

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

BRUNA HORVATH VIEIRA

**Análise do potencial de toxicidade do cromo em populações fito e
zooplanctônicas e em suas interações tróficas: aspectos estruturais e fisiológicos**

São Carlos - SP
2014

BRUNA HORVATH VIEIRA

Análise do potencial de toxicidade do cromo em populações fito e zooplanctônicas e em suas interações tróficas: aspectos estruturais e fisiológicos

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo L. G. Espíndola

São Carlos - SP

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ha Horvath Vieira, Bruna
Análise do potencial de toxicidade do cromo em
populações fito e zooplancctônicas e em suas interações
tróficas: aspectos estruturais e fisiológicos / Bruna
Horvath Vieira; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola.
São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental e Área de Concentração
em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

1. Ecotoxicologia. 2. metal. 3. proteínas. 4.
carboidratos. 5. lipídeos. 6. Cladocera. 7.
Clorophyceae. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **BRUNA HORVATH VIEIRA**.

Título da tese: "Análise do potencial de toxicidade do cromo em populações fito e zooplancônicas e em suas interações tróficas: aspectos estruturais e fisiológicos".

Data da defesa: 28/04/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espíndola (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADA

Dra. **Cláudia Fileto**
(Pesquisadora FIPAI/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Eny Maria Vieira**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovada

Profa. Dra. **Suzelei Rodgher**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- São José dos Campos)

Aprovada

Profa. Dra. **Ana Teresa Lombardi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA Ana Lombardi

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Dr. **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Evaldo L. G. Espíndola pela orientação e confiança.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP (Processo 2011/07218-6) pela bolsa de Auxílio à Pesquisa concedida.

Às Profs. Drs. Ana Teresa Lombardi, Maria da Graça Gama Melão e Odete Rocha da Universidade Federal de São Carlos pelo apoio e contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano, ao doutorando Bruno Fiorelini Pereira e ao técnico Antonio Teruyoshi Yabukida, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho pelo auxílio nas análises de microscopia.

À Dr. Suzelei Rodgher pela contribuição ao trabalho.

Aos técnicos Marcelo Menezes Nogueira e Amândio Menezes Nogueira e demais funcionários do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, da EESC/USP.

Aos técnicos José Valdecir de Lucca, Carlos Casali e Antonio Luiz Sartori, da Universidade Federal de São Carlos.

À pesquisadora Ingritt Caroline Moreira, pela ajuda no laboratório.

À amiga Renata N. Haneda pela parceria.

Aos amigos Mathias A. Chia, Giseli S. Rocha e Lays Alho, pelas contribuições ao trabalho.

Aos amigos do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada e da Universidade Federal de São Carlos.

À minha mãe e aos meus irmãos.

RESUMO

VIEIRA, B. H. **Análise do potencial de toxicidade do cromo em populações fito e zooplanctônicas e em suas interações tróficas: aspectos estruturais e fisiológicos.** 2014. 141f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O cromo é o sétimo metal mais abundante na crosta terrestre e ocorre naturalmente nos diversos compartimentos ambientais, porém o intenso uso deste metal em atividades industriais tem aumentado a liberação deste contaminante, ocasionando alterações na estrutura e funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Considerando as diferentes formas de exposição ao metal pelos organismos, procurou-se avaliar os efeitos do cromo nas populações fitoplanctônica e zooplanctônica e nas interações tróficas entre ambas, com base em aspectos estruturais e fisiológicos. Para tanto, foram realizados ensaios ecotoxicológicos com duas espécies de algas (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*), avaliando efeitos na densidade celular, concentração de pigmentos e composição bioquímica, além de ensaios com organismos zooplanctônicos (*Cladocera Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*) expostos a diferentes vias de contaminação, como água contaminada, alimento contaminado e a combinação de ambas as situações (água e alimento contaminados), avaliando efeitos na sobrevivência, fecundidade, taxa de alimentação e composição bioquímica. Os resultados obtidos demonstraram que o cromo, nas condições testadas, afetou o crescimento, a concentração de pigmentos e a composição bioquímica das algas *P. subcapitata* e *C. vulgaris*. Nos ensaios realizados com *C. dubia* e *C. silvestrii*, os diferentes tratamentos com cromo não alteraram a sobrevivência destas espécies, porém, nos tratamentos com meio aquoso contaminado com cromo e exposição combinada (meio aquoso e alimento contaminados com cromo) houve redução na fecundidade e diminuição da taxa alimentar destes organismos. Redução no crescimento populacional e aumento de proteínas, carboidratos e lipídeos totais de *C. dubia* e *C. silvestrii* também foram relacionados à presença de cromo. Conclui-se, portanto, que o cromo, nas condições testadas, foi tóxico para as espécies fito e zooplanctônicas, podendo causar alterações nas cadeias tróficas dos ecossistemas aquáticos.

Palavras chave: Ecotoxicologia, metal, proteínas, carboidratos, lipídeos, Cladocera, Chlorophyceae.

ABSTRACT

VIEIRA, B. H. **Analysis of the potential toxicity of chromium in phytoplankton and zooplankton populations and their trophic interactions: structural and physiological aspects.** 2014. 141f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Chromium is the seventh most abundant metal in the earth's crust and occurs naturally in various environmental compartments, but the heavy use of this metal in industrial activities has increased the release of this contaminant, causing changes in the structure and functioning of terrestrial and aquatic ecosystems. Considering the different forms of exposure to metal by organisms, sought to evaluate the effects of chromium on phytoplankton and zooplankton populations and trophic interactions between them, based on structural and physiological aspects. For this, ecotoxicological tests were conducted with two species of algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella vulgaris*), assessing effects on cellular density, pigment concentration and biochemical composition, and tests with zooplankton (Cladocera *Ceriodaphnia dubia* and *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to different ways of contamination, such as contaminated water, contaminated food and a combination of both situations (contaminated water and food), evaluating effects on survival, fertility, feed rate and biochemical composition. The results showed that chromium under the conditions tested, affected the growth, pigment concentration and biochemical composition of the algae *P. subcapitata* and *C. vulgaris*. For tests with *C. dubia* and *C. silvestrii*, the different treatments with chromium did not affect survival of these species, however, in treated aqueous medium contaminated with chromium and combined exposure (aqueous and food contaminated with chromium) there was a reduction in fecundity and decreased feed rate of these organisms. Reduction in population growth and increased protein, carbohydrate and lipid of *C. dubia* and *C. silvestrii* were also related to the presence of chromium. Therefore, it is concluded that chromium, in the conditions tested, was toxic to phytoplankton and zooplankton species, may cause changes in trophic chains of aquatic ecosystems.

Keywords: Ecotoxicology, metal, proteins, carbohydrates, lipids, Cladocera, Chlorophyceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental da etapa II desta pesquisa	47
Figura 2: Delineamento experimental da etapa III desta pesquisa	54
Figura 3: Densidade celular (cels.mL ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	60
Figura 4: Biomassa seca (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	60
Figura 5: Concentração de clorofila <i>a</i> (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	61
Figura 6: Concentração de feofitina (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	62
Figura 7: Concentração de carotenoides (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	62
Figura 8: Conteúdo intracelular de proteínas (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	63
Figura 9: Conteúdo intracelular de carboidratos (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).	63
Figura 10: Lipídeos totais (pg.cel ⁻¹) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (A) e <i>Chlorella vulgaris</i> (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).....	64

Figura 11: Fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e sobrevivência (%) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*..... 68

Figura 12: Fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e sobrevivência (%) de *Ceriodaphnia dubia* (C) e *Ceriodaphnia silvestrii* (D) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. 68

Figura 13: Taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 69

Figura 14: Taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* (C) e *Ceriodaphnia silvestrii* (D) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. 69

Figura 15: Taxa de aumento populacional (r) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 80

Figura 16: Conteúdo total de proteínas ($\mu\text{g.org}$) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 81

Figura 17: Conteúdo total de carboidratos ($\mu\text{g.org}$) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de

alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 81

Figura 18: Conteúdo total de lipídeos (ng.org) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição lipídica (%) de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo (Cr).	64
Tabela 2: Valores médios de densidade celular, biomassa seca e composição bioquímica de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> após 96 horas de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; p<0,05).....	65
Tabela 3: Valores médios de densidade celular, biomassa seca e composição bioquímica de <i>Chlorella vulgaris</i> após 96 horas de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L ⁻¹ de cromo. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; p<0,05).....	65
Tabela 4: Concentração de cromo (mg.L ⁻¹) quantificada nas soluções-teste no início dos ensaios com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e após 96 horas de exposição.....	66
Tabela 5: Concentração de cromo (mg.L ⁻¹) quantificada nas soluções-teste no início dos ensaios com <i>Chlorella vulgaris</i> e após 96 horas de exposição.....	66
Tabela 6: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de <i>Ceriodaphnia dubia</i> quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; p<0,05)	70
Tabela 7: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; p<0,05)	70

Tabela 8: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$) 70

Tabela 9: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$) 70

Tabela 10: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 75

Tabela 11: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 76

Tabela 12: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. 77

Tabela 13: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*

quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. 78

Tabela 14: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) da suspensão algal oferecida como alimento nos tratamentos AC (alimento contaminado) e AMC (alimento e meio contaminado) dos ensaios crônicos com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*..... 79

Tabela 15: Composição lipídica (%) de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.. 82

Tabela 16: Valores médios da taxa de aumento populacional e conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; $p < 0,05$)..... 83

Tabela 17: Valores médios da taxa de aumento populacional e conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; $p < 0,05$)..... 83

Tabela 18: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste do ensaio com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 84

Tabela 19: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste do ensaio com *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
PARTE I: ENSAIO COM ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS.....	40
4.1. Cultivo dos organismos-teste <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	40
4.2. Teste de toxicidade com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	40
4.3. Indicadores estruturais e fisiológicos das espécies algais	41
4.3.1. Densidade celular	41
4.3.2. Biomassa seca.....	42
4.3.3. Determinação de clorofila <i>a</i> , feofitina e carotenoides.....	42
4.3.4. Conteúdo intracelular de carboidrato	43
4.3.5. Conteúdo intracelular de proteína	43
4.3.6. Lipídeo.....	44
4.4. Análise de metais.....	44
PARTE II: ENSAIOS COM ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS (ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS POPULAÇÕES).....	45
4.5. Cultivo dos organismos-teste <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	45

4.6. Efeitos da exposição ao metal no meio aquoso, na dieta e nas condições combinadas (meio aquoso e alimento contaminados) para <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	46
4.6.1. Exposição de <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> à água contaminada.....	48
4.6.2. Exposição de <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ao alimento contaminado	49
4.6.3 Exposição combinada (água e alimento contaminados).....	50
4.7. Análise de metais.....	50
PARTE III: ENSAIOS COM ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS (ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS POPULAÇÕES).....	51
4.8.1 Taxa intrínseca de aumento populacional de <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	55
4.8.2. Determinação do conteúdo total de proteínas.....	55
4.8.3. Determinação do conteúdo total de carboidratos	56
4.8.4. Lipídeo.....	56
4.9. Análise de metais.....	57
4.10. Destino e tratamento dos resíduos gerados.....	57
4.11. Análise dos dados	57
5. RESULTADOS	59
ETAPA I: Ensaio com organismos fitoplanctônicos	59
Densidade celular, biomassa seca e conteúdo bioquímico de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	59
Análise de metais.....	65
ETAPA II: Ensaio com organismos zooplanctônicos: aspectos estruturais das populações ..	66

Sobrevivência, fecundidade e taxa de alimentação dos ensaios de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	66
Análise de metais.....	72
PARTE III: ENSAIOS COM ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS: ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS POPULAÇÕES	79
Taxa de aumento populacional e conteúdo total de proteínas, carboidratos e lipídeos de <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	79
Análise de metais.....	83
6. DISCUSSÃO.....	85
8. CONCLUSÃO.....	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXO	119

1. INTRODUÇÃO

O crescimento das atividades econômicas, notadamente a industrial e a agrícola, trouxe consigo o aumento do uso e descarte no ambiente de substâncias químicas tóxicas, dentre elas os metais (OLIVEIRA NETO, 2000). Embora os metais traço existam em baixas concentrações na crosta terrestre (BAIRD, 1998), foi após o crescimento da industrialização, no século XX, que suas concentrações aumentaram significativamente no meio ambiente (CALLENDER, 2004). Muitos dos metais introduzidos no ambiente, como resultado de atividades humanas, são nutrientes. No entanto, quando presentes em concentrações mais elevadas do que a natural tornam-se tóxicos, podendo afetar a biota, incorporando-se ao longo da cadeia alimentar e, conseqüentemente, ocasionando danos também à saúde humana (KHAN et al., 2005; NOGUEIRA, 2007).

Diferentemente de alguns poluentes orgânicos que podem ser degradados pela ação de organismos heterotróficos, os metais não são degradados química nem biologicamente, tendendo a se acumular no ambiente (NOGUEIRA, 2007), o que pode ampliar os efeitos tóxicos nos ecossistemas. A toxicidade dos metais interfere no ciclo de vida dos organismos, podendo causar modificações sobre a reprodução e processos fisiológicos, tais como crescimento e desenvolvimento. Além disso, os metais influenciam o comportamento desses organismos, tendo como consequência uma variedade de efeitos em relação às interações biológicas (BRULAND et al., 1991). Desta forma, as interferências irão afetar a longevidade, a reprodução e a dinâmica de populações, podendo causar desequilíbrio ecológico no ecossistema aquático (NOGUEIRA, 2007).

No ambiente aquático os metais são oriundos de fontes naturais, como lavagem geológica de solos e rochas diretamente expostos à água, e por meio de fontes antrópicas, como efluentes domésticos e industriais, aplicação de pesticidas na agricultura, água de irrigação contaminada, queima de biomassa na zona rural, combustão a carvão e óleo,

emissões veiculares, incineração de resíduos urbanos e industriais e, principalmente, por atividades da mineração, fundição e refinamento (EBRAHIMPOUR e MUSHRIFAH, 2008; LEMES, 2001).

Considerando os diversos efeitos deletérios, o estudo da biota torna-se de fundamental importância para a previsão dos impactos de metais e de outras substâncias tóxicas presentes nos sistemas aquáticos. Nesse sentido, programas de monitoramento da qualidade das águas que empregam exclusivamente índices físicos e químicos tem sido alvo de críticas severas por vários pesquisadores que apontam a necessidade de se aplicar medidas biológicas para obtenção de uma abordagem ecossistêmica (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006), o que vem sendo feito pelos estudos ecotoxicológicos.

A ecotoxicologia estuda os efeitos de compostos químicos e outros xenobióticos sobre os organismos aquáticos com ênfase especial nos efeitos adversos ou danosos, utilizando testes com organismos sob condições de campo e de laboratório, por meio dos quais tem sido verificada a toxicidade dos compostos (ARAÚJO, 2000). Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar a concentração dos agentes químicos, bem como o período de exposição necessário para produzir um efeito pré-determinado, ou seja, um teste toxicológico é desenvolvido para mensurar o grau da resposta produzida por um nível específico de estímulo ou concentração do composto em estudo (RAND e PETROCELLI, 1985) sob um determinado organismo teste (RAND et al., 1995).

Dentre os organismos mais recomendados para ensaios de avaliação da toxicidade aquática estão as algas, pois são produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ecossistema aquático (PFLEEGER et al., 1991). Assim a utilização de microalgas em testes de toxicidade apresenta grande importância já que qualquer alteração na comunidade fitoplanctônica pode afetar a estrutura e a função de todo o ecossistema (MASUTTI, 2004).

Segundo ZHOU et al. (2008), a exposição aos metais pode causar perturbações no metabolismo e nas funções biológicas das espécies algais, como a inibição da fotossíntese, redução do citocromo, mutação celular e até a morte da comunidade fitoplanctônica. Os constituintes da parede celular das algas têm um importante papel na bioabsorção de metais, pois são frequentemente porosos, o que permite que moléculas e íons passem livremente através deles. A permeabilidade da estrutura da parede celular das algas e os constituintes de suas células podem disponibilizar estruturas químicas que promovem a “captura” de íons metálicos (VOLESKY, 1990).

Além do fitoplâncton, os organismos zooplanctônicos desempenham importante papel na cadeia trófica, como elo entre os produtores primários e demais consumidores da cadeia trófica, além de serem responsáveis por grande parcela da regeneração de nutrientes e refertilização da coluna de água (OLIVEIRA NETO, 2000). Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação com a presença de metal na dieta de invertebrados. Portanto, estudos que investigam os parâmetros do ciclo de vida, tais como sobrevivência e reprodução de invertebrados aquáticos em situações de exposição a metais por outras rotas de contaminação, além da água, são de interesse ecológico (RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008a e 2008b).

Uma nova abordagem nos estudos ecotoxicológicos tem discutido ainda o papel do alimento, representado pelas células algais, sobre o efeito tóxico dos metais em organismos zooplanctônicos (RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008b). Desde que os organismos aquáticos, no ambiente, tenham alimento disponível durante exposição a poluentes, maior atenção também deve ser dada ao papel do alimento nos testes de toxicidade, uma vez que a capacidade das algas para reter metais e para disponibilizá-los aos seus consumidores pode ser considerada uma rota de contaminação a agentes tóxicos (LANNO et al.; 1989). Por outro lado, a toxicidade de metais poderá ser reduzida devido a capacidade das algas em complexar

tais elementos (LOMBARDI e VIEIRA, 2000). Reconhece-se, portanto, que as rotas de exposição dos metais na cadeia trófica são complexas, tornando-se fundamental o reconhecimento dos mecanismos existentes para potencializar, ou mesmo reduzir, os efeitos dos toxicantes sobre os organismos zooplanctônicos.

Em relação aos metais, o cromo (objeto de estudo desta pesquisa) e seus compostos têm sido amplamente empregados pelas indústrias de cromagem, soldagem, pintura, acabamentos metálicos e fabricação de aço, resultando em grandes quantidades deste elemento no meio ambiente (NRIAGU e NIEBOER, 1988). Na natureza o cromo existe principalmente em dois estados de valência, o cromo hexavalente e trivalente, sendo o cromo hexavalente um metal potencialmente tóxico que afeta as condições ambientais em sistemas aquáticos (BAGCHI et al., 2005)

Diante da importância dos metais na contaminação dos ecossistemas aquáticos, bem como a necessidade de melhor entendimento das interações desses elementos no ambiente, se faz necessários estudos que avaliem a influência do contaminante em organismos aquáticos e nas interações tróficas em ambientes contaminados, o que caracteriza a abordagem desta pesquisa.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar os efeitos da exposição ao cromo nas populações fitoplanctônica e zooplanctônica e nas interações tróficas desses organismos com base em aspectos estruturais e fisiológicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos da exposição ao cromo sobre a densidade celular e biomassa seca de organismos fitoplanctônicos, tendo como organismos-teste as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*;

Avaliar o efeito de cromo sobre o conteúdo fisiológico (concentração de pigmentos e conteúdo intracelular de proteínas, carboidratos e lipídeos) das algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*;

Determinar os efeitos crônicos do cromo sobre a fecundidade, sobrevivência e taxa alimentar de organismos zooplanctônicos (*Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*) por meio de três diferentes vias de exposições ao metal (água contaminada; alimento contaminado; combinação de água e alimento contaminados), utilizando como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*;

Determinar os efeitos crônicos do cromo sobre a fecundidade, sobrevivência e taxa alimentar de organismos zooplanctônicos (*Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*) por meio de três diferentes vias de exposições ao metal (via água contaminada; alimento contaminado; combinação de água e alimento contaminados), utilizando como alimento a alga *Chlorella vulgaris*;

Avaliar o conteúdo bioquímico (carboidratos, proteínas e lipídeos) e a taxa de crescimento populacional das populações zooplanctônicas expostas ao cromo via água contaminada e alimento contaminado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo crescente processo de contaminação oriundo de atividades industriais, agrícolas e urbanas. No entanto, apenas a mensuração destes contaminantes no ambiente não traz respostas sobre os efeitos adversos que estas substâncias

vêm causando nos organismos vivos presentes nestes ambientes (FREIRE et al., 2008), tornando-se necessária a utilização de estudos ecotoxicológicos para se determinar os efeitos tóxicos dos poluentes.

