a toxicidade do cobre pode variar de acordo com a espécie de alga empregada. Tem-se, por exemplo, que para *Asterionella japonica* o valor de EC50 72h é de 0.2×10^{-6} M (FISHER e JONES, 1981), já para *Phaeodactylum tricorutum* o valor obtido para inibir 50% da densidade celular é de 1.5×10^{-5} M (CID *et al.*, 1995). No entanto, ressalta-se que são concentrações elevadas e dependentes da composição do meio nutritivo, como demonstrado no presente estudo.

A alga marinha *Nitzschia closterium* é particularmente mais sensível a cobre (EC50 0.15×10^{-6} M) do que as diatomáceas *Skeletonema costatum* (EC50 $> 3.9 \times 10^{-6}$ M), *Minutocellus polymorphus* e *Dunaliella tertiolecta*, sendo que as duas últimas são mais resistentes ao metal (STAUBER, 1995), assim como *Tetraselmis gracilis*.

Estudos como os de STAUBER e FLORENCE (1985b) demonstram que a toxicidade de cobre para algumas algas marinhas depende da concentração de ferro no meio de cultura. Células cultivadas em níveis normais de ferro no meio ($790 \mu\text{g L}^{-1}$) são mais tolerantes ao cobre do que células cultivadas em meios deficientes de ferro. Similarmente, manganês, cobalto, alumínio e cromo (III) protegem contra a toxicidade do cobre, através da formação de hidróxidos (III) de metais ao redor da célula algal, o que através da adsorção do cobre poderia reduzir a sua penetração na célula (STAUBER e FLORENCE, 1985a; STAUBER e FLORENCE, 1987).

Para tolerar estresses ocasionados por metais, as algas têm desenvolvido diferentes mecanismos de resistência, incluindo o reforço das membranas celulares como uma barreira para o cobre, produção de ligantes extracelulares, complexação

de cobre acumulado por fitoquelatinas ou polifosfatos entre outros (GONZÁLES-DÁVILA, 1995).

TABELA 03. ESPECIAÇÃO DO COBRE NO MEIO DE CULTURA PARA *TETRASELMIS GRACILIS* SEGUNDO O MODELO MINEQL⁺. DO TOTAL DE COBRE ADICIONADO (CU NOMINAL), REPORTA-SE A CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA FORMA Cu^{2+} (MOL.L^{-1}) COM MOD (MOD) E SEM MOD (*). AS FORMAS QUÍMICAS DO COBRE $\text{Cu}(\text{OH})_2$, EDTA E $(\text{CuOHEDTA})^{-3}$ SÃO REPORTADAS EM VALORES PERCENTUAIS.

Cu nominal	Cu^{2+}		$\text{Cu}(\text{OH})_2$		EDTA		$(\text{CuOHEDTA})^{-3}$	
	MOD	*	MOD	*	MOD	*	MOD	*
1×10^{-7}	7×10^{-21}	1×10^{-20}	0	0	60	82	40	18
5×10^{-7}	2×10^{-20}	2×10^{-19}	0	0	43	88	57	12
5×10^{-6}	4×10^{-18}	1×10^{-16}	0	0	64	98	37	2
5×10^{-5}	3×10^{-8}	2×10^{-7}	79	76	18	23	0	0
1×10^{-4}	8×10^{-7}	2×10^{-7}	82	87	14	12	0	0
5×10^{-4}	9×10^{-6}	3×10^{-6}	90	95	2.9	2.8	0	0
1×10^{-3}	3×10^{-5}	1×10^{-5}	86	92	1.5	1.4	0	0
5×10^{-3}	5×10^{-3}	5×10^{-3}	0	0	0	0	0	0

Considerando que a concentração de íons hidrogênio exerce significativo efeito sobre a especiação do cobre e também sobre a superfície de microalgas (BONFIM, 2005), os valores de pH foram monitorados ao início e final dos experimentos. Foram detectadas variações de pH devido tanto ao inóculo como também à adição do cobre. Observou-se que o aumento da concentração de cobre, na ausência de matéria orgânica natural, resultou em uma redução do pH no meio de cultura para as concentrações mais elevadas do metal. Estes resultados são mostrados nas TABELAS 04 e 05. Tal alteração do pH, além da própria concentração de cobre, é um fator que interfere no resultado de testes de toxicidade. A redução do pH no meio reduz a toxicidade do metal, pois aumenta a competição entre os íons H^+ presentes no meio mais ácido e os íons cobre, ainda que haja um aumento na concentração do íon metálico em sua forma livre.

TABELA 04. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (PH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE CuCl_2 E NA AUSÊNCIA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

CuCl₂ sem MOD	pH inicial	pH final	DP (pH final)
Controle	8,4	9,44	0,1823
10⁻⁷	9,66	9,11	0,3977
5x10⁻⁷	9,86	9,06	0,129
5x10⁻⁶	8,35	8,25	0,401539
5x10⁻⁵	9,22	8,05	0,015275
10⁻⁴	9,05	8,15	1,005774
5x10⁻⁴	8,02	7,96	0,10116
10⁻³	7,1	7,81	0,060828
5x10⁻³	5,28	5,11	0,023094

TABELA 05. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (pH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE CuCl_2 E NA PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

CuCl₂ com MOD	pH inicial	pH final	DP (pH final)
Controle	8,69	9,62	0,0624
10⁻⁷	8,69	9,81	0,4186
5x10⁻⁷	9,32	10,12	0,03
5x10⁻⁶	8,93	9,74	0,2454
5x10⁻⁵	7,87	8,45	0,1530
10⁻⁴	8,37	7,85	0,4243
5x10⁻⁴	8,19	7,7	0,01
10⁻³	6,66	7,63	0,1965
5x10⁻³	5,52	4,28	0,5139

A alteração de pH entre o início e final dos experimentos é bastante conhecida e o mesmo se processa em florescimentos naturais de microalgas.

Mudanças no pH ocorrem como resultado da utilização de dióxido de carbono e bicarbonato e pelo seqüestro de nitrogênio pelas células algais. Tais mudanças podem interferir no metabolismo algal, e podem alterar o comportamento químico e o modo de ação do elemento tóxico (SWANSON *et al.*, 1991).

CAMPBELL e STOKES (1985) mostraram que o pH altera a toxicidade do cobre livre. Estes autores sugerem que uma redução do pH tem o poder de atenuar a toxicidade do metal. No entanto, se o metal estiver limitado na relação biológica, isto é, H⁺ ineficaz em competir para sítios, a redução do pH tende a não afetar a toxicidade do cobre (GUASCH *et al.*, 2002).

4.4 Mobilidade celular x Arsênio

O efeito do arsênio sobre a mobilidade de *T. gracilis* na ausência e presença de MOD pode ser observado nas FIGURAS 06 e 07. Na ausência da MOD, os organismos apresentaram 70% de mobilidade. No entanto, na presença de MOD foi obtida uma menor mobilidade para a microalga *Tetraselmis gracilis*. Nas baixas concentrações nominais do arsênio (10^{-7} e 5×10^{-7} M) e ausência de MOD as células apresentaram uma mobilidade semelhante à do controle. Já nas concentrações de 5×10^{-6} até 10^{-4} M as células apresentaram movimentos mais lentos e, nas concentrações mais elevadas a imobilidade foi aparente.

O movimento flagelar de *Tetraselmis gracilis*, responsável pela mobilidade das células é controlado pela energia celular obtida a partir da adenosina trifosfato (ATP), portanto intimamente relacionado ao suprimento de fosfato. Há experimentos que demonstram que a adição exógena de ATP é capaz de aumentar a frequência do movimento flagelar em *Polytoma uvella*. Sabe-se que durante o movimento flagelar fibrilas contráteis passam por situações alternadas de contração e relaxamento conforme o suprimento de energia é fornecido na forma de ATP. Há uma competição para a absorção celular entre arsenato (As(V)) e fosfato, de modo que um aumento na concentração do fosfato reduz a toxicidade do arsênio (LEVY *et al.*, 2005). Assim, o metalóide pode ter interferido no mecanismo flagelar, que por sua vez é controlado pelo suprimento de ATP. Os resultados apresentados na FIGURA 07 mostram que a MOD não exerce sobre a especiação química do metalóide os mesmos efeitos que

exerce sobre a especiação química do cobre e, assim seus efeitos sobre a toxicidade não são observados. De maneira semelhante àquela observada nos experimentos com cobre e MOD, esta levou à redução da mobilidade algal independente da concentração de arsênio testada. Como pode ser visto na FIGURA 07, desde o controle até a concentração mais alta testada, a maioria das células algais não apresentou movimentação (70% a 100%, totalmente paradas).