Entre a grande variedade de poluentes que interferem no metabolismo dos ecossistemas aquáticos, os metais estão entre aqueles considerados não degradáveis e mais comuns na maioria das regiões do mundo (MALLICK e MOHN, 2003). Muitos estudos (OLIVEIRA NETO, 2000; RODGHER, 2005; TUKAJ et al., 2007; MASUTTI, 2004; TERRY e STONE, 2002; PEÑA-CASTRO et al., 2004; PEMPKOWIAK e KOSAKOWSKA, 1998; OMAR, 2002) têm demonstrado os efeitos adversos de metais tóxicos na comunidade fitoplanctônica, como alterações na divisão, crescimento e atividade fotossintética, além do decréscimo na produtividade, na diversidade e alterações na composição das espécies algais.

Peña-Castro et al. (2004), por exemplo, realizaram experimentos com cobre, cádmio e cromo em laboratório utilizando a alga *Scenedesmus incrassatulus* (espécie formadora de cenóbios com quatro células) e observaram plasticidade fenotípica da alga após a exposição aos metais que induziram o desenvolvimento de formas unicelulares e alterações nos parâmetros fotossintéticos. Segundo os autores, o número de células por cenóbio diminuiu quando a concentração de metais aumentou, verificando-se que quando as células algais contaminadas eram transferidas para meios de cultura sem contaminação, a população com quatro células no cenóbio se regenerava. Para os autores o desenvolvimento de morfotipos pode conferir vantagens ecológicas para *S. incrassatulus* em ambientes contaminados, pois os metais podem diminuir a disponibilidade de energia para microalgas através de vários mecanismos, incluindo danos fotossintéticos por meios de produção de radicais livres. Este fato levaria *S. incrassatulus* a produzir alterações morfológicas como a redução no número de células por cenóbio, aumentando assim o aproveitamento energético celular.

Alterações fenotípicas já foram registradas em outras condições de estresse, como em um estudo de impacto ecológico de efluentes de minas de água doce realizados por Monteiro et al. (1995). Neste estudo, populações unicelulares de *Scenedesmus armatus* foram dominantes quando concentrações de metais foram altas o suficiente para inibir o crescimento de outras microalgas.

Terry e Stone (2002), em um estudo de remoção de metais por *Scenedesmus abundans*, realizaram ensaios para determinar o efeito da concentração de metais na viabilidade celular de clorofila *a*. Pré-exposição e pós-exposição de clorofila foram medidas após 72h de exposição do metal e os autores verificaram que concentração acima de 15 mg.L⁻¹ de cádmio ou cobre resultou em redução estatisticamente significativa da clorofila *a* de *S. abundans*. Omar (2002), em experimentos com zinco utilizando as algas verdes *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus quadricauda*, também observou a inibição de 24% no crescimento de *S. obliquus* e de 33% em *S. quadricauda* quando expostas a 8,0 ppm de Zn. O autor observou ainda a diminuição no teor de aminoácidos de ambas as espécies quando expostas a mesma concentração de Zn.

Pempkowiak e Kosakowska (1998), em experimentos com cádmio utilizando a espécie *Chlorella vulgaris*, evidenciaram a diminuição no crescimento algáceo após exposição ao metal. O número de células e a concentração de clorofila *a* sofreram redução de 40% a 60% quando exposta a uma concentração de 500 µg.dm³ de cádmio.

Stauber e Florence (1987) estudaram o mecanismo de toxicidade do cobre no crescimento, fotossíntese, respiração, níveis de ATP e no transporte de elétrons mitocondrial em duas diatomáceas marinhas, *Nitzschia closterium* e *Asterionella glacialis*, e na alga verde de água doce, *Chlorella pyrenoidosa*. Os autores observaram que íons de cobre reduziram a divisão celular e a atividade fotossintética em *A. glacialis* e em *C. pyrenoidosa*. Para *N. closterium* o tratamento com cobre causou inchaço celular devido ao alargamento dos

vacúolos das células, impedindo assim que houvesse divisão celular. Neste estudo os autores citam outros trabalhos que sugerem que o cobre e o mercúrio podem impedir a produção de metionina, que parece ser necessário para divisão celular. Também foi proposto que os metais inibem a divisão celular do fitoplâncton ligando tióis reativos à molécula de tubulina, importante na formação do fuso mitótico.

Shehata e Badr (1980) realizaram bioensaios de toxicidade com *Scenedesmus* sob condições controladas, utilizando as alterações na concentração de clorofila *a* como uma indicação da toxicidade do metal, sendo cobre, cádmio, níquel, zinco e chumbo os metais testados. Os autores evidenciaram redução do crescimento algáceo quando as algas foram expostas a 0,5 mg.L⁻¹ de Cu; 2 mg.L⁻¹ de Ni; 0,5 mg.L⁻¹ de Cd; 2 mg.L⁻¹ de Zn e 30 mg.L⁻¹ de Pb. Análises de células de *Scenedesmus* com mais de sete dias de exposição aos metais revelaram alterações anatômicas e rompimento do cloroplasto, especialmente em elevadas concentrações do contaminante.

Experimentos de curto prazo foram realizados por Tukaj et al. (2007) para analisar a toxicidade do cloreto de cádmio em uma concentração de 93 µM (EC₅₀;24h) para a microalga *Scenedesmus armatus*, cultivadas em diferentes concentrações de CO₂. O cádmio não afetou a viabilidade das células cultivadas por 24h, mas marcadamente inibiu o crescimento das algas. Como consequência do tratamento com o metal, as modificações na ultra-estrutura celular foram marcantes. Os cloroplastos mostraram um aumento do número de grãos de amido ao redor do pirenóide e este, por sua vez, apresentou tamanho reduzido. Em casos extremos, quantidades de amido ocupavam quase a totalidade do cloroplasto. Os autores também ressaltaram que a principal estratégia de desintoxicação de plantas contaminadas por metais é a produção de fitoquelatinas e, neste estudo, *S. armatus*, em resposta ao tratamento com Cd e independentemente dos níveis de CO₂ testados, produziu fitoquelatinas.

Mallick e Mohn (2003) realizaram um estudo com o objetivo de medir o impacto e o modo de ação de cinco metais (Cu, Cd, Ni, Cr e Zn) nas características de fluorescência da clorofila da microalga *Scenedesmus obliquus* e concluíram que os metais Cu, Ni, Cd e Cr causaram alterações significativas na fluorescência da microalga por impedir o transporte de elétrons no Fotossistema II, o que conseqüentemente resulta na diminuição da síntese de ATP e NADPH.

Rocchetta et al. (2006a) avaliaram o efeito do cromo hexavalente na composição de ácidos graxos em duas linhagens de *Euglena gracilis* que foram expostas a duas concentrações do metal, sendo uma abaixo e outra acima da CI_{50} . Os autores observaram que ácidos graxos poliinsaturados foram os mais afetados pelo cromo, especialmente aqueles relacionados à estrutura dos cloroplastos. O estudo da ultra-estrutura celular mostrou desorganização do tilacóide nas células tratadas com cromo. Para os autores, os resultados indicam que o cromo hexavalente afeta os níveis de ácidos graxos, especialmente os relacionados com a atividade fotossintética, sendo que essas alterações poderiam ser parte de uma defesa ou mecanismo de reparação com o objetivo de reduzir os danos celulares causados pelo estresse ao cromo.

Romero et al. (2002) realizaram experimentos com as algas marinhas *Tetraselmis* sp. e *Chaetoceros* sp. com o objetivo de determinar o efeito tóxico de Cd no crescimento celular e em indicadores fisiológicos (volume celular, componentes bioquímicos e concentração de pigmentos). Neste estudo a dose letal para 50% da população após 96h de exposição ao metal foi de 0,63 e 0,56 $mg.L^{-1}$ para *Tetraselmis* sp. e *Chaetoceros* sp., respectivamente. Os autores também realizaram um bioensaio com 14 dias de duração, onde ambas as espécies mostraram uma diminuição no crescimento celular, na concentração de pigmentos e um aumento no volume celular. Os componentes bioquímicos (proteínas e carboidratos), em ambas as espécies, manteve-se constante durante as fases de crescimento, em contraste com seus

respectivos controles, que mostraram um aumento progressivo. Os níveis de mortalidade, para as duas espécies testadas, aumentaram com concentrações crescentes de Cd, sendo que os maiores efeitos ocorreram antes de 24h. Com relação ao aumento do volume celular, *Tetraselmis*, quando exposta ao Cd, alcançou os maiores volumes quando comparados ao controle, sendo $1900 \mu\text{m}^3$ para o tratamento com Cd e $1523 \mu\text{m}^3$ para o tratamento sem o tóxico. *Chaetoceros* teve o volume celular máximo de $515 \mu\text{m}^3$ quando exposta ao Cd e de $180 \mu\text{m}^3$ no tratamento controle. Ambas as algas mostraram a mesma tendência no aumento das concentrações de proteína nas culturas controle, sendo que *Chaetoceros* apresentou $5,05 \text{ pg.cel}^{-1}$ de proteína e *Tetraselmis* atingiu um valor de $16,6 \text{ pg.cel}^{-1}$. As culturas com o tóxico não apresentaram variações significativas no teor de proteína, verificando-se que o maior valor proteico foi produzido por *Chaetoceros* sp., que atingiu $3,62 \text{ pg.cel}^{-1}$.

Verifica-se, com base no anteriormente exposto, que o conhecimento dos efeitos de agentes tóxicos em organismos fitoplanctônicos é de grande interesse, pois alterações em sua abundância e na estrutura da comunidade irão desencadear alterações nos níveis tróficos superiores (MUNAWAR et al., 1989).

A utilização das algas como organismos-teste tem por base seu ciclo de vida curto, facilitando os estudos de exposição com várias gerações, além das altas taxas de crescimento, da facilidade em manter as culturas e da capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos. Os ensaios com algas são fonte de informações quantitativas importantes sobre a disponibilidade das substâncias químicas, nutrientes ou substâncias potencialmente tóxicas e seus efeitos nos ecossistemas. É interessante observar que a informação total obtida nos ensaios com algas supera o significado da soma de todos os dados parciais sobre a abundância relativa dos componentes individuais do sistema aquático, uma vez que a análise química informa a concentração das substâncias presentes, mas não fornece conhecimento de sua influência na água, habitat para os diferentes organismos. Os ensaios com algas, portanto,

abrem a possibilidade de uma combinação de medidas físicas, químicas e biológicas, que resulta em informações importantes, incluindo a análise de risco ambiental. Nesse sentido, foi sugerido que, a partir de testes de toxicidade com algas, as substâncias químicas fossem classificadas quanto à sua toxicidade ambiental, auxiliando na avaliação do risco ambiental para os sistemas naturais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Com o processo de retenção de metais pelo fitoplâncton, que desempenha um importante papel na transferência de poluentes na rede trófica, já que tais organismos constituem o elo primário da cadeia alimentar e podem contaminar organismos que dele dependem direta ou indiretamente, estudos que abordem a contaminação por metais na cadeia trófica são de suma importância (RODGER, 2005; YU e WANG, 2004). Destacam-se, nesse sentido, os riscos inerentes à espécie humana. Alguns grandes "acidentes" ecológicos, por exemplo, decorreram de processos de bioacumulação, como a doença de itai-itai ocorrida no Japão, junto ao Rio Jintsu, onde centenas de pessoas foram envenenadas por cádmio após o consumo de peixes contaminados (KRENKEL, 1973).

Dentre os consumidores aquáticos, os organismos zooplânctônicos, particularmente os microcrustáceos, são bastante sensíveis às concentrações de metais (OLIVEIRA NETO, 2000). O exame das diversas interações que ocorrem entre organismos e seu ambiente revela que outros mecanismos podem também desempenhar um papel significativo no destino final dos agentes tóxicos e de seus efeitos nos ecossistemas aquáticos. A redução da toxicidade do metal devido à sua adsorção por partículas de alimento, e os efeitos tóxicos da ingestão desse alimento contaminado devem ser considerados em estudos que visam entender o impacto dos metais nos sistemas naturais (RODGER e ESPÍNDOLA, 2008b).

Rodger et al. (2008), por exemplo, desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a toxicidade crônica do cobre para *Ceriodaphnia silvestrii* através da exposição dietética usando *Pseudokirchneriella subcapitata* como fonte de alimento contaminado. A

toxicidade foi avaliada nas taxas de sobrevivência, crescimento, reprodução e taxa de alimentação do cladóceros. Os resultados mostraram um aumento do efeito tóxico sobre *C. silvestrii* com o aumento de cobre em células algais, sendo que na maior exposição ao cobre ($68 \times 10^{-15} \text{gCu.cel}$) todos os parâmetros do ciclo de vida foram significativamente afetados. A seguinte sequência de eventos foi observada da menor para a maior contaminação por cobre: reprodução, taxa de alimentação, o comprimento do corpo e, em última análise a sobrevivência foi afetada. Para os autores esses resultados podem levar a problemas ecológicos, como o efeito gradativo na densidade populacional e, conseqüentemente, a redução dos predadores e o crescimento descontrolado de algas.

Sofyan et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de comparar os efeitos da exposição do cádmio ao cladóceros de água doce *Ceriodaphnia dubia* sob três condições: contaminação do meio aquoso; alimento contaminado e pela combinação de meio e alimento contaminados. Os resultados mostraram que para os três cenários de exposição a sobrevivência, a taxa de alimentação e a reprodução de *C. dubia* foram afetadas. Na exposição combinada menores concentrações de Cd foram necessárias para alterar a reprodução do cladóceros, sendo que essa situação somente foi atingida nos outros tratamentos em concentrações maiores de exposição ao metal. Os autores ressaltam que em condições naturais esse cenário poderia causar efeitos negativos nas populações de *C. dubia*, como reprodução reduzida ou vulnerabilidade à predação.

Rodgher e Espíndola (2008b) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da variação da densidade da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* sobre a toxicidade crônica do cromo para o cladóceros *Ceriodaphnia dubia*, e observaram efeitos diferenciados quando este organismo foi exposto ao metal dissolvido em água e em alimento contaminado (células de *P. subcapitata*). Os autores verificaram que o tratamento com $34,04 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo em concentrações altas e baixas de alimentos afetou negativamente a sobrevivência de

C. dubia, no entanto, quando *C. dubia* foi exposta à alta densidade de alimento contaminado por cromo, o efeito tóxico foi menos acentuado do que os obtidos quando o organismo teste foi exposto ao cromo dissolvido em água com alta densidade de algas. Para os autores a água é uma importante via de exposição ao cromo para os cladóceros.

Muitos testes baseiam-se em protocolos que examinam apenas as respostas de organismos-teste expostos a elementos tóxicos dissolvidos e não avaliam o impacto destes através de uma rota alimentar. O alimento pode ser considerado tanto uma rota de contaminação de agentes tóxicos aos organismos como um retentor de sua toxicidade. Metais adsorvidos ao alimento podem ser liberados no trato digestivo de organismos filtradores e exercer efeitos tóxicos (RODGHER, 2005). Por outro lado, a toxicidade de metais poderá ser reduzida devido à capacidade das algas em complexar tais elementos tornando-os menos disponíveis no sistema aquático (LOMBARDI e VIEIRA, 2000).

As informações geradas através dos estudos sobre estas interações tróficas podem contribuir para a geração de procedimentos que visem o controle da contaminação, além de servir como subsídio para avaliação da amplitude dos riscos de uma contaminação ambiental ocasionada por metais com suas possíveis consequências para biota e para a saúde pública em geral (NOGUEIRA, 2007).

O metal que foi estudado no presente trabalho foi o cromo, um contaminante inorgânico comum no ambiente e que tem acarretado sérios problemas em ecossistemas de água doce e marinho (RODGHER, 2005). O cromo (Cr) é um metal cinza aço, com forma cristalina cúbica, sem odor e muito resistente à corrosão, sendo o sétimo metal mais comum na Terra. O metal não é encontrado livre na natureza e os estados de oxidação mais comuns do cromo são Cr (II), Cr (III) e Cr (VI), com as formas tri e hexavalente sendo as mais estáveis. O cromo está presente na composição de óxidos, sulfatos, cromatos, dicromatos, sais básicos e etc. (SILVA e PEDROZO, 2001; KOTÁS e STASICKA, 2000).

Em 1820, o dicromato de potássio já era usado como pigmento na indústria têxtil e, desde 1879, o minério cromita, o mais abundante composto de cromo encontrado na natureza, era rotineiramente utilizado na fabricação de refratários de altas temperaturas (MOORE e RAMAMOORTHY, 1947). De modo geral, a produção mundial de metais aumentou no início do século 20, tendo um impulso maior entre 1960 e 1990. Para o cromo, um rápido aumento da produção ocorreu entre 1975 e 1990, devido principalmente ao uso militar em grande escala. Em 2000 a produção mundial de Cr foi 367 vezes maior que em 1900, cuja produção mundial é da ordem de 107 mil toneladas por ano (CERVANTES et al. 2001). Segundo Han et al. (2002) a produção global acumulada de cromo foi estimada em 105,4 milhões de toneladas desde a era industrial ao ano 2000.

O cromo é encontrado naturalmente em rochas, animais, plantas, solo, poeiras e névoas vulcânicas (ATSDR, 2009). Porém, quase todo o cromo hexavalente existente no meio ambiente é proveniente das atividades humanas. Utiliza-se de 60% a 70% do volume total de cromo produzido na fabricação de ligas metálicas e estruturas de construção civil devido, principalmente, às suas propriedades mecânicas como dureza e resistência ao atrito e às propriedades químicas como resistência à corrosão e ao desgaste. Alguns tipos de aço inox são ligas de ferrocromo que têm como constituintes básicos o ferro, o cromo e o níquel. Por meio de processos químicos, a cromita é transformada em vários produtos essenciais, que são usados na galvanoplastia, na fabricação de produtos químicos, utilizados em curtumes como pigmentos, preservativos para madeira, fertilizantes, entre outros (SILVA e PEDROZO, 2001).

Em água de superfície, o cromo está presente na forma hexavalente e, uma pequena parte, na forma trivalente em complexos orgânicos (SILVA e PEDROZO, 2001). As propriedades tóxicas do cromo surgem a partir da sua capacidade de difundir livremente

através das membranas celulares e também por causa do seu forte potencial oxidativo que pode danificar enzimas e outras macromoléculas (NACORDA et al., 2010).

O cromo (VI) é um agente oxidante forte e na presença de matéria orgânica é reduzido a Cr (III), esta transformação é mais rápida em ambientes ácidos (McGRATH e SMITH, 1990). No entanto, altos níveis de Cr (VI) podem superar a capacidade de redução do meio ambiente e, assim, persistir como um poluente. Além disso, o Cr (III) pode ser também oxidado para Cr (VI) na presença de excesso de oxigênio, sendo transformados novamente para a forma mais tóxica (VAJPAYEE et al., 2000).

Para o homem e animais, o cromo trivalente é um nutriente essencial que desempenha papel importante no metabolismo de glicose, gorduras e proteínas. Acredita-se que a forma biologicamente ativa do cromo facilite a interação da insulina com seus receptores celulares, influenciando o metabolismo de glicose, proteínas e lipídeos (SILVA e PEDROZO, 2001).

A Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que entrou em vigor em 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e padrões de qualidade de água (BRASIL, 2005). A Resolução estabelece que enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas Classe 2. Ainda conforme a Resolução fica estabelecido a concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo como padrão para corpos d'água doce que pertencem à Classe 2. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) também considera a concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ como limite máximo admissível para corpos d'água (SINGHVI e CHHABRA, 2013).

No entanto, estudos desenvolvidos no Núcleo de Estudos em Ecologia Aquática (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, Universidade de São Paulo (CRHEA/USP), demonstraram efeitos significativos do cromo tanto em organismos fitoplanctônicos como zooplanctônicos em concentrações iguais ou abaixo das estabelecidas

pela Resolução CONAMA 357/2005 (MASUTTI, 2004; RODGHER, 2005; RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008b; LIMA, 2010).

Masutti (2004), por exemplo, ao utilizar a concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo em experimentos em mesocosmos observou inibição de 90% da produção primária nas unidades experimentais após a contaminação com o metal. Também foi observado redução na concentração de clorofila, mortalidade dos organismos planctônicos e bioacumulação em organismos de diferentes níveis tróficos.

Rodgher e Espíndola (2008b) observaram efeitos tóxicos significativos na reprodução e sobrevivência do cladocera *Ceriodaphnia dubia* exposto a concentrações que variam entre 8 e $34 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo e quando o organismo-teste foi alimentado com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* previamente exposta ao cromo. Nota-se que novamente as concentrações tóxicas estão abaixo da estabelecida pela Resolução CONAMA 357/2005.

Assim, diante dos potenciais riscos dos limites permissíveis de cromo estabelecidos pela legislação vigente para diferentes organismos aquáticos, conforme observados nos estudos anteriormente citados, bem como a necessidade de melhor entendimento das interações desses elementos no ambiente, o presente estudo foi desenvolvido com o intuito de verificar os efeitos da exposição ao cromo nas populações fitoplanctônica e zooplanctônica e nas interações tróficas desses organismos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para atender os objetivos propostos, procurou-se, de forma mais sistematizada, dividir a realização da pesquisa em três etapas sequenciais:

I) A **primeira etapa** tem como objetivo avaliar os efeitos da exposição ao cromo em organismos fitoplanctônicos. Para isso foram realizados ensaios utilizando duas espécies de algas como organismos-teste: *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. Nestes

ensaios foram avaliadas as respostas fisiológicas e estruturais desses organismos, como descrito nos itens 4.1 a 4.4.

As espécies *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* foram escolhidas por serem organismos comuns em ambientes aquáticos, sensíveis e padronizadas para ensaios ecotoxicológicos, além de fazerem parte da dieta de organismos zooplanctônicos, uma vez que as mesmas espécies algais foram utilizadas nos ensaios desenvolvidos na segunda etapa desta pesquisa, conforme descrito abaixo.

II) A **segunda etapa** foi a execução de ensaios com o objetivo de verificar os efeitos da exposição ao cromo em organismos zooplanctônicos quando expostos à diferentes vias de exposição e contaminação. Nesta etapa foram realizados ensaios ecotoxicológicos crônicos com os organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*, expostos ao cromo nas seguintes condições: meio aquoso contaminado com cromo, alimento contaminado com cromo e a combinação de ambas as situações (meio aquoso e alimento contaminados). Como alimento foram utilizadas as mesmas espécies algais descritas anteriormente, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. A metodologia para a execução desta etapa da pesquisa encontra-se descrita nos itens 4.5 a 4.7.

III) A fim de complementar as informações geradas nas etapas I e II, na **terceira etapa** desta pesquisa foram realizados ensaios com organismos zooplanctônicos com o objetivo de determinar o conteúdo bioquímico e a taxa de crescimento das populações quando expostas ao meio aquoso e alimento contaminados. Essa etapa foi independente, uma vez que o baixo volume e o número reduzido de animais utilizados na etapa II não permitiram que outras análises fossem feitas. Ressalta-se que a partir dos resultados gerados na etapa II, optou-se por nesta etapa avaliar somente o “pior cenário” e possivelmente o de melhor representação ambiental, ou seja, quando os organismos zooplanctônicos estão expostos simultaneamente ao meio aquoso contaminado e ao alimento contaminado.

A concentração de cromo utilizada nas 3 etapas desta pesquisa foi de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, concentração estabelecida pela Resolução CONAMA 357/2005, conforme discutido anteriormente. Para a contaminação da solução-teste dos ensaios desenvolvidos foi utilizada uma solução-estoque de 1000 mg.L^{-1} de cromo (solução padrão de Cr para absorção atômica, marca Merck®).

PARTE I: ENSAIO COM ORGANISMOS FITOPLANCTÔNICOS

4.1. Cultivo dos organismos-teste *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*

Os exemplares iniciais para o cultivo de *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* foram obtidos das culturas-estoque mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CHREA-USP).

As culturas unialgais de *P. subcapitata* e *C. vulgaris* foram mantidas em meio de cultivo L.C. Oligo, conforme metodologia descrita na ABNT (2011). A esterilização do meio de cultivo foi feita em autoclave a 121°C por 20 minutos e após a inoculação, que partiu de uma concentração em torno de $1 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$, as culturas foram mantidas com aeração constante, temperatura de $25^\circ\text{C} (\pm 2)$ e iluminação de 4000 lux.

4.2. Teste de toxicidade com *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*

Para avaliar os efeitos do cromo em organismos fitoplanctônicos foram realizados ensaios ecotoxicológicos crônicos com os organismos-teste *P. subcapitata* e *C. vulgaris*. Os testes consistiram na exposição de células de *P. subcapitata* e *C. vulgaris* na fase exponencial de crescimento, a uma densidade de 10^5 e 10^4 cel.mL^{-1} , respectivamente, aos tratamentos controle e contaminado com $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo, por um período de 96 horas. Essa

concentração do metal foi adicionada ao meio de cultura, sendo este meio o mesmo utilizado na manutenção das culturas-estoque (mantidas sem contaminação). Para a contaminação foi utilizado um padrão comercial de cromo (Merck®). O tratamento controle foi feito em condições normais de crescimento, portanto, sem adição do metal testado.

Os experimentos foram realizados em quadruplicatas usando frascos de policarbonato com 2000 mL de capacidade, contendo 1000 mL da solução-teste. Os frascos foram mantidos com aeração constante, temperatura de 25°C (± 2), iluminação de 4000 lux e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Toda a vidraria envolvida na manutenção da alga e nos testes de toxicidade foi previamente lavada de forma adequada e autoclavada a 121°C por 20 minutos, seguindo as recomendações da ABNT (2011). Os procedimentos de preparo das soluções-teste e inoculação foram feitos em condições assépticas em cabine de fluxo laminar.

4.3. Indicadores estruturais e fisiológicos das espécies algais

Com o objetivo de verificar os efeitos tóxicos da exposição ao cromo nas células algais, foram analisados aspectos estruturais (densidade celular e biomassa seca) e fisiológicos (pigmentos, conteúdo intracelular de proteína, carboidrato e concentração lipídica), conforme descritos nos itens 4.3.1 a 4.3.6.

4.3.1. Densidade celular

A densidade celular foi analisada por meio da contagem de células em microscópio óptico Zeiss, utilizando-se um hemocitômetro Improved Neubauer-Bright Line. Alíquotas de 2 mL foram obtidas dos testes de toxicidade após 96 horas de exposição. As amostras destinadas à contagem das células foram fixadas com solução de lugol acético (ABNT, 2011).

4.3.2. Biomassa seca

A biomassa seca das células algais foi determinada por meio da filtração de determinada quantidade de amostra em filtro Whatman do tipo GF/C, com porosidade de 0,45 μm , anteriormente incinerado e pesado. Os filtros permaneceram por 24 h a 60°C em uma estufa, e em seguida foram deixados em um dessecador para posterior pesagem. A biomassa seca foi determinada pela diferença do peso dos filtros. Para tanto, as amostras foram filtradas imediatamente ao encerramento dos testes de toxicidade, ou seja, após as 96 horas de exposição ao tratamento controle e contaminado com cromo (APHA, 1995).

4.3.3. Determinação de clorofila *a*, feofitina e carotenoides

No final dos testes de toxicidade, alíquotas das soluções-teste foram coletadas para análise da clorofila *a*, feofitina e carotenoides. As amostras de água foram filtradas em filtros de fibra de vidro Whatman do tipo GF/C, com porosidade de 0,45 μm , em seguida os filtros foram colocados em envelopes de papel e acondicionados em frascos escuros, mantidos a baixa temperatura até o momento da extração. A extração foi realizada segundo o método descrito em Nusch (1980), em sala escura, através de choque térmico, utilizando-se como solvente o etanol 80%, aquecido a 75°C. Após a extração, as amostras continuaram no escuro por um mínimo de 14 horas e em seguida foram feitas as leituras em espectrofotômetro, nos comprimentos de ondas de 665 nm e 750 nm.

Para a determinação da concentração de carotenoides, a mesma amostra foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas de 480 nm e 510 nm. Após este procedimento a amostra foi acidificada com HCl 0,4 N e novamente foi feita a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de ondas de 665 nm e 750 nm para a determinação da concentração de feofitina.

A concentração de clorofila *a* e feofitina foram calculadas segundo a equação descrita em Lorenzen (1967) e para carotenoides totais foi utilizado a equação de Parsons et al. (1984)

4.3.4. Conteúdo intracelular de carboidrato

A determinação do conteúdo intracelular de carboidrato das células algais foi feita com fenol e ácido sulfúrico de acordo com a técnica descrita em Liu et. al (1973), utilizando glicose como padrão. As amostras para a análise de carboidrato foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e o *pellet* mantido a -20°C até o momento da análise. As amostras foram ressuspensas com água destilada e foi adicionado solução de fenol e ácido sulfúrico concentrado, sendo posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm.

4.3.5. Conteúdo intracelular de proteína

A determinação do conteúdo intracelular de proteína das células algais foi feita de acordo com o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A extração do conteúdo proteico foi feita de acordo com Rausch (1981). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e o *pellet* mantido a -20°C até o momento da análise. O *pellet* foi ressuspensado com hidróxido de sódio e mantido em estufa a 80°C por 40 minutos. Após este período as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e então adicionado o reagente de Bradford (0,01% de Comassie blue, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido fosfórico). A leitura da amostra foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

4.3.6. Lipídeo

A extração de lipídeos foi realizada de acordo com a Parrish (1999), utilizando clorofórmio e metanol (2:1) como o solvente. As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro (Whatman do tipo GF/C) previamente incinerados (400°C por 12 horas). A todas as amostras foi adicionado padrão interno (Hexadecanona da Sigma-Aldrich) antes da extração. Para a extração foi utilizado ultrassom de ponteira e 2 ciclos de 5 minutos cada. As amostras foram concentradas em evaporador rotativo e gás nitrogênio ultrapuro, aplicadas em colunas cromatográficas revestidas com sílica-C18 (Chromarods - SIII) e analisadas através de cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama, utilizando Iatroscan TLC-FID MK6S. Para a identificação dos picos utilizou-se curvas de calibração obtidas para nove padrões lipídicos Sigma-Aldrich (hidrocarboneto alifático, éster de cera, cetona, triglicerídeo, ácidos graxos livres, álcool alifático livre, esterol, lipídeos polares móveis em acetona e fosfolipídeos).

As condições analíticas para o Iatrscan foram: fluxo de hidrogênio $173 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, fluxo de ar de $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e velocidade de leitura de $4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. A concentração total de lipídeos em cada amostra foi assumida ser a soma das concentrações das diferentes classes lipídicas. Todos os materiais metálicos e de vidro que entraram em contato com as amostras foram previamente incinerados em mufla a 400°C por 8 horas. Os materiais de teflon e vidro foram enxaguados com metanol e clorofórmio antes do uso para reduzir a contaminação. Todos os reagentes utilizados para a análise bioquímica foram de grau HPLC.

4.4. Análise de metais

No início e no final dos testes de toxicidade com as algas, amostras das soluções-teste foram reservadas para determinação da concentração de cromo nas frações dissolvida e particulada. Foi considerado metal dissolvido a fração que passou direto em membrana de

acetato de celulose de 0,2 µm de porosidade e metal particulado a fração que ficou retida no filtro (APHA, 1995).

Para a análise de metal dissolvido, as amostras foram filtradas e então acidificadas para preservação em ácido nítrico (HNO₃). Para a determinação da fração particulada, após a filtragem os filtros foram conservados secos e submetidos a digestão ácida com HNO₃ concentrado. A concentração de metal medida nas células algais (que ficaram retidas no filtro) foi considerada como sendo a concentração total existente nas células (presente na porção intracelular e extracelular). A cada digestão de amostras foram digeridos 2 filtros para a determinação do branco analítico, conforme adaptado de Van Loon (1985).

A concentração de cromo foi medida utilizando forno de grafite em espectrofotômetro de absorção atômica. O limite de detecção foi de 0,001 µg e o limite de quantificação foi de 0,002 µg.

PARTE II: ENSAIOS COM ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS (ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS POPULAÇÕES)

4.5. Cultivo dos organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Os exemplares iniciais para o cultivo de *C. dubia* e *C. silvestrii* foram obtidos das culturas-estoque mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA-USP). O meio artificial usado para o cultivo dos animais foi água reconstituída (ABNT, 2010). Os animais foram mantidos em câmara germinativa com temperatura constante de 23°C (± 2), fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 1000 lux.

Durante o cultivo, foi utilizada como alimento para *C. dubia* e *C. silvestrii* a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, em fase exponencial de crescimento, na concentração de 10⁵

cel.mL⁻¹ por organismo. Outro alimento administrado foi o composto preparado com fermento biológico seco tipo Fleischmann® e ração para peixe (Vitormônio®). O alimento composto foi preparado misturando-se 0,25 g de fermento biológico diluído em 50 mL de água destilada em 25 mL do preparado de ração para peixe e levedura, sendo utilizado diariamente 1mL.L⁻¹ deste preparado junto com a suspensão algal.

4.6. Efeitos da exposição ao metal no meio aquoso, na dieta e nas condições combinadas (meio aquoso e alimento contaminados) para *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Como já descrito anteriormente, este experimento foi realizado a fim de comparar a resposta de *C. dubia* e *C. silvestrii* quando expostos ao cromo nas seguintes condições: meio aquoso contaminado com a solução metálica, alimento contaminado com metal e a combinação de ambas as situações (meio aquoso e alimento contaminados). Cada um destes tratamentos está descrito abaixo, nos itens 4.6.1 a 4.6.3. A Figura 1 representa o delineamento experimental desta etapa da pesquisa.

A resposta dos organismos zooplanctônicos a estes tratamentos foi avaliada pela sobrevivência, reprodução e taxa de alimentação. As taxas de consumo de algas pelo zooplâncton foram determinadas subtraindo o número de algas no início com o número de algas no final do período de 72h, onde ocorreram as trocas das soluções (meio de ensaio) e de alimento. As amostras foram fixadas com lugol acético e a contagem celular foi realizada em hemocítmetro Neubauer (COUGWLAN, 1969). Para cada um dos organismos testados (*C. dubia* e *C. silvestrii*) e para cada um dos tratamentos foram utilizados 30 réplicas.

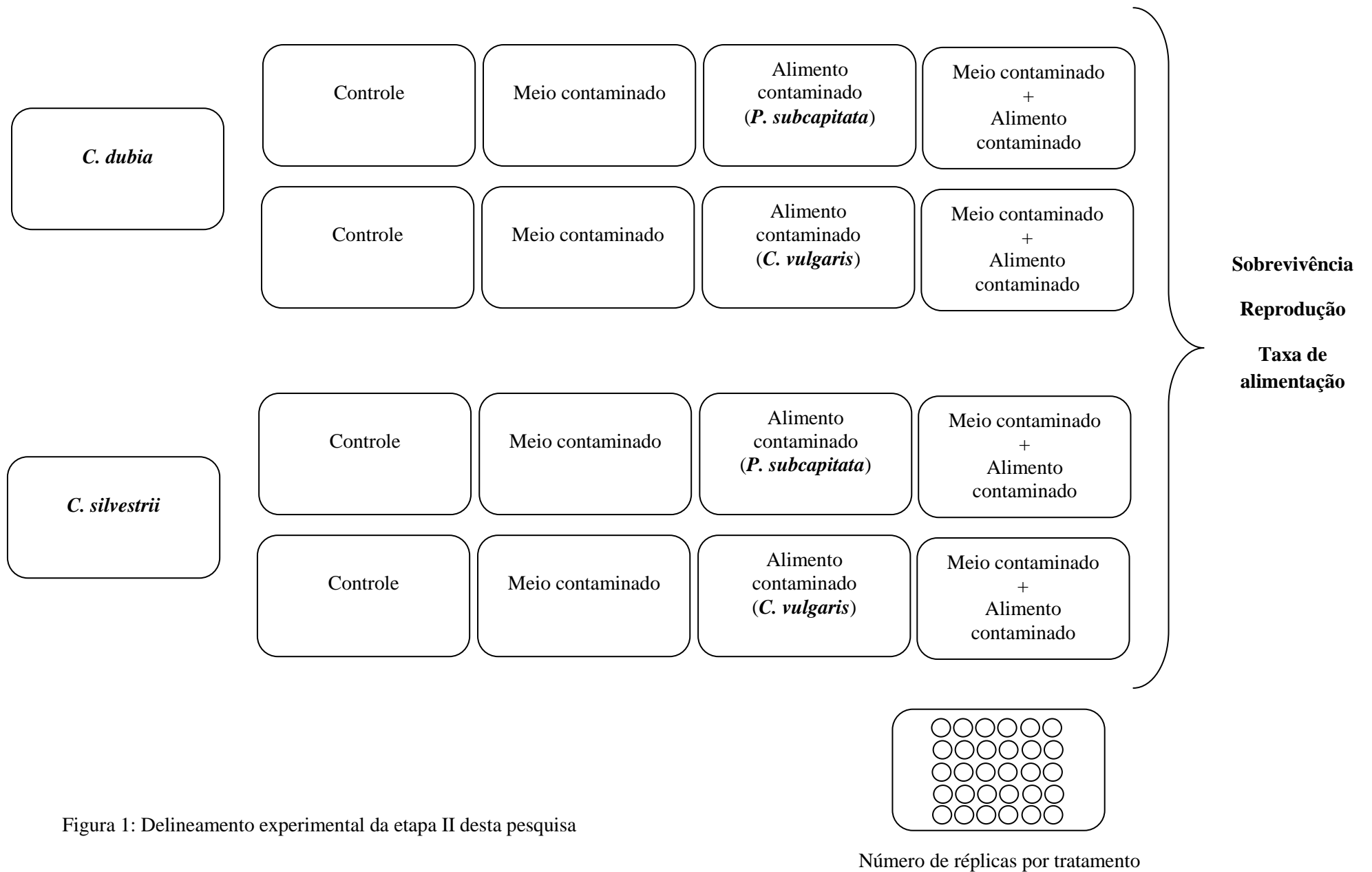


Figura 1: Delineamento experimental da etapa II desta pesquisa

Número de réplicas por tratamento

4.6.1. Exposição de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* à água contaminada

Para avaliar os efeitos em organismos zooplanctônicos quando exposto a água contaminada com cromo foram realizados ensaios ecotoxicológicos crônicos. Nestes ensaios, o meio de cultivo foi contaminado com 0,05 mg.L⁻¹. Para a contaminação foi utilizado um padrão comercial de cromo (Merck®). Nos testes crônicos um neonato (entre 6 a 24 horas de idade) foi colocado em copo plástico atóxico, contendo 15 mL do meio de cultivo contaminado. A cada três dias, foram efetuadas trocas de água. A duração do teste foi de sete a dez dias, período necessário para a produção da 3ª ninhada, sendo registrado o número de neonatos produzidos ao longo do experimento. Os dados de longevidade foram obtidos acompanhando-se a mortalidade dos organismos até o final do experimento. Alguns parâmetros como pH (potenciômetro B374), oxigênio (medidor de OD YSI), dureza (Hach DR/2000) e condutividade (condutivímetro 145A) da água testada foram analisadas no início e final dos testes, que foram realizados em temperatura de 23°C (± 2) e fotoperíodo de 12 horas (ABNT, 2010). No tratamento controle os organismos foram expostos à água de cultivo sem contaminação com cromo. Neste experimento os organismos zooplanctônicos foram alimentados com células de algas (10⁵ cel.mL⁻¹ por organismo) e com o composto preparado com fermento biológico seco tipo Fleischmann® e ração para peixe (Vitormônio®). Foram utilizadas duas espécies de algas como alimento, sendo estas espécies as mesmas utilizadas na fase I desta pesquisa, ou seja, as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. Estes ensaios foram realizados separadamente, assim cada espécie de zooplâncton foi alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* separadamente.