Sem a adição de MOD, observa-se um aumento gradativo de células totalmente paradas, partindo-se do controle em relação à última concentração do metalóide testada. Ao mesmo tempo observa-se uma redução gradativa das células que apresentaram um movimento ágil. Portanto, na ausência de MOD, os efeitos do arsênio ficaram mais claros.

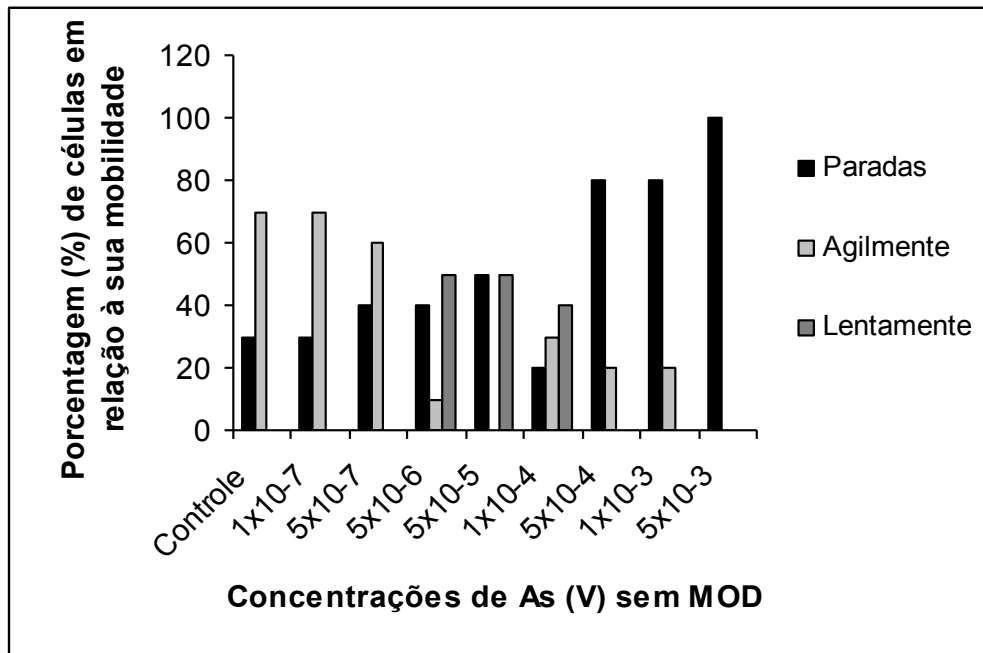


FIGURA 06. EFEITO DO ARSÊNIO NA MOBILIDADE DE *TETRASELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS SEM ADIÇÃO DE MOD.

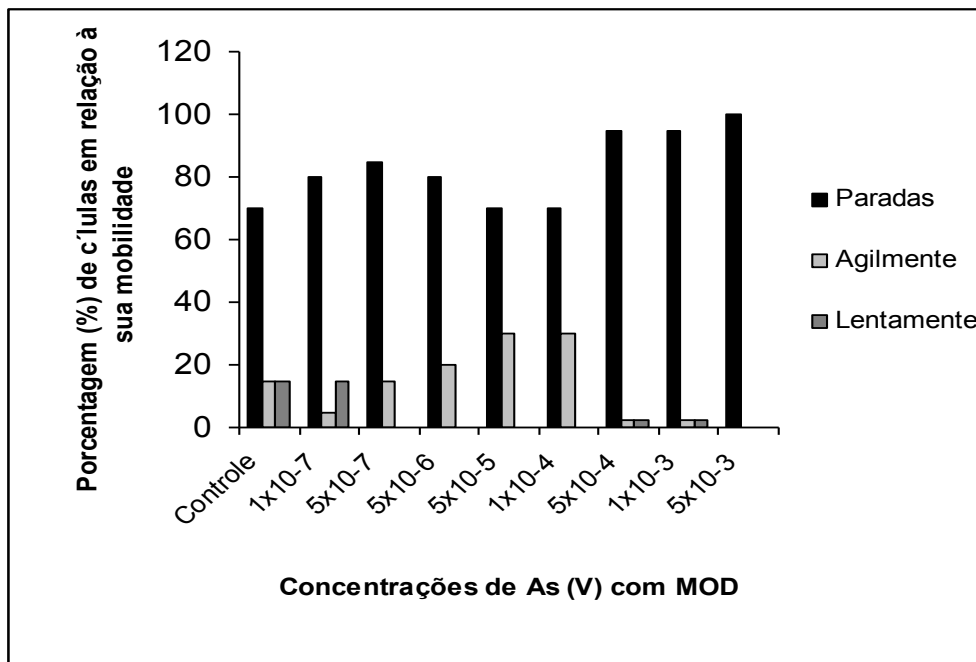


FIGURA 07. EFEITO DO ARSÊNIO NA MOBILIDADE DE *TETRAELMIS GRACILIS*. EXPERIMENTOS COM ADIÇÃO DE MOD.

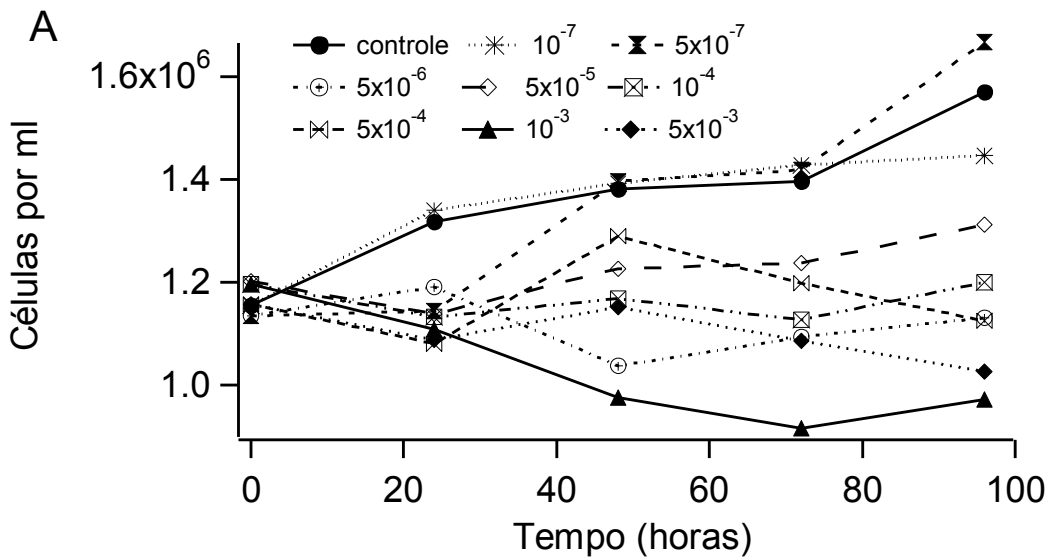
4.5 Toxicidade do Arsênio

O crescimento populacional de microalgas é um bom indicador da ação tóxica que o arsênio exerce em microorganismos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA, 1978) uma vez que reflete o metabolismo das células.

A FIGURA 08 mostra o crescimento da microalga em função do tempo experimental para as diversas concentrações de arsênio fornecido como As(V), não foram utilizados os desvios padrões para não poluir a figura e para que houvesse uma melhor compreensão do gráfico. Em comparação ao cloreto de cobre, a ausência de MOD para o arsênio (FIGURA 8A) mostrou um padrão, onde as concentrações mais baixas (10^{-7} e 5×10^{-7} M) apresentaram um crescimento mais próximo do controle, enquanto que as concentrações mais altas (5×10^{-4} , 10^{-3} e 5×10^{-3} M) apresentaram menores densidades populacionais.

A toxicidade de compostos de arsênio está sujeita aos efeitos da concentração de fosfato. Acredita-se que isto ocorra via competição com arsenato pelos mesmos sítios celulares de ligação (BUTTON *et al.*, 1973; PLANAS e HEALY, 1978; SANDERS, 1979; THIEL, 1988; WÄNGBERG e BLANCK, 1990; ULLRICH-

EBERIUS *et al.*, 1989). Foi demonstrado que células limitadas em fosfato são mais suscetíveis à toxicidade de As(V) do que células repletas de fosfato (THIEL, 1988). Entretanto, BOTTINO *et al.* (1978), SANDERS (1979), MAEDA *et al.* (1985) e CREED *et al.* (1990) observaram que o crescimento de *Skeletonema costatum*, *Hymenomonas carterae*, *Chlorella vulgaris*, e *C. vulgaris* (Japão) aumentou com a adição de As(V) em condições limitadas de fosfato. O estímulo do crescimento na presença de As(V) sugere que sob tais condições as células utilizam arsênio em um contexto construtivo (KNAUER e HEMOND, 2000).



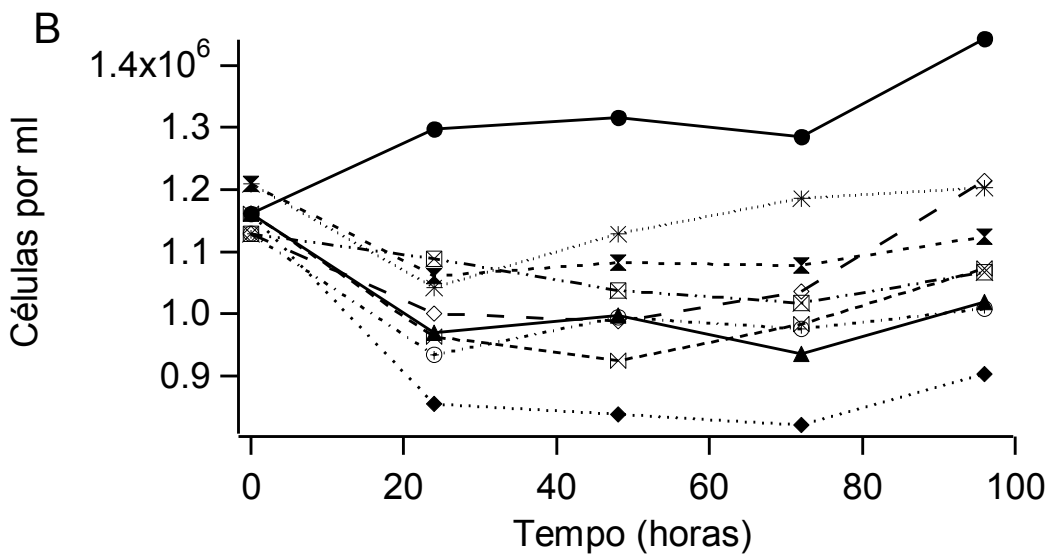


FIGURA 08. CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNIO, FORNECIDO ATRAVÉS DE AS(V). **A)** AUSÊNCIA DE MOD. **B)** PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA DE TRÊS RÉPLICAS.

Na FIGURA 8B, que retrata o efeito da matéria orgânica dissolvida e arsênio no crescimento de *Tetraselmis gracilis*, pode-se observar que a toxicidade de arsênio aumenta proporcionalmente ao aumento nominal do metalóide. Deve-se ressaltar que após as 72 horas experimentais, há uma retomada de crescimento, acompanhando assim o padrão estabelecido pelo controle. Novamente, na presença da matéria orgânica, a microalga apresentou um crescimento inferior ao controle para todas as concentrações do metalóide

Os resultados apresentados nas FIGURAS 9A e 9B e na TABELA 06 mostram que na presença de MOD houve redução da toxicidade do arsênio, considerando-se 96 horas e também 72 horas. Segundo BAUER E BLODAU (2006), tal redução na toxicidade do metalóide pode ser devida à formação de complexos aquosos MOD-As tanto em grupos amino positivamente carregados da MOD, como também através de pontes catiônicas metálicas.

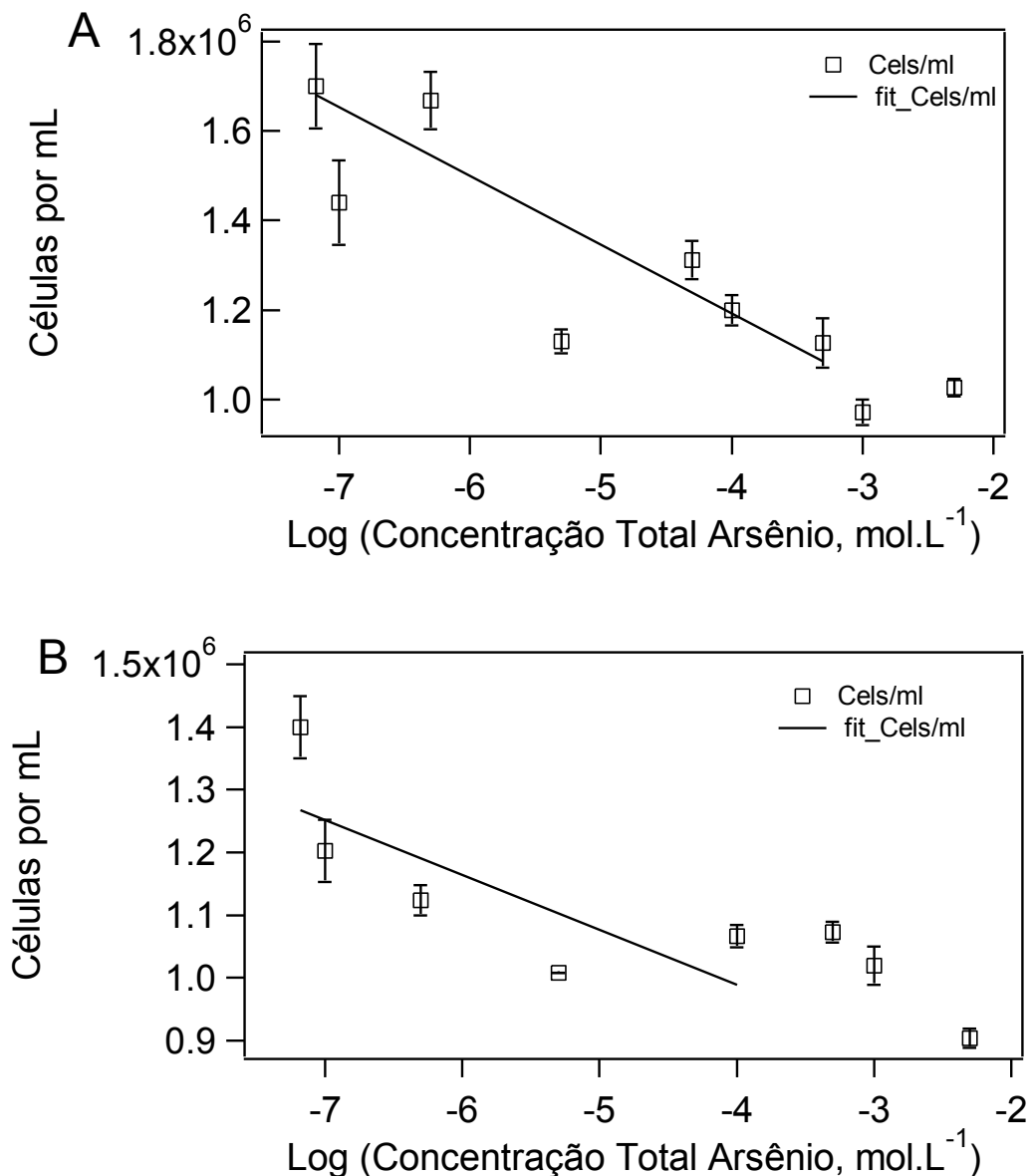


FIGURA 09. DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO. (A) AUSÊNCIA DE MOD. (B) PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

A microalga estudada (*Tetraselmis gracilis*) apresentou-se consideravelmente resistente ao arsênio quando comparada a outras espécies de algas. PLANAS e HEALY (1978) mostraram que concentrações inferiores a 10^{-6} M de arsenato reduziram o crescimento de *Melosira granulata* e *Ochromonas valesiaca*, enquanto que concentrações maiores que 10^{-4} M são requeridas para uma redução similar do crescimento em outras espécies (*Cryptomonas eroda* e *Anabaena variabilis*). Mais do que 2×10^{-4} M de arsenato são requeridos para que o crescimento de

Synechococcus lepoliensis seja reduzido (BUDD e CRAIG, 1981). A toxicidade do arsênio pode variar também em uma mesma espécie de alga. DEN DOOREN DE JONG (1965) reportaram que o crescimento de *C. vulgaris* foi inibido com 0.8×10^{-6} M em contraste, um outro clone de *C. vulgaris* tolerou mais que 0.1 M de arsenato (MAEDA *et al.*, 1985).