4.6.2. Exposição de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* ao alimento contaminado

Neste experimento os organismos zooplanctônicos foram mantidos em meio de cultivo sem contaminação, porém foram alimentados com células de algas previamente expostas ao cromo.

Foram utilizadas duas espécies de algas como alimento, sendo estas espécies as mesmas utilizadas na fase I desta pesquisa, ou seja, as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. O cultivo destas algas foi feito em meio L.C Oligo (ABNT, 2011) contaminado com $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo. Após 96 horas de cultivo algal, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante formado foi desprezado. O material precipitado foi ressuspenso em água reconstituída. Após este procedimento foram retiradas alíquotas para análise da concentração de cromo retido nas células algais, conforme metodologia descrita no item 4.7.

As suspensões algais, utilizadas como alimento, foram preparadas após contagem do número de células em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico. Também foi administrado como alimento o composto preparado com fermento biológico seco tipo Fleischmann® e ração para peixe (Vitormônio®).

Para verificar os efeitos do alimento contaminado com cromo nos organismos zooplanctônicos *C. dubia* e *C. silvestrii* foram realizados ensaios ecotoxicológicos crônicos (ABNT, 2010). Nos testes, os indivíduos recém-nascidos de *C. dubia* e *C. silvestrii* foram expostos à água reconstituída e alimentados com células de algas contaminadas. As condições de ensaio para este teste foram as mesmas descritas no item anterior. Nos experimentos controles, as culturas foram mantidas em condições normais de cultivo e, portanto, com adição de alimento sem exposição prévia ao metal.

Estes ensaios foram realizados separadamente, ou seja, cada espécie de zooplâncton foi alimentada com *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* separadamente.

4.6.3 Exposição combinada (água e alimento contaminados)

No experimento de exposição combinada foi feita a combinação das duas exposições descritas anteriormente (item 4.6.1 e 4.6.2), ou seja, organismos zooplanctônicos foram expostos a água contaminada com cromo na concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ e foram alimentados com as diferentes espécies de algas expostas previamente a $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo. Nos experimentos controles, as culturas foram mantidas em condições normais de cultivo e com adição de alimento sem exposição prévia ao metal. As condições dos ensaios ecotoxicológicos, conforme já descrito, foram baseadas na ABNT (2010).

4.7. Análise de metais

No final dos experimentos (exposição à água contaminada; alimento contaminado; água e alimento contaminados) os cladóceros foram coletados e deixados por aproximadamente 12 horas em água de cultivo, a fim de que fossem eliminadas as células algais que não foram assimiladas.

Decorrido esse tempo, os cladóceros foram novamente colocados em água de cultivo e coletados por meio de filtração com auxílio de um filtro de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade. Este procedimento foi feito para avaliar a concentração de metais retidos nos organismos zooplanctônicos.

Amostras das soluções-teste, no final desses experimentos, foram reservadas para determinação dos metais dissolvido e particulado. Metais dissolvidos foram aqueles, de uma amostra não acidificada, que passaram direto em membrana de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade e os metais particulados foram considerados aqueles que ficaram retidos no filtro (APHA, 1995).

A análise dos metais nas células de algas (que foi oferecida com alimento) foi realizada sem lavagem com EDTA, a fim de não remover os metais adsorvidos na superfície da célula. A concentração medida de metal nas células das algas foi tomada como a quantidade total de metal acumulada pelas células (ou seja, metal ligado externamente e internamente), conforme já descrito no item 4.4.

Amostras das soluções-teste, no início dos experimentos, também foram analisadas para que a concentração nominal do cromo utilizado para contaminar as soluções-teste fosse quantificada.

Assim, em cada experimento (e em cada tratamento) foram coletadas 6 amostras para quantificação de cromo: amostra da solução-teste no início do experimento; após 72 horas de experimento (período entre o início do experimento e a 1ª troca de meio de cultivo e alimento); amostra da solução-teste da 1ª troca; após 72 horas da realização da 1ª troca; amostra da solução-teste da 2ª troca; e na finalização do experimento.

A concentração de cromo foi medida utilizando forno de grafite em espectrofotômetro de absorção atômica. O limite de detecção foi de 0,001 μ g e o limite de quantificação de 0,002 μ g.

PARTE III: ENSAIOS COM ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS (ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS POPULAÇÕES)

Para uma melhor compreensão dos possíveis efeitos tóxicos do cromo nas populações e na interação trófica de organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos, foram realizados experimentos para avaliar o conteúdo fisiológico (proteína, carboidrato e lipídeos) e taxa de crescimento populacional dos organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostos à água contaminada e alimento contaminado. A realização deste experimento foi independente da parte II desta pesquisa, pois o baixo volume e o número reduzido de animais

utilizados nos testes ecotoxicológicos descritos anteriormente, não permitiram que outras análises fossem feitas.

A princípio, nesta etapa seriam utilizadas como alimento para os organismos zooplanctônicos as duas espécies de algas (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*) utilizadas nas etapas anteriores deste estudo. Porém, a partir dos resultados obtidos na etapa II, optou-se por utilizar apenas a alga *P. subcapitata*.

Assim, nesta etapa, os organismos *C. dubia* e *C. silvestrii* foram cultivadas em água reconstituída (ABNT, 2010) em erlenmeyer de 2000 mL, em condições laboratoriais semelhantes às descritas no item 4.5.

Para os ensaios, 4 fêmeas com aproximadamente 96 horas de idade foram colocadas em erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de meio de cultivo. A cada três dias, foram efetuadas trocas do meio de cultivo. A duração do teste foi de nove dias, período necessário para a produção da 3ª ninhada. Os neonatos nascidos durante o experimento foram mantidos nos recipientes-teste, e a cada troca o volume de meio de cultivo foi aumentado de acordo com o aumento da população zooplanctônica. Assim, o ensaio iniciado com 150 mL de meio de cultivo, foi aumentado para 300 mL na primeira troca e para 500 mL na segunda troca. No final dos ensaios, os organismos zooplanctônicos foram coletados com a ajuda de uma malha de plâncton, contados e armazenados para as análises fisiológicas. Alguns parâmetros como pH (potenciômetro B374), oxigênio (medidor de OD YSI), dureza (Hach DR/2000) e condutividade (condutivímetro 145A) da água testada foram monitorados no início e final dos testes, que foram realizados em temperatura de 23°C (± 2) e fotoperíodo de 12 horas.

Nesta etapa apenas dois tratamentos foram testados: um tratamento controle e outro onde o meio aquoso e o alimento estavam contaminados com cromo. No tratamento contaminado foi adicionado cromo no meio de cultivo na concentração de 0,05 mg.L⁻¹ e os organismos zooplanctônicos foram alimentados com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

previamente exposta a uma concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo. No tratamento controle a água de cultivo e o alimento estavam em condições normais de cultivo.

Ressalta-se que cada experimento foi feito separadamente com as espécies *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Para cada tratamento de cada um destes ensaios foram utilizadas 12 réplicas, sendo 3 réplicas usadas na análise de proteínas, 3 réplicas para a análise de carboidratos, 3 para análise de lipídeos e 3 para o cálculo do crescimento populacional. Estas análises foram realizadas no final dos ensaios, conforme a metodologia descrita nos itens 4.8.1 a 4.8.4. A Figura 2 representa o delineamento experimental desta etapa da pesquisa.

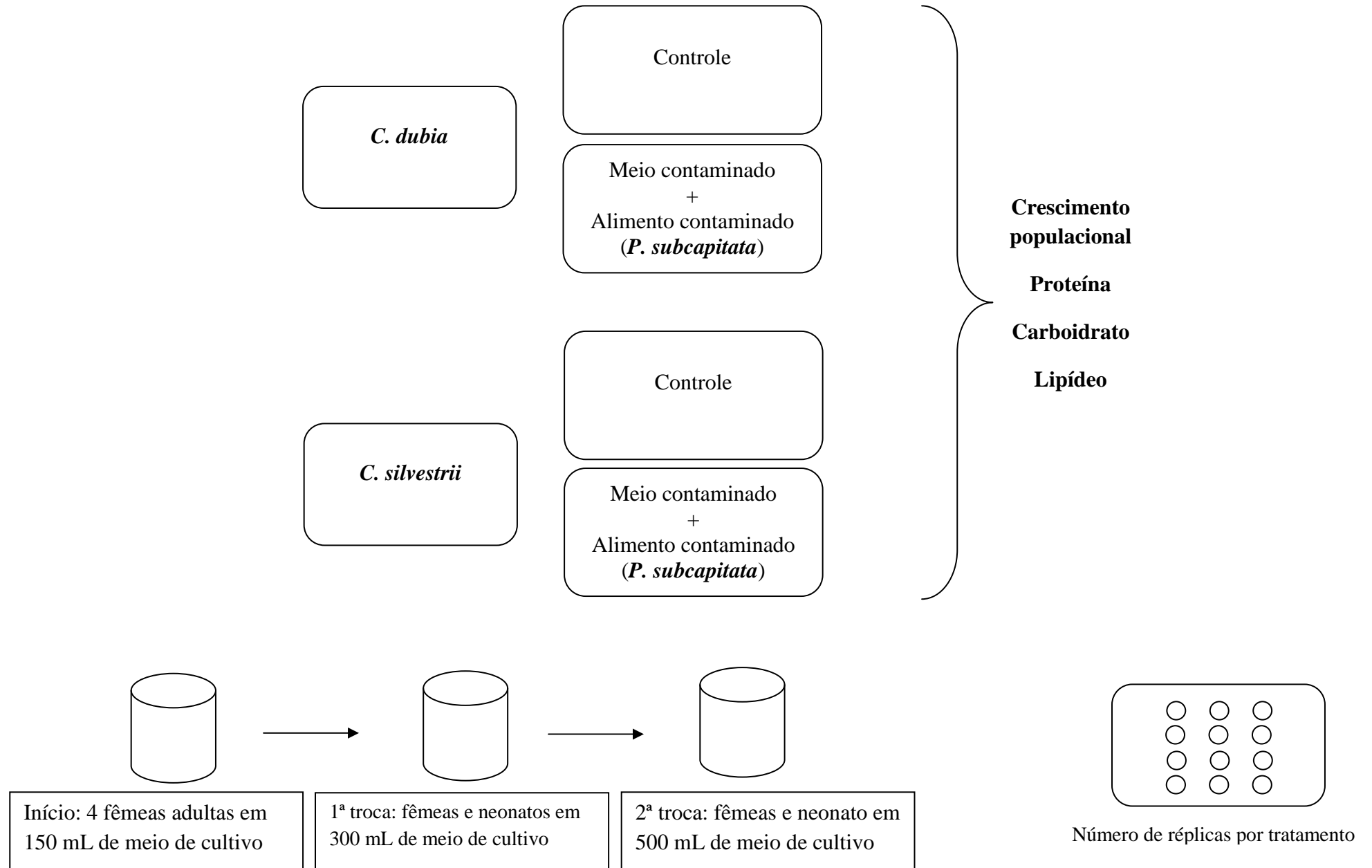


Figura 2: Delineamento experimental da etapa III desta pesquisa

4.8.1 Taxa intrínseca de aumento populacional de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*

A taxa intrínseca de aumento ou coeficiente instantâneo de crescimento populacional constitui um índice que indica a capacidade inerente de crescimento de uma população. Este parâmetro propicia previsões sobre o tamanho de uma população em determinado tempo, conhecendo-se o tamanho inicial da população e o valor r . Para o cálculo da taxa intrínseca foi empregada a fórmula descrita em Birch (1948):

$$r = (\ln N_t - \ln N_0) / t$$

Onde: r = taxa intrínseca

N_t = número de indivíduos no tempo determinado

N_0 = número inicial de indivíduos

t = duração do experimento

4.8.2. Determinação do conteúdo total de proteínas

A determinação do conteúdo total de proteínas dos organismos zooplanctônicos *C. dubia* e *C. silvestrii* foi feita de acordo com o protocolo descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A extração do conteúdo proteico foi feito de acordo com Rausch (1981). Os organismos coletados no final dos ensaios foram mantidos a -20°C até o momento da análise. A digestão foi feita com hidróxido de sódio em estufa a 80°C por 40 minutos. Após este período as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e então adicionado o reagente de Bradford (0,01% de Comassie blue, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido fosfórico). A leitura da amostra foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

4.8.3. Determinação do conteúdo total de carboidratos

A determinação do conteúdo total de carboidratos dos organismos zooplanctônicos *C. dubia* e *C. silvestrii* foi feita com fenol e ácido sulfúrico de acordo com a técnica descrita em Liu et. al (1973), utilizando glicose como padrão. No final dos ensaios, os organismos zooplanctônicos coletados foram mantidos a -20°C até o momento da análise. As amostras foram ressuspensas com água destilada e foi então adicionado solução de fenol e ácido sulfúrico concentrado, sendo posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm.

4.8.4. Lipídeo

A extração de lipídeos foi realizada de acordo com a Parrish (1999), utilizando clorofórmio e metanol (2:1) como o solvente. Os organismos coletados no final dos ensaios foram filtrados em filtros de fibra de vidro (Whatman do tipo GF/C) previamente incinerados (400°C por 12 horas). Para a extração foi utilizado ultrassom de ponteira e 2 ciclos de 5 minutos cada. As amostras foram concentradas em evaporador rotativo e gás nitrogênio ultrapuro, aplicadas em colunas cromatográficas revestidas com sílica-C18 (Chromarods - SIII) e analisadas através de cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama, utilizando Iatroscan TLC-FID MK6S. Para a identificação dos picos utilizou-se curvas de calibração obtidas para nove padrões lipídicos Sigma-Aldrich (hidrocarboneto alifático, éster de cera, cetona, triglicerídeo, ácidos graxos livres, álcool alifático livre, esterol, lipídeos polares móveis em acetona e fosfolipídeos).

As condições analíticas para o Iatroscan foram: fluxo de hidrogênio $173 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, fluxo de ar de $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e velocidade de leitura de $4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. A concentração total de lipídeos em cada amostra foi assumida ser a soma das concentrações das diferentes classes lipídicas. Todos os materiais metálicos e de vidro que entraram em contato com as amostras foram

previamente incinerados em mufla a 400°C por 8 horas. Os materiais de teflon e vidro foram enxaguados com metanol e clorofórmio antes do uso para reduzir a contaminação. Todos os reagentes utilizados para a análise bioquímica foram de grau HPLC.

4.9. Análise de metais

Como nas etapas anteriores já haviam sido feitas as análises de metais nas frações dissolvida (meio de cultivo tanto das espécies fitoplanctônicas como zooplanctônicas) e fração particulada (presente nas células algais e no zooplâncton), nesta etapa do trabalho amostras das soluções-teste foram analisadas apenas no início dos ensaios para a quantificação da concentração nominal de cromo das soluções. A metodologia foi a mesma descrita nas etapas anteriores, nos itens 4.4 e 4.7.

4.10. Destino e tratamento dos resíduos gerados

Todos os resíduos tóxicos produzidos durante a realização deste trabalho foram recolhidos e acondicionados em recipientes apropriados, etiquetados e estocados em local ventilado até serem encaminhados ao laboratório de resíduos da Escola de Engenharia de São Carlos e unidade de gestão de resíduos da Universidade Federal de São Carlos, onde recebem destino apropriado.

4.11. Análise dos dados

Os resultados dos ensaios com os organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os resultados obtidos no tratamento controle e contaminado com como, utilizou-se o teste t. Esse procedimento foi adotado para os dados gerados nas etapas I e III desta pesquisa. Para a etapa II, os dados foram analisados pelo teste de comparações

múltiplas de Tukey para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa computacional Toxstat (version 3.3).

5. RESULTADOS

No sentido de facilitar a análise dos resultados que foram obtidos na presente pesquisa, procurou-se apresentá-los na mesma seqüência dos materiais e métodos, dividindo-os em 3 etapas: efeitos da exposição ao cromo em organismos fitoplanctônicos (Etapa I); efeitos da exposição ao cromo em organismos zooplanctônicos: aspectos estruturais das populações (Etapa II) e efeitos da exposição ao cromo em organismos zooplanctônicos: aspectos fisiológicos das populações (Etapa III).

ETAPA I: Ensaio com organismos fitoplanctônicos

Densidade celular, biomassa seca e conteúdo bioquímico de *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*

Na Figura 3 e Tabelas 2 e 3 estão representados a densidade celular das algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* após 96 horas de exposição aos tratamentos controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr). Foi possível observar um decréscimo na densidade celular de ambas as espécies no tratamento com cromo, havendo diferença estatisticamente significativa entre controle e tratamento. Para *P. subcapitata* a densidade celular média no controle foi de 3,9 x 10⁶ cels.mL⁻¹ e no tratamento com cromo foi de 2,4 x 10⁶ cels.mL⁻¹, assim a porcentagem de inibição do cromo na concentração testada sobre o crescimento desta alga foi de 38%. Para *C. vulgaris* a densidade média foi 5,2 x 10⁵ cels.mL⁻¹ no controle e 3,3 x 10⁵ cels.mL⁻¹ no tratamento com cromo, demonstrando que a presença do metal provocou 37% de inibição no crescimento celular desta alga.

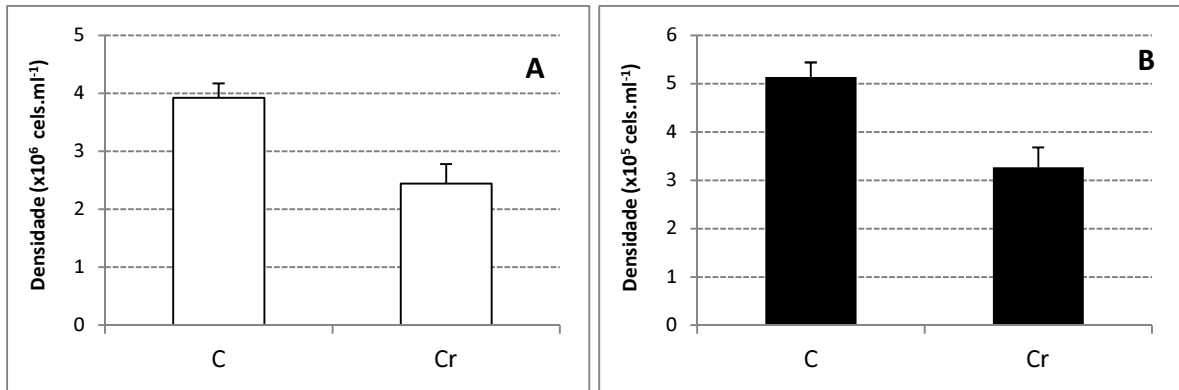


Figura 3: Densidade celular (cels.mL⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

Os efeitos do cromo sobre a biomassa seca de *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* estão apresentados na Figura 4 e Tabelas 2 e 3. No tratamento com cromo verificou-se uma diminuição significativa da biomassa seca da alga *P. subcapitata*, uma vez que no controle a biomassa foi 20 pg.cel⁻¹ e na presença do cromo foi de 14 pg.cel⁻¹. Para *C. vulgaris* não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, pois no controle a biomassa foi 51 pg.cel⁻¹ e no tratamento com cromo foi 48 pg.cel⁻¹.

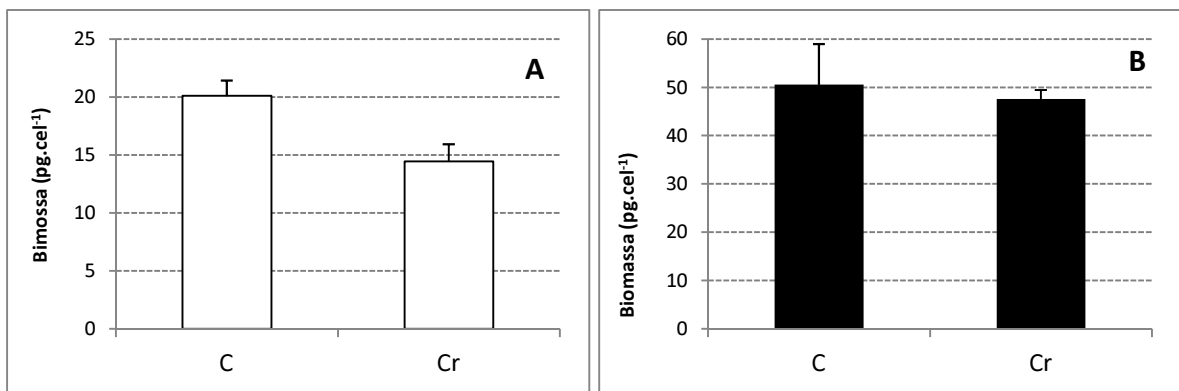


Figura 4: Biomassa seca (pg.cel⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

Nas Figuras 5, 6 e 7 e Tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados obtidos para concentração de clorofila *a*, feofitina e carotenoides. No tratamento com cromo verificou-se

diminuição mais acentuada na concentração de clorofila *a* para a alga *P. subcapitata*, uma vez que no tratamento controle obteve-se 0,10 pg.cel⁻¹ de clorofila e no tratamento com cromo a concentração foi 0,04 pg.cel⁻¹. A porcentagem de inibição que o metal causou na produção de clorofila para esta alga foi de 64%. Para *C. vulgaris*, não foi verificada diferença entre os tratamentos, cujos valores foram 0,19 pg.cel⁻¹ no controle e 0,18 pg.cel⁻¹ no tratamento com cromo.

Com relação à concentração de feofitina, ambas as espécies de algas apresentam um aumento significativo na concentração deste pigmento no tratamento com cromo. Para *P. subcapitata* os valores obtidos foram 0,02 pg.cel⁻¹ no controle e 0,08 pg.cel⁻¹ na presença de cromo; *C. vulgaris* apresentou 0,04 pg.cel⁻¹ no controle e 0,07 pg.cel⁻¹ no tratamento com cromo. A presença do metal provocou um aumento de 283% na concentração de feofitina em *P. subcapitata* e de 83% em *C. vulgaris* (Figura 6 e Tabelas 2 e 3).

A concentração de carotenoides diferiu entre os tratamentos e as espécies de algas. Para *P. subcapitata* foi observada uma diminuição de carotenoides no tratamento com cromo (0,06 pg.cel⁻¹ em C e 0,02 pg.cel⁻¹ em Cr, uma redução de 66%), enquanto para *C. vulgaris* observou-se um aumento na concentração deste pigmento no tratamento com cromo (0,07 pg.cel⁻¹ em C e 0,12 pg.cel⁻¹ em Cr, um aumento de 64%) (Figura 7 e Tabelas 2 e 3).

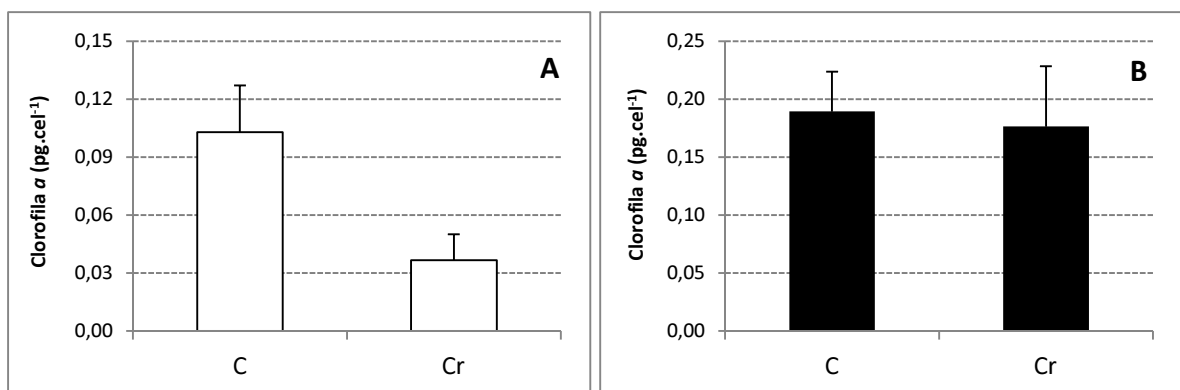


Figura 5: Concentração de clorofila *a* (pg.cel⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

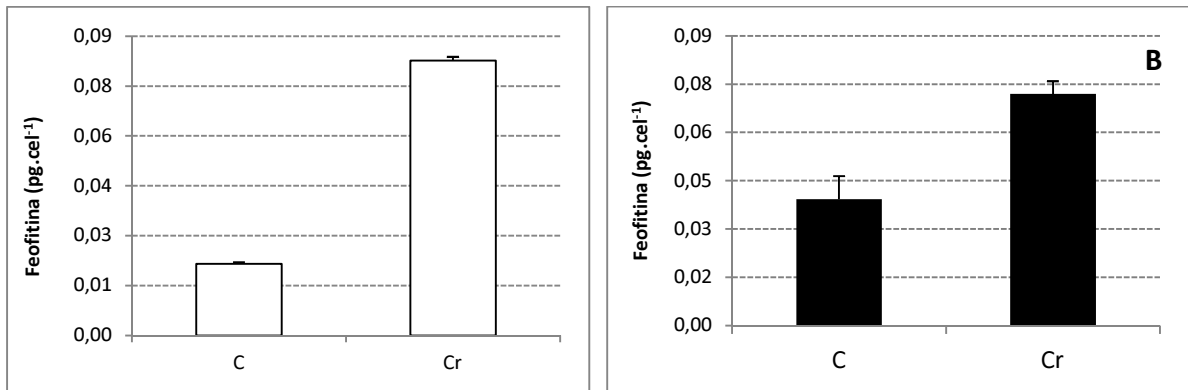


Figura 6: Concentração de feofitina (pg.cel⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

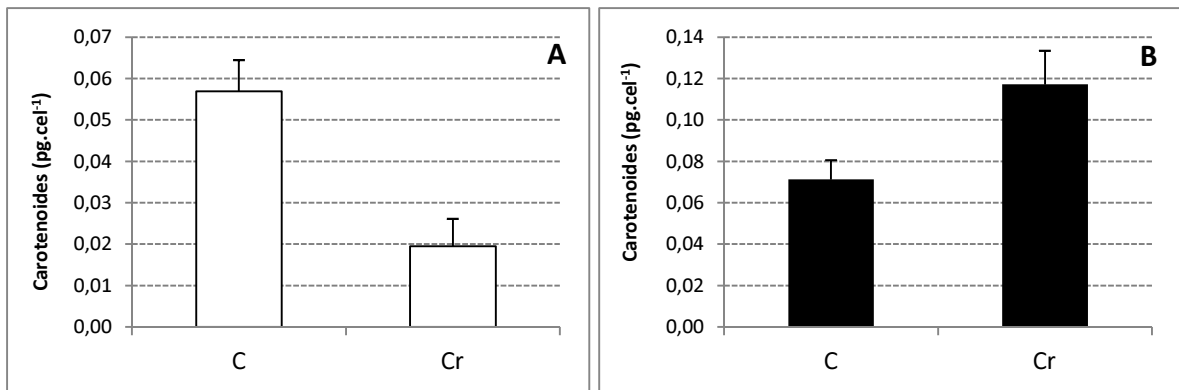


Figura 7: Concentração de carotenoides (pg.cel⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

O conteúdo intracelular de proteínas e carboidratos das algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* após o tratamento com cromo estão apresentados nas Figuras 8 e 9 e Tabelas 2 e 3. A exposição ao cromo causou um aumento significativo na concentração de proteínas para ambas as espécies. A alga *P. subcapitata* apresentou 1,8 pg.cel⁻¹ de proteínas totais no tratamento controle e 3,2 pg.cel⁻¹ no tratamento com cromo; *C. vulgaris* apresentou 9,2 pg.cel⁻¹ de proteínas no tratamento controle e 20,5 pg.cel⁻¹ na presença de cromo.

Esta tendência de aumento também foi observada para carboidratos totais, uma vez que *P. subcapitata* apresentou 3,7 pg.cel⁻¹ no controle e 4,4 pg.cel⁻¹ no tratamento com cromo e *C. vulgaris* apresentou 15,5 pg.cel⁻¹ no controle e 25,5 pg.cel⁻¹ no tratamento com cromo.

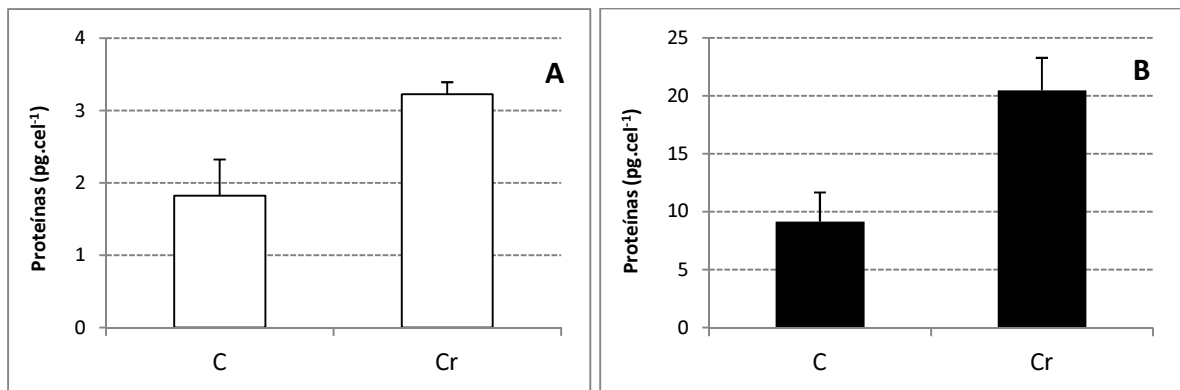


Figura 8: Conteúdo intracelular de proteínas (pg.cel⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

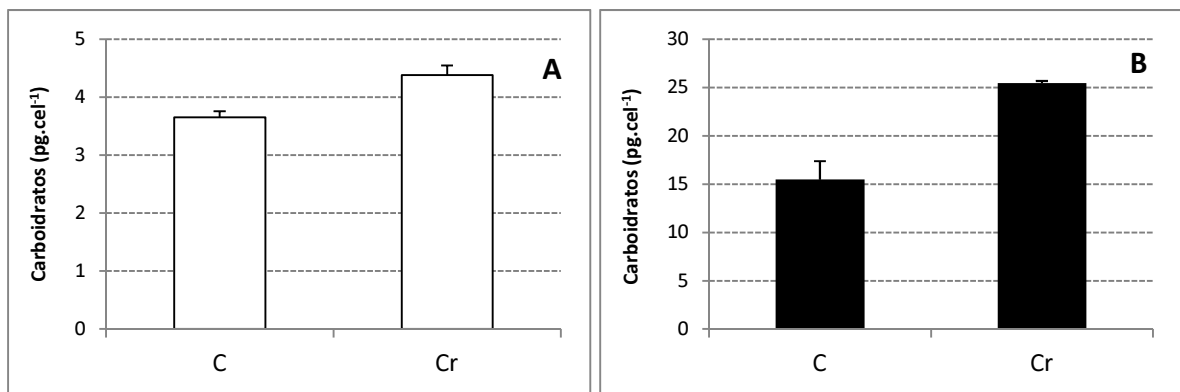


Figura 9: Conteúdo intracelular de carboidratos (pg.cel⁻¹) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo (Cr).

Na Figura 10 e Tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados obtidos para lipídeos totais das algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. Foi possível observar que o tratamento com cromo provocou um aumento no conteúdo de lipídeos totais em ambas as espécies. Para *P. subcapitata* este aumento foi de aproximadamente 95%, uma vez que no tratamento controle a concentração de lipídeos foi de 0,02 pg.cel⁻¹ e no tratamento com cromo

foi de $0,04 \text{ pg.cel}^{-1}$. *C. vulgaris* apresentou $0,07 \text{ pg.cel}^{-1}$ no controle e $0,17 \text{ pg.cel}^{-1}$ na presença de cromo, um aumento próximo a 150 vezes.

Com relação à composição lipídica, as classes que mais diferiram entre os tratamentos controle e contaminado com cromo para a alga *P. subcapitata* foram os lipídeos polares móveis em acetona (que representou 39% do total lipídico em C e 33% em Cr) e fosfolipídeos (7% em C e 14% em Cr). Para *C. vulgaris*, as classes que mais diferiram entre os tratamentos foram ácidos graxos livres (3% em C e 8% em Cr), álcool alifático livre (8% em C e 13% em Cr) e lipídeos polares móveis em acetona (15% em C e 8% em Cr), conforme descrito na Tabela 1.

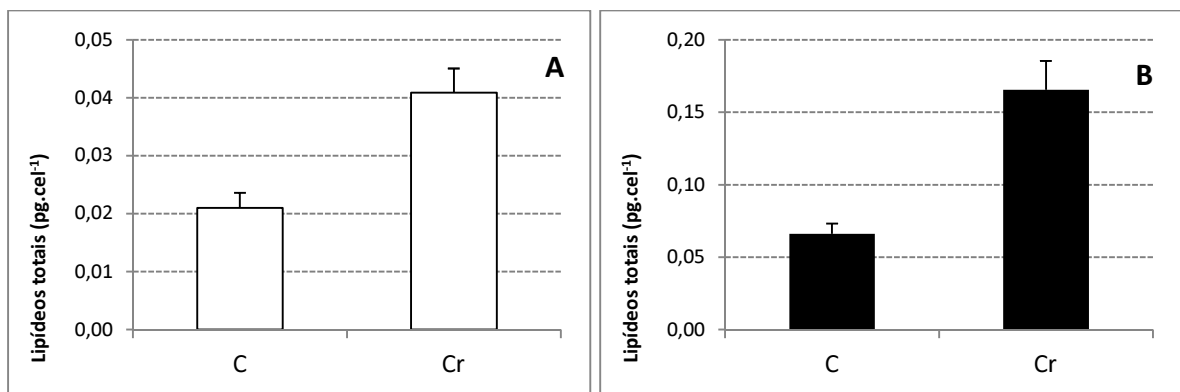


Figura 10: Lipídeos totais (pg.cel^{-1}) de *Pseudokirchneriella subcapitata* (A) e *Chlorella vulgaris* (B) após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo (Cr).

Tabela 1: Composição lipídica (%) de *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* após 96 horas de exposição ao tratamento controle (C) e contaminado com $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo (Cr).

Classes lipídicas (%)	<i>P. subcapitata</i>		<i>C. vulgaris</i>	
	C	Cr	C	Cr
Hidrocarboneto (HC)	4	4	10	9
Éster de cera (WE)	4	4	10	7
Triglicerídeo (TG)	24	21	3	3
Ácidos graxos livres (FFA)	5	4	3	8
Álcool alifático livre (ALC)	9	8	8	13
Esterol (ST)	7	11	13	11
Lipídeos polares móveis em acetona (AMPL)	39	33	15	8
Fosfolipídeos (PL)	7	14	38	41

Tabela 2: Valores médios de densidade celular, biomassa seca e composição bioquímica de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96 horas de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; p<0,05)

Parâmetros	Controle	Cromo
Densidade celular (x10 ⁶ cels.mL ⁻¹)	3,9 ^a	2,4 ^b
Biomassa seca (pg.cel ⁻¹)	20 ^a	14 ^b
Clorofila a (pg.cel ⁻¹)	0,10 ^a	0,04 ^b
Feofitina (pg.cel ⁻¹)	0,02 ^a	0,08 ^b
Carotenoides (pg.cel ⁻¹)	0,06 ^a	0,02 ^b
Proteínas (pg.cel ⁻¹)	1,8 ^a	3,2 ^b
Carboidratos (pg.cel ⁻¹)	3,7 ^a	4,4 ^b
Lipídeos totais (pg.cel ⁻¹)	0,02 ^a	0,04 ^b

Tabela 3: Valores médios de densidade celular, biomassa seca e composição bioquímica de *Chlorella vulgaris* após 96 horas de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; p<0,05)

Parâmetros	Controle	Cromo
Densidade celular (x10 ⁵ cels.mL ⁻¹)	5,1 ^a	3,3 ^b
Biomassa seca (pg.cel ⁻¹)	51 ^a	48 ^a
Clorofila a (pg.cel ⁻¹)	0,19 ^a	0,18 ^a
Feofitina (pg.cel ⁻¹)	0,04 ^a	0,07 ^b
Carotenoides (pg.cel ⁻¹)	0,07 ^a	0,12 ^b
Proteína (pg.cel ⁻¹)	9,2 ^a	20,5 ^b
Carboidrato (pg.cel ⁻¹)	15,5 ^a	25,5 ^b
Lipídeos totais (pg.cel ⁻¹)	0,07 ^a	0,17 ^b

Analise de metais

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as concentrações de cromo das soluções-teste no início dos ensaios com *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris* e após 96 horas de exposição. Foi possível observar que no tratamento controle de ambas as espécies não foi detectado cromo nas soluções-teste, enquanto que no tratamento que recebeu cromo, as concentrações quantificadas foram bem próximas à concentração nominal de 0,05 mg.L⁻¹.

No início do ensaio com *P. subcapitata* e *C. vulgaris*, as maiores concentrações de cromo foram observadas na fração dissolvida, sendo que após as 96 horas de exposição as maiores concentrações do metal estavam na fração particulada, ou seja, retido nas células algais.