Alguns estudos demonstram que arsenato é inibitório para algumas espécies de microalgas e estimulante para outras. A microalga *Tetraselmis chui* (BOTTINO *et al.*, 1978) quando exposta ao arsênio mostrou taxas de crescimento máximas na fase exponencial. O crescimento aumentou na presença de 0.08×10^{-6} M de arsênio para a diatomácea *Skeletonema costatum* (SANDERS, 1979). Arsenato também aumentou a taxa de crescimento de *Hymenomonas carterae* em concentrações menores que 1.3×10^{-4} M (BOTTINO *et al.*, 1978). No entanto, há autores que relacionam o estímulo do crescimento na presença de arsenato à adição indireta de um eventual nutriente limitante presente no arsenato de sódio (CREED *et al.*, 1990), e não ao arsênio propriamente dito.

TABELA 06. VALORES DOS COEFICIENTES ANGULARES OBTIDOS ATRAVES DAS EQUAÇÕES DE AJUSTE: TOXICIDADE EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NOMINAL NO MEIO.

	Coeficiente angular
72 h com MOD	-0.77×10^5
72 h sem MOD	-1.1×10^5
96 h com MOD	-0.87×10^5
96 h sem MOD	-1.5×10^5

LEVY *et al.* (2005) afirma que a alga *Chlorella sp.* é tolerante a As(V), e que o metalóide não causa efeitos na taxa de crescimento até 72 h em concentrações acima de 1.06×10^{-5} M. *Monoraphidium arcuatum* é mais sensível a As(V) e o valor de seu EC50 (3.34×10^{-6} M) é 100 vezes menor do que o obtido para *Chlorella sp* (3.34×10^{-4} M). Quando expostas ao As(V), ambas as espécies reduzem As(V) para As(III), entretanto, apenas *M. arcuatum* excreta As(III) para o meio circundante.

As interações entre metais/metalóides e substratos biológicos envolvem, muitas vezes, mecanismos de detoxificação incorporados geneticamente nas células algais e que normalmente se relacionam com a habilidade de acumular o elemento.

A relação entre arsênio e microalgas é complexa e processa-se primeiramente via adsorção do metalóide na parede celular, cuja superfície é carregada. Em seguida o processo dá lugar a uma etapa mais lenta, de penetração na célula (BECEIRO-GONZALEZ *et al.*, 2000). Uma vez dentro da célula, aquela que apresentar atividade biológica específica irá processar a transformação do arsênio inorgânico em espécies orgânicas (SLEJKOVEC *et al.*, 2006), de menor toxicidade.

Em águas oxigenadas a espécie dominante do arsênio é o arsenato (As(V)), forma inorgânica estável termodinamicamente nesses ambientes (MORELLI *et al.*, 2005). A biotransformação é uma estratégia comum em diversos organismos aquáticos para suportar aumento nas concentrações ambientais do arsênio (BEARS *et al.*, 2006). Sabe-se que as microalgas são capazes de metilação do arsênio, transformando-o em espécies metiladas do arsênio (dimetilarsênio – DMA; monometil arsênio – MMA), cuja toxicidade diminui conforme aumento dos grupos metil adicionados ao metalóide (LEERMAKERS *et al.*, 2006).

TABELA 07. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (pH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE As(V) E NA AUSÊNCIA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

As(V) sem MOD	pH inicial	pH final	DP (pH final)
Controle	8,4	9,44	0,1823
10^{-7}	9,3	9,42	0,2977
5×10^{-7}	8,72	9,44	0,39
5×10^{-6}	9,09	9,26	0,3950
5×10^{-5}	9,36	9,55	0,0986
10^{-4}	8,71	9,49	0,1607
5×10^{-4}	7,05	7,71	0,5755
10^{-3}	8,12	8,25	0,0871
5×10^{-3}	2,82	2,83	0,02

TABELA 08. CONCENTRAÇÃO DE ÍONS HIDROGÊNIO (pH) INICIAL E FINAL NAS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE As(V) E NA PRESENÇA DE MOD. CADA PONTO DO PH FINAL REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

As(V) com MOD	pH inicial	pH final	DP (pH final)
Controle	8,69	9,62	0,0624
10⁻⁷	8,97	8,88	0,5168
5x10⁻⁷	9,55	9,25	0,1006
5x10⁻⁶	9,17	9,04	0,1452
5x10⁻⁵	9,38	9,19	0,1276
10⁻⁴	9,21	8,92	0,1955
5x10⁻⁴	8,97	8,19	0,01
10⁻³	8,63	7,94	0,0461
5x10⁻³	5,59	6,86	0,0450

A variação do pH nos experimentos do As é apresentada nas TABELAS 07 e 08. Os resultados mostram que na ausência de matéria orgânica, o pH final dos experimentos aumentou, enquanto que na presença de MOD o pH decresceu (com exceção da concentração de 5×10^{-3} M). Segundo GULLEDGE e O'CONNORS (1973) ambientes ácidos favorecem a formação de estados de oxidação do arsênio mais tóxicos, o que pode ser uma explicação para a maior toxicidade na concentração de 5×10^{-3} M.

4.6 Toxicidade de Cobre x Toxicidade de Arsênio

A FIGURA 10 compara os experimentos controle, sem adição de matéria orgânica natural e com adição de MOD. Percebe-se que na presença de material orgânico o crescimento da microalga é menor, o que pode caracterizar o seqüestro ou alteração da especiação química de microelementos essenciais, tendo exercido efeito considerável sobre o crescimento populacional.

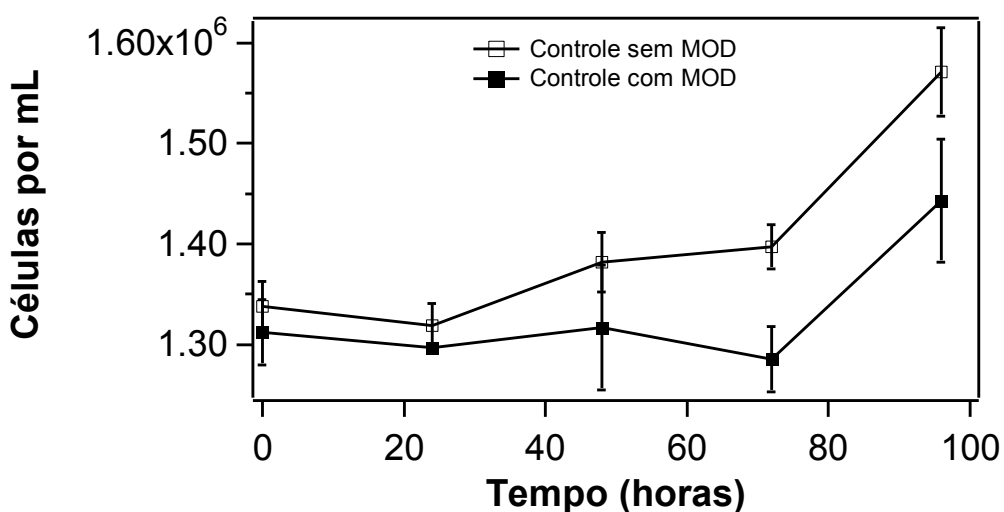


FIGURA 10. CRESCIMENTO DE *TETRASELMIS GRACILIS* EM FUNÇÃO DO TEMPO EXPERIMENTAL NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD). CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA DE TRÊS RÉPLICAS.