Tabela 4: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste no início dos ensaios com *Pseudokirchneriella subcapitata* e após 96 horas de exposição

		Fração dissolvida	Fração particulada
Início do ensaio	Tratamento controle	0	0
	Tratamento com cromo	$0,042 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,003$
Após 96h	Tratamento controle	0	0
	Tratamento com cromo	$0,006 \pm 0,002$	$0,046 \pm 0,001$

Tabela 5: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste no início dos ensaios com *Chlorella vulgaris* e após 96 horas de exposição

		Fração dissolvida	Fração particulada
Início do ensaio	Tratamento controle	0	0
	Tratamento com cromo	$0,048 \pm 0,002$	$0,002 \pm 0,001$
Após 96h	Tratamento controle	0	0
	Tratamento com cromo	$0,010 \pm 0,003$	$0,039 \pm 0,002$

ETAPA II: Ensaios com organismos zooplanctônicos: aspectos estruturais das populações

Sobrevivência, fecundidade e taxa de alimentação dos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Nas Figuras 11 e 13 e Tabelas 6 e 7 estão representados os resultados dos testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo que como alimento foi utilizada a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Nas Figuras 12 e 14 e Tabelas 8 e 9 estão os resultados obtidos quando as espécies *C. dubia* e *C. silvestrii* foram expostas as mesmas condições, porém alimentadas com a alga *Chlorella vulgaris*.

Foi possível observar que não houve diferença significativa para a sobrevivência de *C. dubia* e *C. silvestrii* entre os tratamentos. Portanto, o cromo nas condições testadas não provocou mortalidade destes organismos (Figuras 11 e 12; Tabelas 6 a 9).

No ensaio com *C. dubia* (utilizando *P. subcapitata* como alimento), a sobrevivência dos organismos zooplanctônicos esteve entre 90% e 97%, considerando todos os tratamentos (C, AC, MC e AMC). Para *C. silvestrii*, a sobrevivência esteve entre 93% e 100%.

Valores semelhantes foram observados para *C. dubia* e *C. silvestrii* utilizando *C. vulgaris* como alimento. Nos tratamentos C, AC, MC e AMC, a sobrevivência de *C. dubia* esteve entre 90% e 100% e de *C. silvestrii* entre 90% e 100%.

Com relação à fecundidade dos organismos zooplanctônicos, em geral verificou-se que nos tratamentos com meio contaminado (MC) e alimento e meio contaminado (AMC) ocorreu uma diminuição no número de neonatos produzidos por fêmea. No tratamento com alimento contaminado (AC) não foi verificada diferença do tratamento controle e, portanto, não alterou a fecundidade de *C. dubia* e *C. silvestrii*. Portanto, $C = AC$; $C \text{ e } AC \neq MC \text{ e } AMC$; $MC = AMC$.

Estes resultados foram observados nos experimentos realizados com *C. dubia* e *C. silvestrii* alimentados com *P. subcapitata*. O mesmo ocorreu no experimento com *C. silvestrii* alimentado com *C. vulgaris*. Somente no experimento com *C. dubia* alimentada com *C. vulgaris* não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figuras 11 e 12; Tabelas 6 a 9).

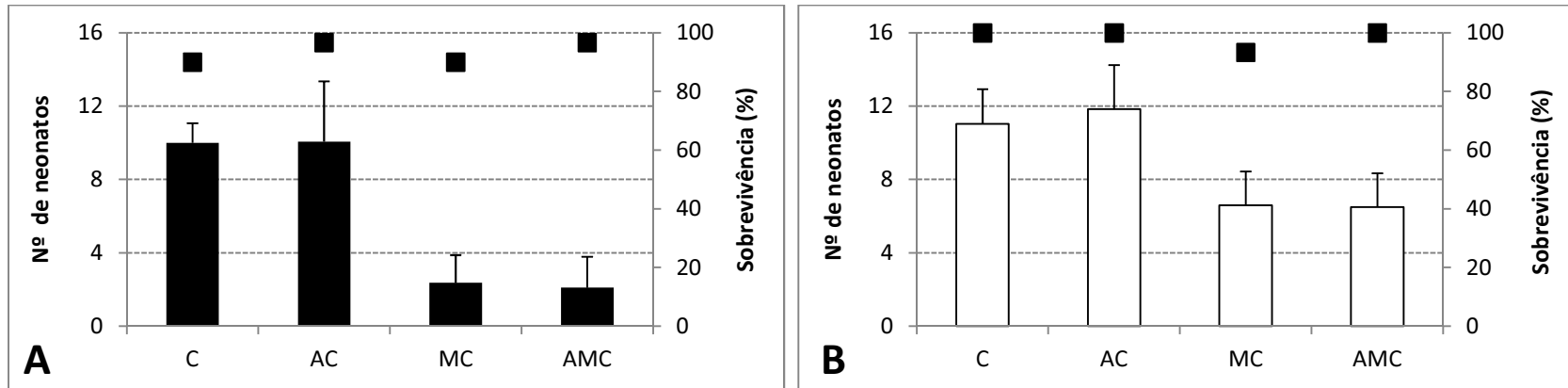


Figura 11: Fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e sobrevivência (%) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

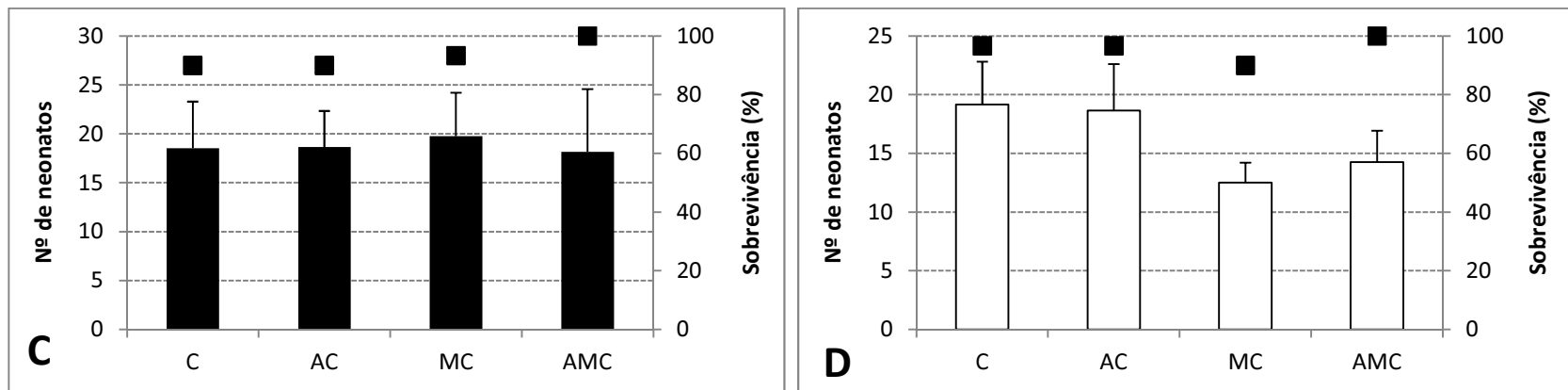


Figura 12: Fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e sobrevivência (%) de *Ceriodaphnia dubia* (C) e *Ceriodaphnia silvestrii* (D) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*.

Fecundidade
 Sobrevivência

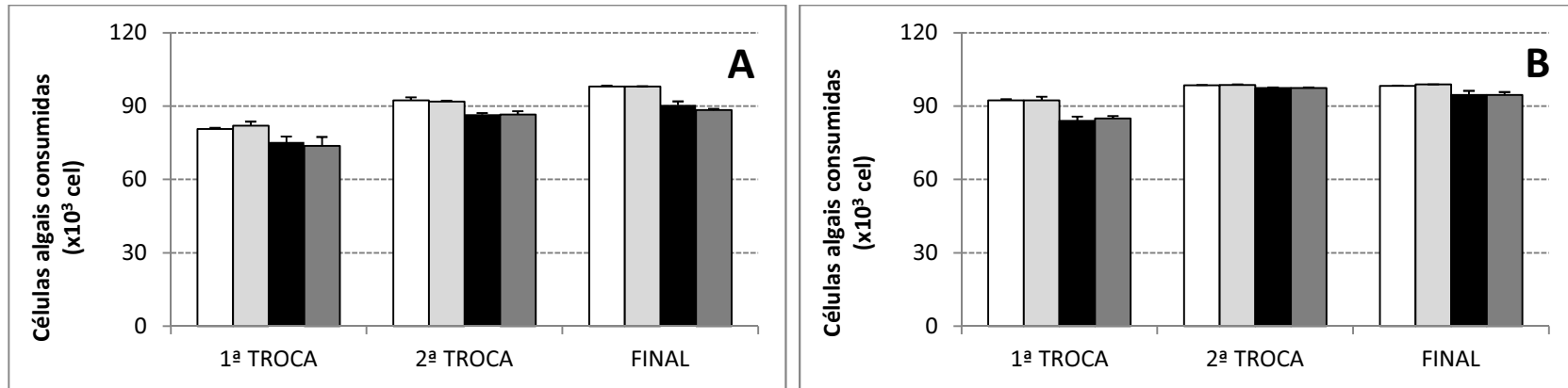


Figura 13: Taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

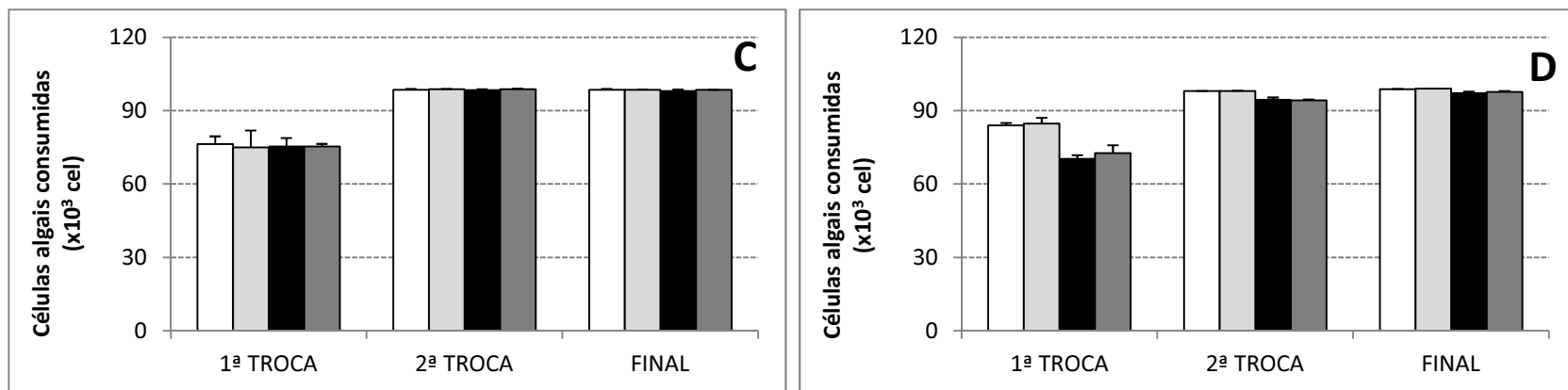


Figura 14: Taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* (C) e *Ceriodaphnia silvestrii* (D) quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*.

□ C □ AC ■ MC ■ AMC

Tabela 6: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$)

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Fecundidade	Taxa de alimentação ($\times 10^3$ cel.mL ⁻¹)		
			1ª troca	2ª troca	Final
C	90 ^a	12 ^a	81 ^a	92 ^a	98 ^a
AC	97 ^a	12 ^a	82 ^a	92 ^a	98 ^a
MC	90 ^a	2 ^b	75 ^b	87 ^b	91 ^b
AMC	97 ^a	2 ^b	74 ^b	87 ^b	88 ^b

Tabela 7: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$)

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Fecundidade	Taxa de alimentação ($\times 10^3$ cel.mL ⁻¹)		
			1ª troca	2ª troca	Final
C	100 ^a	12 ^a	92 ^a	98 ^a	98 ^a
AC	100 ^a	12 ^a	92 ^a	99 ^a	99 ^a
MC	93 ^a	7 ^b	84 ^b	97 ^b	95 ^b
AMC	100 ^a	7 ^b	85 ^b	97 ^b	95 ^b

Tabela 8: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$)

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Fecundidade	Taxa de alimentação ($\times 10^3$ cel.mL ⁻¹)		
			1ª troca	2ª troca	Final
C	90 ^a	19 ^a	76 ^a	99 ^a	98 ^a
AC	90 ^a	19 ^a	75 ^a	99 ^a	99 ^a
MC	93 ^a	20 ^a	76 ^a	99 ^a	98 ^a
AMC	100 ^a	18 ^a	75 ^a	99 ^a	98 ^a

Tabela 9: Sobrevivência, fecundidade (número médio de neonatos produzidos) e taxa de alimentação de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Tukey; $p < 0,05$)

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Fecundidade	Taxa de alimentação ($\times 10^3$ cel.mL ⁻¹)		
			1ª troca	2ª troca	Final
C	97 ^a	19 ^a	84 ^a	98 ^a	99 ^a
AC	97 ^a	19 ^a	85 ^a	98 ^a	99 ^a
MC	90 ^a	13 ^b	71 ^b	95 ^b	98 ^b
AMC	100 ^a	14 ^b	73 ^b	94 ^b	98 ^b

Na Figura 13 e Tabelas 6 e 7 estão representados os resultados da taxa de alimentação de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo que como alimento foi utilizada a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Na Figura 14 e Tabelas 8 e 9 estão os resultados obtidos quando as espécies *C. dubia* e *C. silvestrii* foram expostas as mesmas condições, porém alimentadas com a alga *Chlorella vulgaris*. As amostras para analisar a taxa de alimentação foram coletadas 3 vezes durante o experimento. Assim a identificação “1ª troca” corresponde à taxa alimentar do organismo zooplanctônico a partir do início do experimento até a realização da primeira troca de meio de cultivo e alimento; a identificação “2ª troca” corresponde à taxa alimentar entre a 1ª e 2ª troca de meio e alimento; a identificação “final” corresponde ao período entre a 2ª troca e a finalização do experimento.

Para a taxa de alimentação dos organismos zooplanctônicos, obteve-se o mesmo padrão de resposta observado na fecundidade. De modo geral, o tratamento com alimento contaminado (AC) não diferiu do tratamento controle. Os tratamentos com meio contaminado (MC) e alimento e meio contaminado (AMC) foram significativamente diferentes do controle. Também se observou que o tratamento MC não diferiu do tratamento AMC. Portanto, $C = AC$; $C \text{ e } AC \neq MC \text{ e } AMC$; $MC = AMC$ (Figuras 13 e 14; Tabelas 6 a 9).

Foi possível observar que nos tratamentos C e AC a taxa de alimentação dos organismos zooplanctônicos foi maior, enquanto nos tratamentos MC e AMC o consumo alimentar foi menor. Estes resultados foram observados nos experimentos realizados com *C. dubia* e *C. silvestrii* alimentados com *P. subcapitata*. O mesmo ocorreu no experimento com *C. silvestrii* alimentado com *C. vulgaris*. Somente no experimento com *C. dubia* alimentada com *C. vulgaris* não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. Este padrão de resposta foi observado na “1ª troca”, “2ª troca” e “final”.

Análise de metais

Nas Tabelas 10 e 11 estão apresentados os valores das concentrações de cromo das soluções-teste utilizadas nos ensaios de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo que como alimento foi utilizada a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentados os resultados para *C. dubia* e *C. silvestrii* quando foram expostas as mesmas condições, porém alimentadas com a alga *Chlorella vulgaris*.

No ensaio com *C. dubia* utilizando a alga *P. subcapitata* como alimento, a quantidade de cromo na fração dissolvida esteve entre 0 e 0,002 mg.L⁻¹ em C; 0,001 e 0,003 mg.L⁻¹ em AC; 0,017 e 0,045 mg.L⁻¹ em MC; e 0,009 e 0,059 mg.L⁻¹ em AMC. Para a fração particulada, os valores estiveram entre 0 e 0,016 mg.L⁻¹ em C; 0,005 e 0,015 mg.L⁻¹ em AC; 0,007 e 0,036 mg.L⁻¹ em MC; e 0,009 e 0,049 mg.L⁻¹ em AMC, conforme descrito na Tabela 10.

No ensaio com *C. silvestrii* utilizando a alga *P. subcapitata* como alimento, a quantidade de cromo na fração dissolvida esteve entre 0,001 e 0,003 mg.L⁻¹ em C; 0,001 e 0,002 mg.L⁻¹ em AC; 0,015 e 0,037 mg.L⁻¹ em MC; e 0,024 e 0,048 mg.L⁻¹ em AMC. Para a fração particulada, os valores estiveram entre 0,003 e 0,009 mg.L⁻¹ em C; 0,007 e 0,024 mg.L⁻¹ em AC; 0,019 e 0,038 mg.L⁻¹ em MC; e 0,017 e 0,036 mg.L⁻¹ em AMC, conforme descrito na Tabela 11.

No ensaio com *C. dubia* utilizando a alga *C. vulgaris* como alimento, a quantidade de cromo na fração dissolvida esteve entre 0 e 0,001 mg.L⁻¹ em C; 0,002 e 0,003 mg.L⁻¹ em AC; 0,007 e 0,035 mg.L⁻¹ em MC; e 0,007 e 0,033 mg.L⁻¹ em AMC. Para a fração particulada, os

valores estiverem entre 0,007 e 0,010 mg.L⁻¹ em C; 0,011 e 0,020 mg.L⁻¹ em AC; 0,010 e 0,021 mg.L⁻¹ em MC; e 0,018 e 0,024 mg.L⁻¹ em AMC, conforme descrito na Tabela 12.

No ensaio com *C. silvestrii* utilizando a alga *C. vulgaris* como alimento, a quantidade de cromo na fração dissolvida esteve entre 0,001 e 0,002 mg.L⁻¹ em C; 0,002 e 0,004 mg.L⁻¹ em AC; 0,011 e 0,037 mg.L⁻¹ em MC; e 0,009 e 0,053 mg.L⁻¹ em AMC. Para a fração particulada, os valores estiverem entre 0,011 e 0,013 mg.L⁻¹ em C; 0,015 e 0,019 mg.L⁻¹ em AC; 0,015 e 0,037 mg.L⁻¹ em MC; e 0,021 e 0,054 mg.L⁻¹ em AMC, conforme descrito na Tabela 13.

De modo geral, no tratamento C a concentração de cromo esteve em torno de 0,01 mg.L⁻¹ e em AC a concentração máxima foi de 0,02 mg.L⁻¹. No tratamento MC a concentração quantificada de cromo esteve bem próxima à concentração nominal de 0,05 mg.L⁻¹ e no tratamento AMC o cromo esteve acima da concentração nominal proposta neste estudo. Isto se deve à adição de alimento contaminado (previamente exposto ao cromo).

Conforme descrito no item 4.6.2, o alimento contaminado com cromo foi preparado em 1000 mL de meio LC Oligo (contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo) e após o período de 96 horas de crescimento, as células algais foram centrifugadas e ressuspensas com aproximadamente 10 mL de meio de cultivo do zooplâncton (meio ASTM). Mesmo após este procedimento, o cromo permaneceu absorvido ou adsorvido as células algais, uma vez que a concentração de cromo na suspensão algal de *P. subcapitata* utilizada como alimento nos ensaios foi de 0,05 mg.L⁻¹ (fração dissolvida) e 0,64 mg.L⁻¹ (fração particulada). No alimento preparado com *C. vulgaris* as concentrações de cromo foram 0,01 mg.L⁻¹ (fração dissolvida) e 1,112 mg.L⁻¹ (fração particulada), conforme descrito na Tabela 14. Ressalta-se que esta elevada concentração de metal se deve ao fato de uma solução algal preparada em 1000 mL (de meio LC Oligo contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo) ter sido ressuspensa em 10 mL de meio ASTM. Quando este alimento foi adicionado à solução-teste dos ensaios com

zooplâncton, novamente esta concentração sofreu uma diluição. Portanto, acredita-se que os valores de cromo das soluções-teste do tratamento AMC dos ensaios com *C. dubia* e *C. silvestrii* estiveram acima da concentração nominal proposta neste estudo em função deste procedimento. Na Tabela 14 estão descritas as concentrações de cromo da suspensão algal de *P. subcapitata* e *C. vulgaris* oferecidas como alimento para o zooplâncton.