O presente estudo avaliou dois aspectos do metabolismo em relação à toxicidade, a mobilidade (intensidade do movimento flagelar) e a biomassa (células por ml). São aspectos distintos e que respondem de maneira diferente ao estressante.

Comparando-se a toxicidade do cobre com aquela exercida pelo arsênio nas células de *T. gracilis* em relação à mobilidade, observamos que uma concentração de 5×10^{-6} M de cobre foi suficiente para causar 100% de imobilidade nas células, enquanto que equivalente imobilidade foi obtida para uma concentração de arsênio de 5×10^{-3} M. No entanto, na presença de MOD, tal comparação (mobilidade) fica prejudicada, uma vez que a matéria orgânica, por si só, exerceu influência significativa sobre a microalga. Isto teve por consequência o mascaramento dos efeitos do arsênio e MOD sobre a mobilidade da microalga. Neste caso, em praticamente todos os experimentos foram obtidos ausência de movimento flagelar. Isto, aliado ao aumento do movimento flagelar em concentrações baixas de cobre nos leva a seguir o raciocínio de que a MOD, de fato, seqüestrou o metal. Conseqüentemente, ocorreu uma depleção da concentração do micronutriente, que levou à parada do movimento flagelar quer nos experimentos com arsênio quer nos experimentos controle.

Em relação à toxicidade avaliada através dos coeficientes angulares obtidos a partir de regressão linear das curvas de toxicidade, obteve-se que em todas as situações, a MOD ocasionou redução da toxicidade, tanto do cobre como também do arsênio. O coeficiente angular de uma reta informa sobre os efeitos mediante exposição ao contaminante, ou seja, quanto mais inclinada a reta, maior toxicidade apresentará o contaminante. Com base nesses resultados, conclui-se que uma pequena adição de arsênio no meio resultou em um maior efeito tóxico na microalga do que adição equivalente de cobre. Considere-se que este efeito é dependente das condições empregadas e que é amplamente reconhecido que o cobre tem grande afinidade por MOD e EDTA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como resultado da presente proposta, avaliou-se o efeito da matéria orgânica dissolvida na toxicidade dos elementos cobre e arsênio e seu efeito sobre a mobilidade da microalga. Os resultados demonstram que a presença de MOD altera o resultado final dos bioensaios, reduzindo a toxicidade do metal e metalóide para a microalga estudada. Esta interação ficou evidente quando avaliamos a mobilidade da alga e os valores dos coeficientes angulares obtidos a partir do ajuste das curvas de toxicidade.

A mobilidade algal vem demonstrando ser uma ferramenta útil para avaliar efeitos tóxicos, por apresentar grande sensibilidade à presença de contaminantes (SHITANDA *et al.* (2005), SHITANDA E TATSUMA (2006)). No entanto, este trabalho demonstrou que a mobilidade algal pode ser alterada não só pela introdução de contaminantes, mas também por uma redução na disponibilidade de cobre, um micronutriente. Portanto sugere-se maior cautela na utilização desse parâmetro para a avaliação da toxicidade em microalgas. As curvas de toxicidade revelaram que arsênio foi ligeiramente mais tóxico do que o cobre, como confirmado através dos coeficientes angulares.

6. BIBLIOGRAFIA

BAINY, A.C.D.; MARQUES, M.R.F. (2001). Expressão do complexo citocromo P4501A e das metalotioneínas na avaliação da contaminação aquática. In: CRAPEZ, M.; MORAES, R.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A.; TEIXEIRA, V. (Eds.). **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Arte e Ciência Villipress. p.271 - 286.

BAIRD, C. (2002). Metais Pesados Tóxicos. In: ---- (Ed.). **Química Ambiental**. São Paulo, SP: Artmed Editora S.A. p. 403 - 436.

BATES, S.S.; TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C.; BUFFLE, J. (1982). Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semi-continuous culture. **J. Phycol.**, Lawrence, v. 18, p. 521-529.

BAUER, M.; BLODAU, C. (2006). Mobilization of arsenic by dissolved organic matter from iron oxides, soils and sediments. **Sci. Total Environ.**, Shannon, v. 354, p. 179 - 190.

BEARS, H.; RICHARDS, J.G.; SCHULTE, P.M. (2006). Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). **Aquat. Toxicol.**, v. 77, p. 257-266.

BECEIRO-GONZALEZ, E.; TABOADA-DE-LA CALZADA, A.; RODRIGUEZ, E.A.; MAHÍA, P.L.; LORENZO, S.M.; RODRIGUEZ, D.P. (2000). Interaction between metallic species and biological substrates: approximation to possible interaction mechanisms between the alga *Chlorella vulgaris* and arsenic (III). **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 475-480.

BONFIM, K.V. (2005). **Toxicidade de Cu²⁺ em células de *Oocystis sp.*** Curitiba, 2005. 49 f. Monografia (Graduação em Oceanografia) – Setor de Ciências da Terra, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.

BOTTINO, N.R.; NEWMAN, E.R.; COX, E.R.; STOCKTON, R.; HOBAN, M.; ZINGARO, R.A.; IRGOLIC, K.J. (1978). The effects of arsenate and arsenite on the growth and morphology of the marine unicelular algae *Tetraselmis chui* (Chlorophyta) and *Hymenomonas carterae* (Chrysophyta). **J. exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 33, p. 153-168.

BUDD, K.; CRAIG, S.R. (1981). Resistance to arsenate toxicity in the blue-green alga *Synechococcus leopoliensis*. **Can. J. Bot.**, v. 59, p. 1518-1521.

BUTTON, D.K.; DUNKER, S.S.; MORSE, M.L. (1973). Continuous culture of *Rhodotorula rubra*: Kinetics of phosphate-arsenate uptake, inhibition and phosphate limited growth. **J. Bacteriol.**, v. 113, p. 599-611.

CAMPBELL, P.G.C.; STOKES, P.M. (1985). Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 42, p. 2034-2049.

CAMPBELL, P.G.C.; TWISS, M.R.; WILKINSIN, K.J. (1997). Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 54, p. 2543-2554.

CARMOUZE, J.P. (1994). **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas.** São paulo: Edgard Blucher. P.253.

CHIAUDANI, G.; VIGHI, M. (1978). The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. **Mitt. Intern. Verein. Limnol.**, v. 21, p. 316-329.

CID, A.; HERRERO, C.; TORRES, E.; ABALDE, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters. **Aquat. Toxicol.**, v. 31, p. 165-174.

CLIJSTERS, H.; VAN ASSCHE, F. (1985). Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photosynthesis Research**, v. 7, p. 31-40.

CREED, I.R.; HAVAS, M.; TRICK, C.G. (1990). Effects of arsenate on growth of nitrogen- and phosphorus-limited *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) isolates. **J. Phycol.**, v. 26, p. 755-760.

CORREA, J.A.; RAMIREZ, M.A.; ROMAN, D.; RIVEIRA, L. (1996). Growth and regeneration responses to copper enrichment by Chilean macroalgae. **J. Appl. Phycol.**, v. 24, n. 3, p. 342-349.

DEN DOOREN DE JONG, L.E. (1965). Tolerance of *Chlorella vulgaris* for metallic and non-metallic ions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 31, p. 301-313.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; HEIJERICK, D.G.; JANSSEN, C.R. (2002). Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 133, p. 243-258.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; VASCONCELOS, F.M.; HEIJERICK, D.G.; TACK, F.M.G.; DELBEKE, K.; ALLEN, H.E.; JANSSEN, C.R. (2003). Development and field validations of a predictive copper toxicity model of the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 2454-2465.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; VASCONCELOS, F.M.; ALLEN, H.E.; JANSSEN, C.R. (2004). The effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 1248-1255.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. (2004 a). Effects of dissolved organic matter concentration and source, pH and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 1115-1122.

- DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. (2004 b). Development and field validation of a biotic ligand model predicting chronic copper toxicity to *Daphnia magna*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 1365-1375.
- EDDING, M.; TALA, F. (1996). Copper transfer and influence on a marine food chain. **Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 617-624.
- ERICKSON, S.J. (1972). Toxicity of copper to *Thalassiosira pseudonana* in unenriched inshore seawater. **J. Phycol.**, v. 8, p. 318-323.
- ERICKSON, R.J.; BENOIT, D.A.; MATTSON, V.R.; NELSON JR., H.P.; LEONARD, E.N. (1996). The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 15, p. 181-193.
- FISHER, N.S.; JONES, G.J. (1981). Heavy metals and marine phytoplankton: correlation of toxicity and sulfhydryl-binding. **J. Phycol.**, v. 17, p. 108-111.
- FLORENCE, T.M.; STAUBER, J.L. (1991). The toxicity of heavy metals to aquatic organisms. In: Conference on environmental Monitoring, 2, Sydney: **Proceedings...**
- FUHUA, C.; WEIQI, C.; SHUGUI, D. (1994). Toxicities of four arsenic species to *Scenedesmus obliquus* and influence of phosphate on inorganic arsenic toxicities. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 41, p. 1-7.
- GAKSTATTER, J.H. (1986). Rates of accumulation of ¹⁴C- dieldrin in tissues of goldfish exposed to a single sublethal dose of ¹⁴C- aldrin. **J. Fish. B. Can.**, v. 25, p. 1767.
- GONZÁLEZ-DÁVILA, M. (1995). The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. **Mar. Chem.**, v. 48, p. 215-236.
- GONZALEZ-DAVILA, M.; SANTANA-CASIANO, J.M.; PEREZ-PEÑA, J.; MILLERO, F.J. (1995). Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. **Sci. Total Environ.**, v. 29, p. 289-301.
- GUASCH, H.; PAULSSON, M.; SABATER, S. (2002). Effect of copper on algal communities from oligotrophic calcareous streams. **J. Phycol.**, v. 38, p. 241-248.
- GULLEDGE, J.H.; O'CONNORS, J.T. (1973). Removal of arsenic (V) from H₂O by adsorption on aluminum and ferric hydroxides. **Am. Water Works Assoc. J.**, v. 65, n. 8, p. 548-552.
- HARRISON, F.L. (1986). The impact of increased copper concentration on freshwater ecosystems. In: HODGSON, E. (Ed.). **Reviews in Environmental Toxicity**, New York: Elsevier, v.2, p.117-250.
- HARRISON, P.I.; WATERS, R.E.; TAYLOR, F.I.R. (1980). A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. **J. Phycol.**, v. 16, p. 28-35.

HEIJERICK, D.G.; JANSSEN, C.R.; DE COEN, W.M. (2003). The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: development of a surface response model. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 44, p. 210-217.

HUCHABEE, J.W.; ELWOOD, J.W.; HILDEBRAND, S.C. (1979). Accumulation of mercury in freshwater biota. In: NRIAGU, J.O. (Ed.): **The biogeochemistry of mercury in the environment**. Amsterdam: Elsevier. p. 277-302.

KEHRIG, H.A.; MALM, O.; MOREIRA, I. (1998). Mercury in a widely consumed fish *Micropogonias furnieri* (Demarest, 1823) from four main Brazilian estuaries. **Sci Total Environ.**, v. 213, p. 263-271.

KANUER, K.; BEHRA, R.; HEMOND, H.; (1999). Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. **Aquat. Toxicol.**, v 46, p. 221-230.

KNAUER, K.; HEMOND. (2000). Accumulation and reduction of arsenate by the freshwater green alga *Chlorella sp.* (Chlorophyta). **J. Phycol.**, v. 36, p. 506-509.

KUWABARA, J.S. (1986). Physico-chemical processes affecting copper, tin and zinc toxicity to algae: a review. In: EVANS, L.V., HOAGLAND, K.D. (Eds.) **Algal biofouling**. Amsterdam: Elsevier. p. 129-144.

LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; DE GIETER, M.; SMEDTS, B.; MEERT, C.; DE BISSCHOP, H.C.; MORABITO, R.; QUEVAUVILLER, Ph. (2006). Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 1-10.

LEVY, J.L.; STAUBER, J.L.; ADAMS, M.S.; MAHER, W.A.; KIRBY, J.K.; JOLLEY, D.F. (2005). Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella sp.* and *Monoraphidium arcuatum*). **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 24, n. 10, p. 2630-2639.

LOMBARDI, A.T. (1995). **Caracterização fluorimétrica da matéria orgânica de origem natural e sua complexação com íons cobre**. Campinas, 1995. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. (1999). Lead- and copper-complexation extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). **Phycol.**, v. 38, p. 283-288.

LOMBARDI, A.T.; VIEIRA, A.A.H. (2000). Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycol.**, 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.**, v. 38, p. 332-337.

MA, H.; ALLEN, H.E.; YIN, Y. (2001). Characterization of isolated fractionations of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. **Water Res.**, v. 35, p. 985-996.

MA, H.; ZHU, W.Z.; WANG, Z.J.; WITKAMP, G.J. (2003). Accumulation assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. **Aquat. Toxicol.**, v. 63, p. 221-228.

MAEDA, S.; NAKASHIMA, S.; TAKESHITA, T.; HIGASHI, S. (1985). Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae and the application to the removal of inorganic arsenic from aqueous phase. Part II. By *Chlorella vulgaris* isolated from arsenic-polluted environment. **Sep. Sci. Technol.**, v. 20, p.153-161.

MEADOR, J.P. (1991). The interactions of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. **Aquat. Toxicol.**, v. 19, p.13-32.

MORAES, R.B.C (2001). Estudos sobre poluição marinha: importância e perspectiva. In: MORAES, R.B.C; CRAPEZ, M.A.C.; PFEIFFER, W.C.; FARINA, M.; TEIXEIRA, V.L.; BAINY, A.C.D. (Eds.). **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. São Paulo: Editora Arte e Ciência. p. 9-11.

MORELLI, E.; MASCHERPA, M.C.; SCARANO, G. (2005). Byosynthesis of phytochelatins and arsenic accumulation in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in response to arsenate exposure. **Biometals**, v. 18, p. 587-593.

MORENO-GARRIDO, I.; LUBIAN, L.M.; SOARES, A.M.V.M. (2000). Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. **Ecotoxicology an Environmental Safety**, v. 47, p. 112-116.

MUNDA, I.M.; HUDNIK, V. (1986). Growth responses of *F. vesiculosus* to heavy metals, singly na in dual combinations, as related to accumulation. **Bot. Mar.**, v. 29, p. 401-412.

MURTY, A.S. (1988). **Toxicity of Pesticides to Fish**. Nagarjuna: University Nagarjunanagar , v. 1, n. 3, p. 178.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA. (1978). **Effects of Arsenic in the Canadian Environment**. Ontario: Publ. No. NRCC 15391.

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

NOR, Y.M. (1987). Ecotoxicology of copper to aquatic biota: a review. **Environ. Res.**, v. 43, p. 274-282.

NRIAGU, J.O. (1990). A silent epidemic of environmental metal poisoning. **Environ. Pollution**, v. 30, p. 139-161.

NULTSCH, W.; PFAU, J.; DOLLE, R. (1986). Effects of calcium channel blockers on phototaxis and motility of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Arch. Microbiol.**, v. 144, p. 393.

PELLEGRINI, M.; LAUGIE, A.; SERGENTE, M.; PHAN-TAN-LUN, R.; VALLS, R., PELLEGRINI, L. (1993). Interactions between the toxicity of heavy metals cadmium, copper, zinc in combinations and detoxifying role of calcium in the brown alga *Cystoseira barbata*. **J. Applied Phycol.**, v. 5, p. 351-361.

PLANAS, D.; HEALY, F.P. (1978). Effects of arsenate on growth and phosphorus metabolism of phytoplankton. **J. Phycol.**, v. 14, p. 337-341.

PRICE, N.M.; MOREL, F.M.M. (1994). Trace metal nutrition and toxicity in phytoplankton. In: RAI, L.C.; GAUR, J.P. (Eds.). **Algae and Water Pollution**, [s.n].