Com relação à concentração de cromo nos organismos zooplanctônicos, acredita-se que o número de animais utilizados na análise foi insuficiente para uma quantificação precisa, uma vez que não houve grande variação na concentração de cromo entre os tratamentos. Ressalta-se que para a análise de metais, todas as fêmeas adultas (vivas) obtidas no final de experimento foram coletadas e armazenadas juntas em uma única amostra. Assim, para cada tratamento foram utilizadas aproximadamente 30 fêmeas.

Tabela 10: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Tratamento controle (C)		
Solução-teste do início do experimento	0,000	0,000
Após 72h do início do experimento	0,002	0,016
Solução-teste da 1ª troca	0,002	0,004
Após 72h da realização da 1ª troca	0,002	0,010
Solução-teste da 2ª troca	0,002	0,007
Final do experimento	0,001	0,008
Organismos zooplanctônicos	-	0,016
Tratamento alimento contaminado (AC)		
Solução-teste do início do experimento	0,002	0,006
Após 72h do início do experimento	0,003	0,015
Solução-teste da 1ª troca	0,002	0,014
Após 72h da realização da 1ª troca	0,001	0,015
Solução-teste da 2ª troca	0,001	0,005
Final do experimento	0,003	0,011
Organismos zooplanctônicos	-	0,020
Tratamento meio aquoso contaminado (MC)		
Solução-teste do início do experimento	0,042	0,009
Após 72h do início do experimento	0,019	0,033
Solução-teste da 1ª troca	0,043	0,007
Após 72h da realização da 1ª troca	0,017	0,036
Solução-teste da 2ª troca	0,045	0,007
Final do experimento	0,020	0,035
Organismos zooplanctônicos	-	0,012
Tratamento alimento e meio aquoso contaminados (AMC)		
Solução-teste do início do experimento	0,048	0,010
Após 72h do início do experimento	0,025	0,039
Solução-teste da 1ª troca	0,059	0,009
Após 72h da realização da 1ª troca	0,009	0,049
Solução-teste da 2ª troca	0,044	0,010
Final do experimento	0,012	0,048
Organismos zooplanctônicos	-	0,016

Tabela 11: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Tratamento controle (C)		
Solução-teste do início do experimento	0,001	0,008
Após 72h do início do experimento	0,003	0,003
Solução-teste da 1ª troca	0,001	0,006
Após 72h da realização da 1ª troca	0,002	0,007
Solução-teste da 2ª troca	0,001	0,009
Final do experimento	0,003	0,008
Organismos zooplanctônicos	-	0,014
Tratamento alimento contaminado (AC)		
Solução-teste do início do experimento	0,001	0,017
Após 72h do início do experimento	0,002	0,007
Solução-teste da 1ª troca	0,001	0,016
Após 72h da realização da 1ª troca	0,002	0,014
Solução-teste da 2ª troca	0,001	0,024
Final do experimento	0,002	0,017
Organismos zooplanctônicos	-	0,013
Tratamento meio aquoso contaminado (MC)		
Solução-teste do início do experimento	0,029	0,019
Após 72h do início do experimento	0,020	0,027
Solução-teste da 1ª troca	0,037	0,020
Após 72h da realização da 1ª troca	0,018	0,023
Solução-teste da 2ª troca	0,030	0,019
Final do experimento	0,015	0,038
Organismos zooplanctônicos	-	0,016
Tratamento alimento e meio aquoso contaminados (AMC)		
Solução-teste do início do experimento	0,042	0,020
Após 72h do início do experimento	0,027	0,036
Solução-teste da 1ª troca	0,048	0,017
Após 72h da realização da 1ª troca	0,036	0,033
Solução-teste da 2ª troca	0,041	0,022
Final do experimento	0,024	0,036
Organismos zooplanctônicos	-	0,014

Tabela 12: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Tratamento controle (C)		
Solução-teste do início do experimento	0,001	0,009
Após 72h do início do experimento	0,001	0,010
Solução-teste da 1ª troca	0,001	0,008
Após 72h da realização da 1ª troca	0,001	0,008
Solução-teste da 2ª troca	0,001	0,007
Final do experimento	0,001	0,008
Organismos zooplanctônicos	-	0,002
Tratamento alimento contaminado (AC)		
Solução-teste do início do experimento	0,003	0,015
Após 72h do início do experimento	0,002	0,012
Solução-teste da 1ª troca	0,002	0,020
Após 72h da realização da 1ª troca	0,002	0,011
Solução-teste da 2ª troca	0,002	0,018
Final do experimento	0,002	0,014
Organismos zooplanctônicos	-	0,002
Tratamento meio aquoso contaminado (MC)		
Solução-teste do início do experimento	0,035	0,010
Após 72h do início do experimento	0,006	0,017
Solução-teste da 1ª troca	0,023	0,015
Após 72h da realização da 1ª troca	0,007	0,015
Solução-teste da 2ª troca	0,024	0,016
Final do experimento	0,008	0,021
Organismos zooplanctônicos	-	0,002
Tratamento alimento e meio aquoso contaminados (AMC)		
Solução-teste do início do experimento	0,022	0,022
Após 72h do início do experimento	0,007	0,019
Solução-teste da 1ª troca	0,033	0,024
Após 72h da realização da 1ª troca	0,008	0,018
Solução-teste da 2ª troca	0,027	0,020
Final do experimento	0,008	0,020
Organismos zooplanctônicos	-	0,002

Tabela 13: Concentração de cromo (mg.L-1) quantificada nas soluções-teste e nos organismos zooplanctônicos utilizados no ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Tratamento controle (C)		
Solução-teste do início do experimento	0,002	0,010
Após 72h do início do experimento	0,002	0,011
Solução-teste da 1ª troca	0,002	0,013
Após 72h da realização da 1ª troca	0,001	0,011
Solução-teste da 2ª troca	0,001	0,011
Final do experimento	0,001	0,011
Organismos zooplanctônicos	-	0,004
Tratamento alimento contaminado (AC)		
Solução-teste do início do experimento	0,003	0,017
Após 72h do início do experimento	0,003	0,015
Solução-teste da 1ª troca	0,003	0,019
Após 72h da realização da 1ª troca	0,002	0,016
Solução-teste da 2ª troca	0,004	0,018
Final do experimento	0,002	0,016
Organismos zooplanctônicos	-	0,004
Tratamento meio aquoso contaminado (MC)		
Solução-teste do início do experimento	0,037	0,015
Após 72h do início do experimento	0,013	0,019
Solução-teste da 1ª troca	0,026	0,026
Após 72h da realização da 1ª troca	0,012	0,037
Solução-teste da 2ª troca	0,028	0,025
Final do experimento	0,011	0,028
Organismos zooplanctônicos	-	0,003
Tratamento alimento e meio aquoso contaminados (AMC)		
Solução-teste do início do experimento	0,037	0,034
Após 72h do início do experimento	0,010	0,033
Solução-teste da 1ª troca	0,053	0,021
Após 72h da realização da 1ª troca	0,009	0,054
Solução-teste da 2ª troca	0,032	0,036
Final do experimento	0,012	0,036
Organismos zooplanctônicos	-	0,004

Tabela 14: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) da suspensão algal oferecida como alimento nos tratamentos AC (alimento contaminado) e AMC (alimento e meio contaminado) dos ensaios crônicos com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Suspensão algal de <i>P. subcapitata</i>		
Suspensão algal no início do crescimento (meio LC Oligo)	0,048	0,006
Suspensão algal após 96 horas de exposição (meio LC Oligo)	0,006	0,044
Suspensão algal ressuspendida em meio ASTM	0,051	0,639
Suspensão algal de <i>C. vulgaris</i>		
Suspensão algal no início do crescimento (meio LC Oligo)	0,050	0,002
Suspensão algal após 96 horas de exposição (meio LC Oligo)	0,006	0,041
Suspensão algal ressuspendida em meio ASTM	0,010	1,112

PARTE III: ENSAIOS COM ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS: ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS POPULAÇÕES

Taxa de aumento populacional e conteúdo total de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Nas Figuras 15 a 18 e Tabelas 15 a 17 estão representados os resultados dos ensaios fisiológicos com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Nesta etapa apenas dois tratamentos foram testados: um tratamento controle (C) e outro onde o meio aquoso e o alimento estavam contaminados com cromo (AMC). No tratamento contaminado foi adicionado cromo no meio de cultivo na concentração de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ e os organismos zooplanctônicos foram alimentados com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* previamente exposta a $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo.

A taxa de aumento populacional (r) de *C. dubia* e *C. silvestrii* quando expostas ao tratamento C e AMC estão descritas na Figura 15 e Tabelas 16 e 17. Foi possível observar uma redução no crescimento populacional de ambas as espécies no tratamento AMC, havendo diferença significativa entre controle e tratamento com contaminante. Para *C. dubia* a taxa de

aumento populacional no tratamento controle foi de 0,41 e no tratamento AMC foi de 0,30. Para *C. silvestrii* o valor de r em C foi de 0,37 e em AMC foi de 0,26.

O conteúdo total de proteínas e carboidratos de *C. dubia* e *C. silvestrii* quando expostas ao tratamento C e AMC estão descritas nas Figuras 16 e 17 e Tabelas 16 e 17. O tratamento AMC causou um aumento significativo na concentração de proteínas para ambas as espécies. *Ceriodaphnia dubia* apresentou 0,50 $\mu\text{g.org}$ de proteínas totais no tratamento controle e 0,99 $\mu\text{g.org}$ no tratamento AMC; *Ceriodaphnia silvestrii* apresentou 0,73 $\mu\text{g.org}$ de proteínas no tratamento C e 1,30 $\mu\text{g.org}$ em AMC.

Com relação ao conteúdo de carboidratos, as espécies *C. dubia* e *C. silvestrii* tiveram respostas diferentes aos tratamentos C e AMC. Para *C. dubia*, houve um aumento significativo no conteúdo de carboidratos em AMC (0,50 $\mu\text{g.org}$) quando comparado a C (0,11 $\mu\text{g.org}$). Para *C. silvestrii* não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, uma vez que em C o conteúdo de carboidratos foi de 0,05 $\mu\text{g.org}$ e em AMC foi de 0,06 $\mu\text{g.org}$, conforme descrito na Figura 17 e Tabelas 16 e 17.

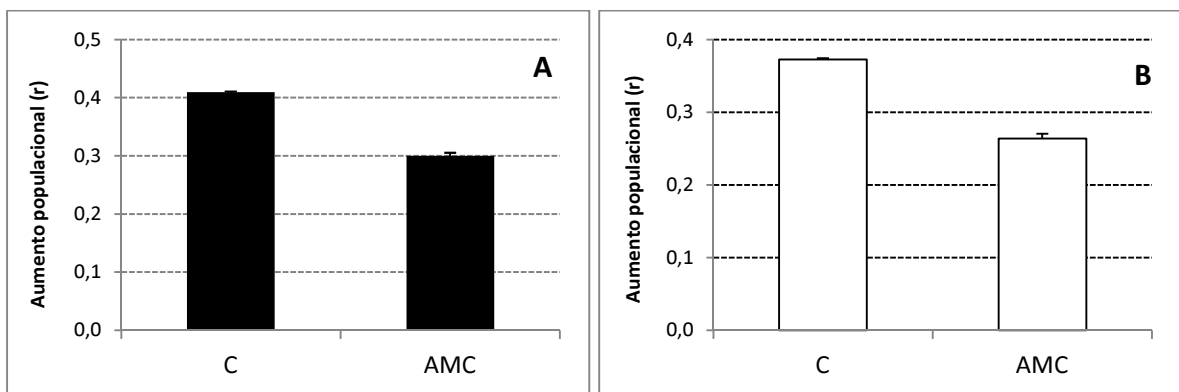


Figura 15: Taxa de aumento populacional (r) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

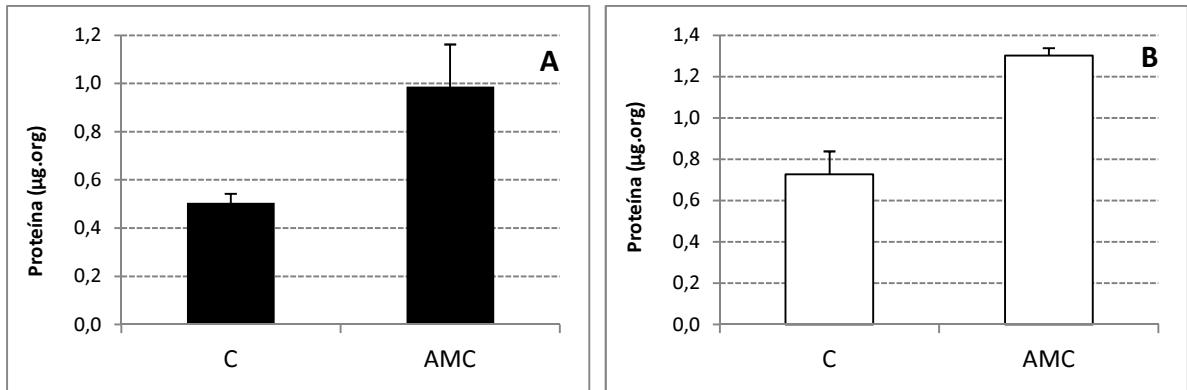


Figura 16: Conteúdo total de proteínas (µg.org) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

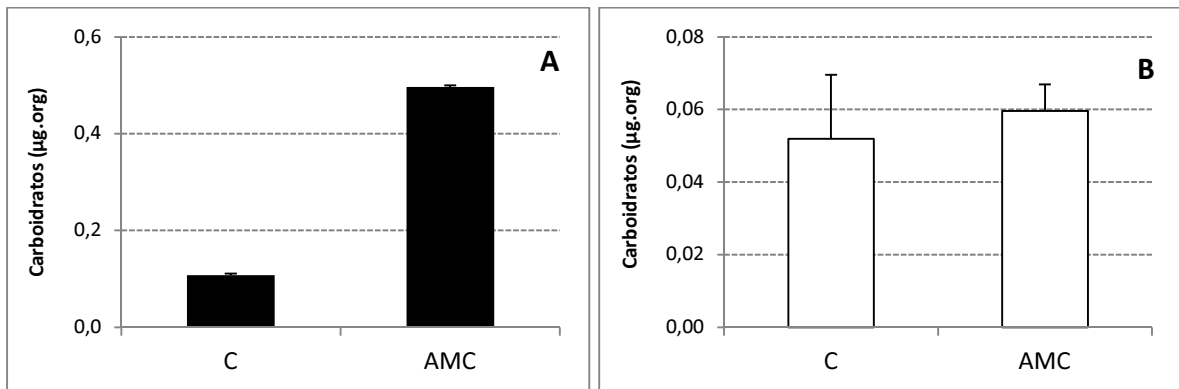


Figura 17: Conteúdo total de carboidratos (µg.org) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Na Figura 18 e Tabelas 16 e 17 estão descritos os resultados obtidos para lipídeos totais de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Foi possível observar que o tratamento AMC provocou um aumento significativo no conteúdo de lipídeos totais em ambas as espécies. Para *C. dubia* o conteúdo de lipídeos no tratamento controle foi de 57 ng.org e no tratamento AMC foi de 103 ng.org. *C. silvestrii* apresentou 164 ng.org em C e 531 ng.org em AMC.

Com relação à composição lipídica de *C. dubia*, as classes que mais diferiram entre os tratamentos C e AMC foram álcool alifático livre (que representou 9% da composição lipídica em C e 14% em AMC), esterol (8% em C e 13% em AMC) e fosfolipídeos (60% em C e 46% em AMC). Para *C. silvestrii* não foi observado grande variação na porcentagem de contribuição das classes lipídicas entre os tratamentos, apenas em fosfolipídeos que representou 83% do total no tratamento C e 86% em AMC, conforme descrito na Tabela 15.

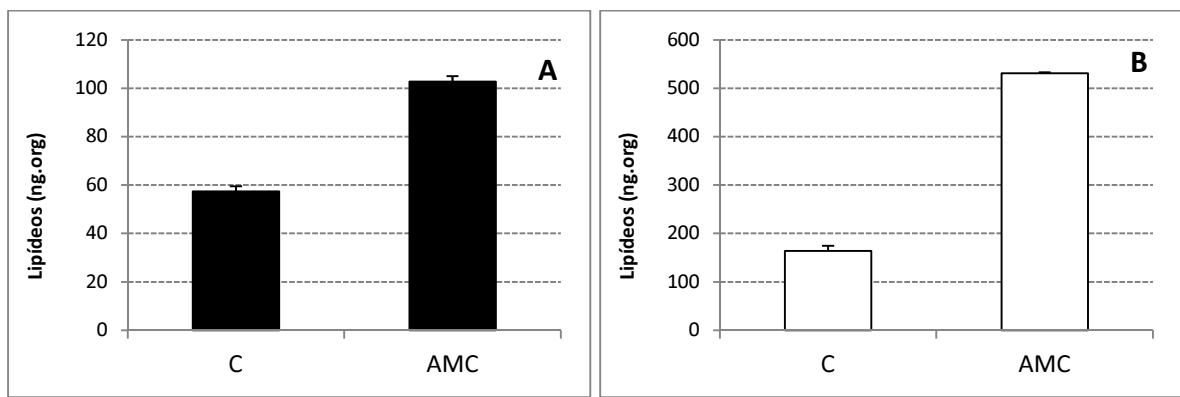


Figura 18: Conteúdo total de lipídeos (ng.org) de *Ceriodaphnia dubia* (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B) quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Tabela 15: Composição lipídica (%) de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Classes lipídicas (%)	<i>C. dubia</i>		<i>C. silvestrii</i>	
	C	AMC	C	AMC
Hidrocarboneto (HC)	5	8	2	2
Éster de cera (WE)	5	7	2	2
Triglicerídeo (TG)	5	5	1	1
Ácidos graxos livres (FFA)	5	6	2	1
Álcool alifático livre (ALC)	9	14	7	5
Esterol (ST)	8	13	3	2
Lipídeos polares móveis em acetona (AMPL)	3	1	-	-
Fosfolipídeos (PL)	60	46	83	86

Tabela 16: Valores médios da taxa de aumento populacional e conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; $p < 0,05$)

Parâmetros	C	AMC
Taxa de aumento populacional (r)	0,41 ^a	0,30 ^b
Conteúdo total de proteínas ($\mu\text{g.org}$)	0,50 ^a	0,99 ^b
Conteúdo total de carboidratos ($\mu\text{g.org}$)	0,11 ^a	0,50 ^b
Lipídeos totais (ng.org)	57 ^a	103 ^b

Tabela 17: Valores médios da taxa de aumento populacional e conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídeos de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC) sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Parâmetros com letras diferentes (a e b) representam diferença significativa (Teste t; $p < 0,05$)

Parâmetros	C	AMC
Taxa de aumento populacional (r)	0,37 ^a	0,26 ^b
Conteúdo total de proteínas ($\mu\text{g.org}$)	0,73 ^a	1,30 ^b
Conteúdo total de carboidratos ($\mu\text{g.org}$)	0,05 ^a	0,06 ^a
Lipídeos totais (ng.org)	164 ^a	531 ^b

Análise de metais

Como nas etapas anteriores deste estudo já haviam sido feitas as análises de metais nas frações dissolvida (meio de cultivo tanto das espécies fitoplanctônicas como zooplanctônicas) e particulada (presente nas células algais e no zooplâncton), nesta etapa do trabalho amostras das soluções-teste foram analisadas apenas no início dos ensaios para a quantificação da concentração nominal de cromo.