RAI, L.C.; GAUR, J.P.; KUMAR, H.D. (1981). Phycology and heavy-metal pollution. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 56, p. 99-151.

SÁ, F. (2003). **Distribuição e fracionamento de contaminantes nos sedimentos superficiais e atividades de dragagem no Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá (PR)**. Curitiba, 2003. 92 f. Tese (Mestrado em Geologia Ambiental) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

SANDERS, J.G. (1979). Effects of arsenic speciation and phosphate concentration on arsenic inhibition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). **J. Phycol.**, v. 15, p. 424-428.

SALOMONS, W.; FORSTNER, U. (1984). **Metals in the hydrocycle**. Berlin: Springer – Verlag. p. 1-349.

SANTOS, D.M.; BOSSINI, J.A.T.; PREUSSLER, K.H.; VASCONCELOS, E.C.; CARVALHO, F.S.; CARVALHO FILHO, M.A.S. (2004). Avaliação de metais pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil sobre influência de atividades antrópicas. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 8, Florianópolis: **Resumos...** Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina. p. 60.

SCHMITT, D.; MULLER, A.; CSOGOR, Z.; FRIMMEL, F.H.; POSTEN, C. (2001) The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. **Wat. Res.**, v. 35, p. 779-785.

SHITANDA, I.; KAZUTAKE, T.; SAKAI, T.; TATSUMA, T. (2005) Amperometric Biosensing Systems Based on Motility and Gravitaxis of Flagellate Algae for Aquatic Risk Assessment. **Anal. Chem.**, v.77, p. 6715-6718.

SHITANDA, I.; TATSUMA, T. (2006). Electrochemical system for the simultaneous monitoring of algal motility and phototaxis. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 349-353.

SLEJKOVEC, Z.; KÁPOLMA, E.; IPOLYI, I.; VAN ELTEREN, J.T. (2006). Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. **Chemosphere**, v. 63, p. 1098-1105.

SOMMER, U. (1988). Some relationships in phyto-flagellate motility. **Hydrol.**, v. 161, p. 125-131.

STAHAM, C.N.; MELANCON JR, M.J.; LECH, J. (1976). Bioconcentration of xenobiotics in trout bile: a proposed monitoring aid for some waterborne chemicals. **J. Sci.**, p. 680.

STAUBER, J.L. (1995). Toxicity testing Using marine and Freshwater unicellular algae. **Aust. J. Ecotoxicology**, v. 1, p. 15-24.

STAUBER, J.L.; FLORENCE, T.M. (1985a). Interactions of copper and manganese: a mechanism by which manganese alleviates copper toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. **Aquat. Toxicol.**, v. 7, p. 241-254.

STAUBER, J.L.; FLORENCE, T.M. (1985b). The influence of iron on copper toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) W. Smith. **Aquat. Toxicol.**, v. 6, p. 297-305.

STAUBER, J.L.; FLORENCE, T.M. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. **Mar. Biol.**, v. 94, p. 511-519.

STAUBER, J.L.; TSAI, J.; VAUGHAN, G.T.; PETERSON, S.M.; BROCKBANK, C.I. (1994). Algae as indicators of toxicity of the effluent from bleached eucalypt kraft pulp mills. **National Pulp Mills Research Program Technical Report Series** n.3, Canberra. p. 82.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN HELD, P.A. (1992). Molecular responses to environmental contamination: enzyme and systems as indicators of chemical exposure and effects. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR., P.M.; Bergman, H.L. (Eds.) **Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress**. Chelsea: Lewis Publishers. p. 235-335.

STRÖNGEM, T. (1980). The effects of lead, cadmium and mercury on the increase in length of five intertidal Fucales. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 43, p. 225-231.

SUNDA, W.G.; GUILLARD, R.R.L. (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. **J. Mar. Res.**, v. 34, n. 4, p. 511-529.

SUNDA, W.G.; HUNTSMAN, S.A. (1992). Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. **Limnol. Oceanogr.**, v. 37, p. 25-40.

SWANSON, S.M.; RICKARD, C.P.; FREEMARK, K.E.; MACQUARRIE, P. (1991). Testing for pesticide toxicity to aquatic plants: recommendations for test species. In: GORSUCH, J.W., LOWER, W.R., WANG, W., LEWIS, M.A., (Eds.). **Plants for toxicity assessment**. Philadelphia: Lewis Publishers. v. 2, p 77-97.

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.**, v. 17, n. 3, p. 412 – 419.

THIEL, T. (1988). Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 1143-1147.

ULLRICH-EBERIUS, C.I.; SANZ, A.; NOVACKY, A.J. (1989). Evaluation of arsenate and vanadate associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* G1. **J. Exp. Bot.**, v. 40, p. 119-128.

WÄNGBERG, S.A.; BLANCK, H. (1990). Arsenate sensitivity in marine periphyton communities established under various nutrient regimes. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 139, p. 119-134.

WANGERSKY, P.J. (1994). Sampling and analysis of particulate and dissolved materials. In: WOTTON, R.S. (Ed.). **The biology of particles in aquatic systems**. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 7 – 43.

WEBER, C.I.; PELTIER, W.H.; NORBERG-KING, T.J.; HORNING, W.B.; KESSLER, F.A.; MENKEDICK, J.R.; NEIHEISEL, T.W.; LEWIS, P.A.; KLEMM, D.J.; PICKERING, Q.H.; ROBINSON, E.L.; LAZORCHAK, J.M.; WYMER, L. (1989). **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. Ohio, United States Environmental Protection Agency. EPA/600/4-89/001.

WHITTON, B.A. (1968). Effect of light on toxicity of various substances to *Anacystis nidulans*. **Plant. Cell. Physiol.**, v. 9, p. 2

ANEXOS

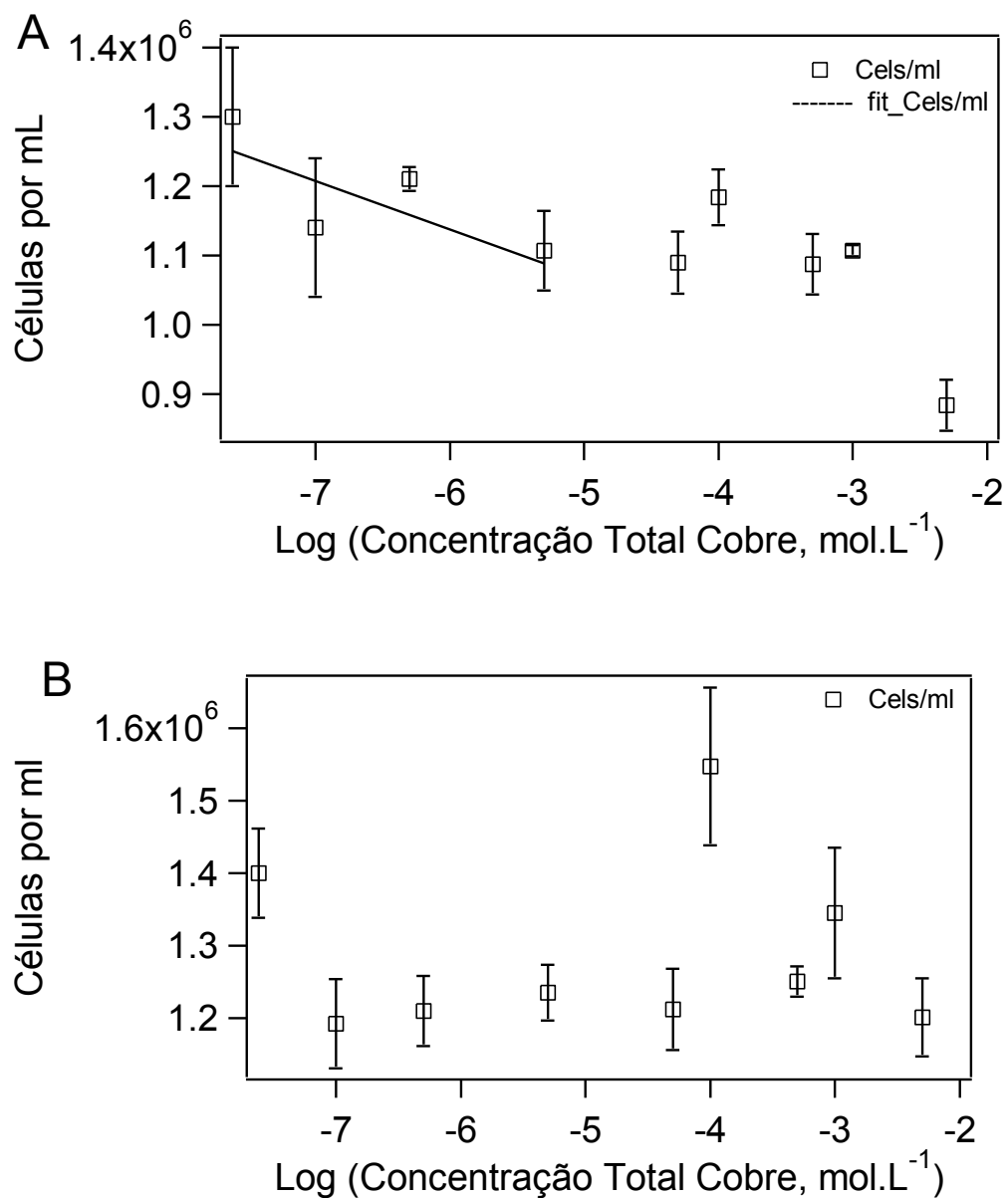


FIGURA 11. CÉLULAS POR MILITRO DE CULTURA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO MEIO. (A) PRESENÇA DE MOD. (B) AUSÊNCIA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (72 H DE EXPOSIÇÃO).

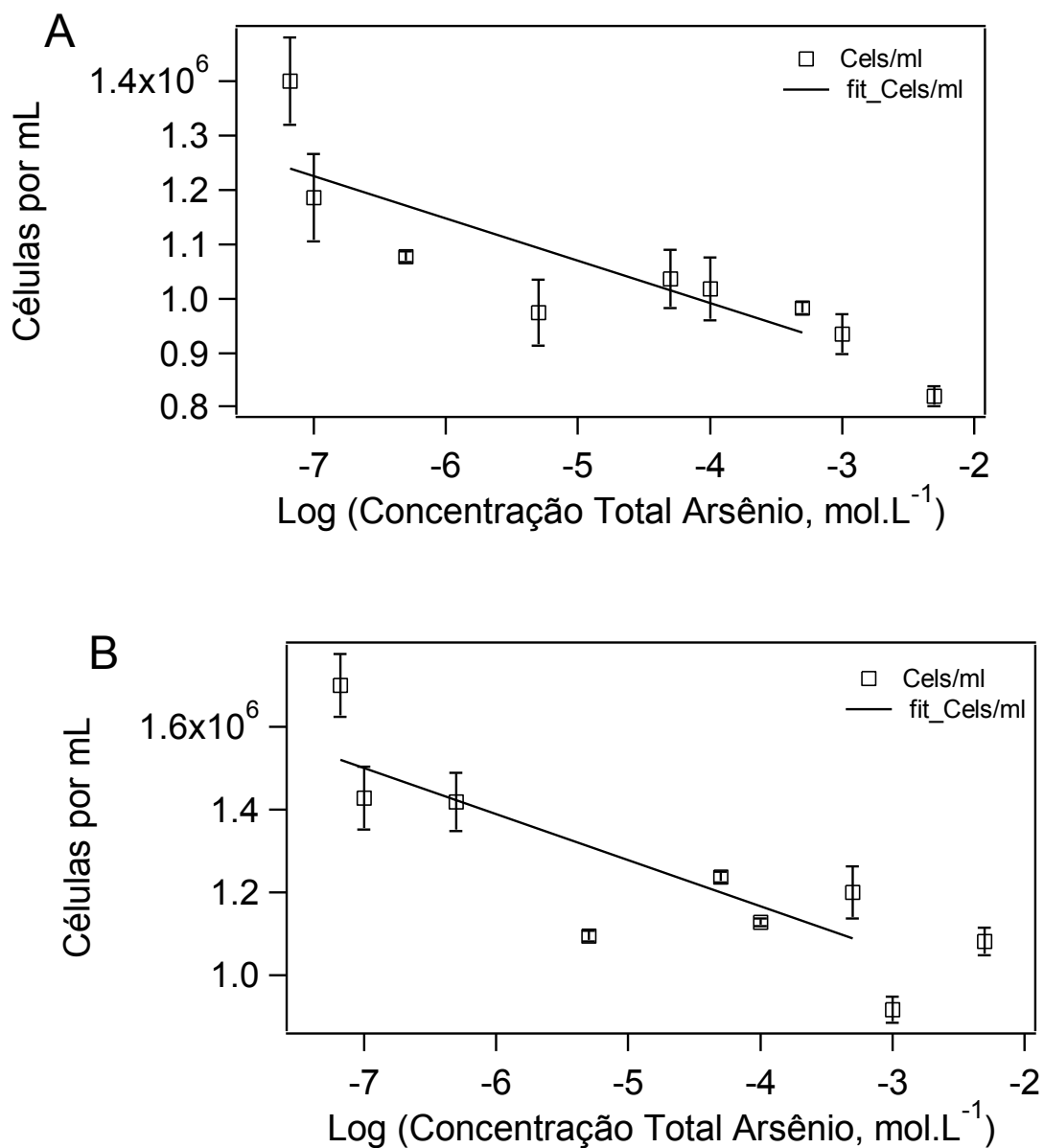


FIGURA 12. CÉLULAS POR MILILITRO DE CULTURA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO. (A) PRESENÇA DE MOD. (B) AUSÊNCIA DE MOD. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (72 H DE EXPOSIÇÃO).

TABELA 09. CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO MEIO. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

CuCl ₂ sem MOD	Clorofila-a (mg.L ⁻¹)	Desvio Padrão	CuCl ₂ com MOD	Clorofila-a (mg.L ⁻¹)	Desvio Padrão
Controle	4,022993333	1,581026554	Controle	1,876233	0,124156
10⁻⁷	3,184837	0,113252	10⁻⁷	2,210227	0,075124
5x10⁻⁷	3,231643	0,189361	5x10⁻⁷	2,242753	0,04273
5x10⁻⁶	1,12336	0,098963	5x10⁻⁶	1,815147	0,386062
5x10⁻⁵	0,976593	0,088552	5x10⁻⁵	0,8092	0,066256
10⁻⁴	3,68067	0,176778	10⁻⁴	0,80682	0,063372
5x10⁻⁴	2,436723	0,103915	5x10⁻⁴	0,49028	0,055357
10⁻³	2,900823	0,123309	10⁻³	0,675127	0,025225
5x10⁻³	2,95953	0,665979	5x10⁻³	0,74256	0,371196

TABELA 10. CLOROFILA-A EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSÊNIO NO MEIO. CADA PONTO REPRESENTA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DE TRÊS RÉPLICAS (96 H DE EXPOSIÇÃO).

As(V) sem MOD	Clorofila-a (mg.L ⁻¹)	Desvio Padrão	As(V) com MOD	Clorofila-a (mg.L ⁻¹)	Desvio Padrão
Controle	4,022993333	1,581026554	Controle	1,876233	0,124156
10⁻⁷	3,809586667	0,638640232	10⁻⁷	1,911933	0,39843
5x10⁻⁷	3,339933333	0,352564153	5x10⁻⁷	2,04442	0,245175
5x10⁻⁶	2,63228	0,163719091	5x10⁻⁶	2,869487	0,428012
5x10⁻⁵	3,305026667	0,092555178	5x10⁻⁵	2,502967	0,291784
10⁻⁴	2,043626667	0,307649716	10⁻⁴	2,164213	0,429881
5x10⁻⁴	3,07258	0,25186428	5x10⁻⁴	2,57516	0,292081
10⁻³	1,98016	0,28026458	10⁻³	2,466473	0,083277
5x10⁻³	2,647353333	0,454326561	5x10⁻³	2,17056	0,274877