Nas Tabelas 18 e 19 estão apresentados os valores das concentrações de cromo das soluções-teste utilizadas nos ensaios com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e a combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo que como alimento foi utilizada a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

As concentrações de cromo das soluções-teste foram semelhantes às observadas na etapa II desta pesquisa. No ensaio com *C. dubia* a quantidade de cromo na fração dissolvida

do tratamento controle foi $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ e na fração particulada a concentração de cromo esteve entre $0,008$ e $0,011 \text{ mg.L}^{-1}$. No tratamento AMC, a fração dissolvida esteve entre $0,050$ e $0,051 \text{ mg.L}^{-1}$ e a fração particulada entre $0,014$ e $0,018 \text{ mg.L}^{-1}$. Neste tratamento, a concentração de cromo estava acima da concentração nominal de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, novamente pela adição alimento contaminado ao meio aquoso contaminado.

No ensaio com *C. silvestrii*, no tratamento C a fração dissolvida de cromo foi de $0,002 \text{ mg.L}^{-1}$ e a fração particulada esteve entre $0,008$ e $0,012 \text{ mg.L}^{-1}$. No tratamento AMC, a fração dissolvida esteve entre $0,050$ e $0,060 \text{ mg.L}^{-1}$ e a fração particulada entre $0,010$ e $0,013 \text{ mg.L}^{-1}$.

Tabela 18: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste do ensaio com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Tratamento controle (C)		
Solução-teste do início do experimento	0,001	0,011
Solução-teste da 1ª troca	0,001	0,009
Solução-teste da 2ª troca	0,001	0,008
Tratamento alimento e meio aquoso contaminados (AMC)		
Solução-teste do início do experimento	0,050	0,014
Solução-teste da 1ª troca	0,051	0,015
Solução-teste da 2ª troca	0,050	0,018

Tabela 19: Concentração de cromo (mg.L^{-1}) quantificada nas soluções-teste do ensaio com *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

	Fração dissolvida	Fração particulada
Tratamento controle (C)		
Solução-teste do início do experimento	0,002	0,008
Solução-teste da 1ª troca	0,002	0,010
Solução-teste da 2ª troca	0,002	0,012
Tratamento alimento e meio aquoso contaminados (AMC)		
Solução-teste do início do experimento	0,050	0,010
Solução-teste da 1ª troca	0,060	0,012
Solução-teste da 2ª troca	0,054	0,013

6. DISCUSSÃO

O cromo é o sétimo metal mais abundante na crosta terrestre e ocorre naturalmente nos diversos compartimentos ambientais. Este metal tem sido largamente utilizado na indústria em processos como a galvanoplastia, curtumes, polimento, pintura, fabricação de pigmentos e preservação de madeira. Estas atividades antrópicas têm levado a uma ampla contaminação do meio ambiente (VOLLAND et al., 2012; KOTAS e STASICKA, 2000; NACORDA et al., 2010), tendo como consequência a perda da diversidade biológica, o aumento da bioacumulação e a ampliação de substâncias tóxicas na cadeia alimentar (AFKAR et al., 2010) em ecossistemas terrestres e aquáticos.

Diante da importância dos metais na contaminação dos ecossistemas aquáticos, bem como a necessidade de melhor entendimento das interações desses elementos no ambiente, no presente estudo avaliou-se a influência do cromo em organismos aquáticos e em suas interações tróficas por meio de ensaios de toxicidade com organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos.

Os resultados demonstraram efeitos significativos do cromo nos organismos fitoplanctônicos *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*. Para ambas as espécies, as células tratadas com cromo foram significativamente diferentes do tratamento controle nos parâmetros estruturais e fisiológicos avaliados (exceto para biomassa seca e concentração de clorofila *a* de *C. vulgaris*). Estes dados estão coerentes com os de outros autores, os quais relatam o efeito do cromo no crescimento celular e a atividade fotossintética de organismos fitoplanctônicos. Wium-Andersen (1974), por exemplo, demonstrou que o Cr (VI), na concentração de 0,3 mg.L⁻¹, afetou o crescimento das algas *Nitzschia palea* e *Chlorella pyrenoidosa*, enquanto uma concentração de 1,0 mg.L⁻¹ reduziu a fotossíntese. Nacorda et al. (2007) relataram a inibição de crescimento em *Chlorella vulgaris* em

concentrações de cromo superiores a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Lasheen et al. (1989) observaram declínio na densidade de algas verdes na presença de cromo em concentrações compreendidas entre $0,25$ e $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Volland et al. (2012) relataram que o cromo (em concentrações que variaram de $10 \text{ }\mu\text{M}$ a 1 mM) inibiu o desenvolvimento celular e as taxas de divisão da alga *Micrasterias*. Rai et al. (2013) observaram redução do crescimento celular de *C. vulgaris* em concentrações crescente de cromo. Hörsik e Balogh (2002) relataram redução do crescimento de *C. pyrenoidosa* em função da concentração de cromo, assim como Rocchetta et al. (2003 e 2006b), que também observaram redução de crescimento em *Euglena gracilis* em função da concentração de cromo. Para Ali et al. (2006), a inibição de crescimento em diversas espécies de algas é comum na fitotoxicidade de metais.

No presente estudo o tratamento com cromo inibiu o crescimento celular das algas *P. subcapitata* e *C. vulgaris* e provocou redução na biomassa seca de *P. subcapitata*. Com relação aos pigmentos fotossintéticos, verificou-se que o cromo, nas condições testadas, reduziu a concentração de clorofila *a* e carotenoides de *P. subcapitata*. Para *C. vulgaris* a concentração de carotenoides aumentou na presença do cromo. Com relação à concentração de feofitina, para ambas as espécies de algas observou-se um aumento deste pigmento no tratamento contaminado com cromo. Estes resultados evidenciam danos na atividade fotossintética destas algas na presença do cromo.

Os estudos desenvolvidos por Rodríguez et al. (2007), que avaliaram os efeitos do cromo na atividade fotossintética da alga *Chlamydomonas reinhardtii*, também demonstraram o aumento da concentração de feofitina na presença do cromo. Segundo os autores, o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), provocado pela toxicidade de metais, pode destruir a membrana do tilacóide e causar danos nos pigmentos localizados nesta membrana, gerando assim uma feofitização da clorofila, devido à exposição ao conteúdo ácido do lúmen dos tilacóides. Os resultados dos autores mostraram que as células de

Chlamydomonas tratadas com 1 e 5 mM de cromo podem modular antioxidantes cloroplasmáticos e se aclimatar ao estresse oxidativo induzido pelo metal, atenuando ou eliminando os danos causados à maquinaria fotossintética. Porém, quando a concentração de cromo aumenta para 10 mM, a exposição ao metal torna-se aguda e, sob estas condições, os níveis de ROS formados excedem a capacidade do sistema antioxidante, danificando compostos celulares. Assim, há uma redução na absorvância dos compartimentos fotossintéticos e feofitinas substituem clorofilas.

Outros trabalhos da literatura com diferentes organismos também corroboram com os nossos resultados. Rai e Mehrotra (2008) verificaram que concentrações crescentes de Cr (VI) levaram a uma diminuição na biomassa da erva *Phyllanthus amarus* e ainda induziram uma degradação de pigmentos fotossintéticos, especialmente clorofila e carotenoides. Volland et al. (2012) também observaram que o tratamento com cromo reduziu em até 20% o conteúdo de clorofila de *Micrasterias*, enquanto Unal et al. (2010) observaram inibição fotossintética na alga verde *Ulva lactuca* após o tratamento com cromo. Hörsik et al. (2006) relataram diminuição da clorofila *a* e *b* de *Chlorella pyrenoidosa* em função da concentração de cromo.

Para Pinto et al. (2003), a fotossíntese é provavelmente o processo metabólico mais afetado pela toxicidade dos metais. Sela et al. (1989) relacionam a presença do cromo com a diminuição da absorção de magnésio e nitrogênio, que são componentes essenciais na molécula de clorofila. Alguns autores (WONG e CHANG, 1991; CERVANTES et al., 2001; RAI et al., 1992; ALI et al., 2006; MALLICK e MOHN 2003; RODRÍGUEZ et al., 2007), como já discutido anteriormente, em estudos de toxicidade com cromo, têm relacionado alterações na síntese de clorofila com a presença de um estresse oxidativo. Para estes autores a inibição no transporte de elétrons no Fotossistema II por fatores exógenos, provoca a formação de radicais de oxigênio e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Como um mecanismo antioxidante para eliminar estas espécies reativas de oxigênio, gerado em resposta

à toxicidade do cromo, tem sido relatado tanto à indução quanto a degradação da concentração de carotenoides (RODRÍGUEZ et al., 2007; RAI et al., 1992; RAI et al., 2004; HÖRCSIK et al., 2006).

No presente estudo, foi observado tanto o aumento quanto a diminuição no conteúdo de carotenoides das espécies algais utilizadas como organismos-teste. Para *P. subcapitata*, o tratamento com cromo reduziu em 66% a concentração de carotenoides em relação ao tratamento controle, enquanto para *C. vulgaris* a presença do cromo aumentou em 64% a concentração deste pigmento.

Resultados semelhantes foram relatados por Rai et al., (1992) em ensaios de toxicidade do cromo utilizando a alga *Glaucocystis nostochinearum*. Os autores observaram um declínio elevado na concentração de carotenoides na presença do cromo. Nichols et al. (2000) também observaram redução de carotenoides em *Salvinia minima* exposta ao cromo. Por outro lado, Rai et al. (2013), utilizando como organismo-teste a alga *C. vulgaris*, observaram aumento na concentração de carotenoides com o aumento da concentração de cromo, em concentrações que variaram entre 0,01 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. No entanto, em concentrações maiores de cromo foi observado declínio de carotenoides. Hörcsik et al. (2006) relataram aumento na concentração de carotenoides de *C. pyrenoidosa* em função da concentração de cromo.

Carotenoides desempenham o papel de antioxidante celular e eliminam os radicais livres, reduzindo o dano celular (CZERPAK et al., 2006; PINTO et al., 2003). Para Kupper et al. (2002), níveis mais altos de antioxidantes seria fundamental para suportar o estresse oxidativo provocado por uma reduzida capacidade de utilização de energia, como consequência de toxicidade de metais.

Portanto, no presente estudo, alterações na concentração de carotenoides evidenciam um estresse provocado pelo cromo. O aumento de carotenoides, como observado em *C.*

vulgaris, pode representar um mecanismo de reparação à toxicidade, sendo que a diminuição deste pigmento, como observado em *P. subcapitata*, pode significar que esta capacidade de reparação foi ultrapassada/danificada pelo cromo nas condições testadas.

Os resultados também mostraram que o tratamento com cromo levou a um aumento na concentração de proteínas, carboidratos e lipídeos totais de *P. subcapitata* e *C. vulgaris*. Resultados semelhantes estão descritos na literatura em trabalhos com cromo e diversos metais, como em Rocchetta et al. (2006b), que observaram aumento de proteínas em *Euglena gracilis* após exposição ao cromo. Harish et al. (2011) relataram aumento na concentração de proteínas totais em culturas de *C. vulgaris* expostas ao lixiviado de cobre. Haneda et al. (2014) observaram aumento de proteínas após a adição de cobre em meio de cultura modificado em ensaios com alga *C. sorokiniana*. Osman et al. (2004) relataram aumento no teor de proteínas nas algas *Scenedesmus obliquus* e *Nitzschia perminuta* em baixas concentrações de cobalto e níquel. Einicker-Lamas et al. (1996) observaram aumento de proteínas em *Euglena gracilis* exposta ao cádmio, cobre e zinco. Afkar et al. (2010) registraram aumento no teor de proteínas de *C. vulgaris* quando expostas ao cobre e zinco, mas também relataram que em concentrações mais elevadas de metais pode ocorrer decréscimo no conteúdo proteico. Resultados semelhantes foram encontrados por Chia et al. (2012) que também observaram aumento de proteínas em *C. vulgaris* para somente uma das concentrações testadas de cádmio. Osman et al. (2004) sugerem que o acúmulo de proteínas em baixas concentrações de metais pode ser uma das formas através das quais as algas podem suprimir os seus efeitos tóxicos. Para Pinto et al. (2003) as células algais podem induzir a síntese de proteínas como uma alternativa para manter os metais fora da célula, sintetizando proteínas antioxidantes e quelantes (como metalotioneínas e fitoquelatinas).

Com relação ao conteúdo de carboidratos, Rodríguez et al. (2007) também observaram acumulação de carboidratos em *Chlamydomonas reinhardtii* submetida ao cromo, o que para

os autores indica o impacto deste metal no metabolismo celular. Gorbi e Corradi (1993) observaram aumento de carboidratos em *Scenedesmus acutus* após exposição ao cromo, assim como Rocchetta et al. (2003 e 2006b), que também verificaram aumento de carboidratos em *Euglena gracilis* após exposição ao cromo. Em estudos realizados com macrófitas foram obtidos resultados semelhantes, como em Wilson e Al-Hamdani (1997), que observaram aumento de carboidratos em *Azolla caroliniana* na presença de cromo. Nichols et al. (2000) observaram aumento significativo de carboidratos de *Salvinia minima* na presença de cromo e relacionaram este acúmulo com menores taxas de absorção de carbono e redução na respiração. Ainda segundo estes autores, a acumulação de carboidratos em células tratadas com cromo indica o impacto deste metal no metabolismo celular. A diminuição da taxa de utilização do fotossintato, e a consequente acumulação, podem ser uma provável consequência de uma relação fonte-dreno alterada, principalmente devido à inibição da fotossíntese e processos de divisão celular.

Para Juneja et al. (2013), a quantidade de carbono fixado em carboidratos e lipídeos é altamente influenciada por fatores ambientais. Segundo Haneda et al. (2014) o aumento na concentração de carboidratos e lipídeos sugere que as células do fitoplâncton pode estar em uma situação desfavorável para o crescimento, sendo que Guschina e Harwood (2006a) mencionam que os poluentes ambientais, incluindo metais, são conhecidos por afetar o metabolismo lipídico das algas. No presente estudo também foi observado um aumento na concentração de lipídeos totais de *P. subcapitata* e *C. vulgaris* quando expostas ao cromo. Com relação à composição lipídica, para *P. subcapitata* os lipídeos polares móveis em acetona (AMPL) e fosfolipídeos (PL) foram as classes que mais variaram em relação ao controle. Em *C. vulgaris* as classes que mais diferiram entre os tratamentos foram ácidos graxos livres (FFA), álcool alifático livre (ALC) e AMPL.

Os lipídeos são os principais componentes de membranas e, por conseguinte, são vitais para a sua função (MURATA e SIEGENTHALER, 1998). Além disso, o metabolismo dos lipídeos é capaz de se ajustar de forma apropriada em condições de estresse ambiental (CHIA et al. 2013a e 2013b; HU et al. 2008). Na presença de metais, vários aspectos da bioquímica lipídica têm sido frequentemente relatados por sofrer alterações, as quais incluem alterações qualitativas e quantitativas (GUSCHINA e HARWOOD, 2006b).

Apesar da resposta fisiológica das algas para metais não depender somente da especiação metálica utilizada, mas também da concentração e duração da exposição (McLARNON-RICHES et al., 1998), o aumento de lipídeos em células algais expostas a diferentes metais tem sido frequentemente relatado na literatura. Einicker-Lamas et al. (1996), por exemplo, observaram aumento no conteúdo de lipídeos totais de *Euglena gracilis* exposta ao cádmio, sendo que colesterol e fosfolipídeos apresentaram as maiores concentrações após o tratamento com metal, o mesmo ocorrendo em *E. gracilis* quando exposta ao cobre e zinco (EINICKER-LAMAS et al., 2002), que novamente observaram aumento no teor de lipídeos. Souza (2011) observou aumento de lipídeos totais em *C. vulgaris* exposta ao cobre. McLarnon-Riches et al. (1998) verificaram aumento de lipídeos, especialmente oleato, em *Selenastrum capricornutum* após exposição ao cobre, zinco e cádmio. Segundo os autores, a capacidade de algas para modificar o seu metabolismo lipídico em resposta às mudanças nas condições ambientais é essencial para o seu crescimento e sobrevivência. No entanto, essas adaptações muitas vezes são respostas específicas das espécies e raramente são aplicáveis a todos os membros do grupo (McLARNON-RICHES et al., 1998).

Rocchetta et al. (2006a) também obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Os autores observaram aumento no conteúdo de lipídeos totais de *Euglena gracilis* em umas das concentrações de cromo testadas, relacionando este aumento como um

mecanismo de defesa ou reparação com o objetivo de reduzir os danos celulares causados pelo estresse ao cromo.

Com relação à composição lipídica, os resultados do presente estudo mostraram que as classes mais afetadas após a exposição ao cromo foram lipídeos relacionados com a clorofila, como os lipídeos polares móveis em acetona. Sabe-se que o AMPL geralmente está relacionado com a clorofila, uma vez que cerca de 50% de sua composição é constituída por este pigmento fotossintético (PARRISH e WANGERSKY 1987; LOMBARDI e WANGERSKY, 1991). Assim, era esperado que houvesse diminuição desta fração lipídica, uma vez que houve redução na quantidade de clorofila e pigmentos fotossintéticos após a exposição ao cromo. Nos ensaios realizados com *P. subcapitata*, também se observou alteração no conteúdo de fosfolipídeos, que são os principais constituintes de membranas celulares e possuem função estrutural (BABA e SHIRAIWA, 2013). Esta alteração pode estar relacionada com a integridade da membrana (WU et al., 2005). Einicker-Lamas et al. (1996) também observaram alterações no conteúdo de fosfolipídeos da alga *E. gracilis* exposta ao cádmio. Além destes, no ensaio realizado com *Chlorella vulgaris* também se observou uma alteração no conteúdo de ácidos graxos livres. Rocchetta et al. (2006a) obteve resultados semelhantes em ensaios com *E. gracilis*, ao observarem que o cromo afetou os níveis de ácidos graxos, especialmente os relacionados com a atividade fotossintética.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que o cromo, nas condições testadas, afetou o crescimento, a concentração de pigmentos fotossintéticos e a composição bioquímica das algas *P. subcapitata* e *C. vulgaris*. Outra consideração importante é que grande parte do cromo adicionado ao meio de cultura ficou adsorvido ou absorvido pelas células algais, podendo assim ser incorporado na cadeia alimentar.

Neste estudo também foram realizados ensaios com o objetivo de verificar os efeitos do cromo em organismos zooplancônicos quando expostos a diferentes vias de exposição e

contaminação. Para isso foram feitos ensaios ecotoxicológicos crônicos com os organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*, expostos ao cromo nas seguintes condições: meio aquoso contaminado com cromo, alimento contaminado com cromo e a combinação de ambas as situações (meio aquoso e alimento contaminados). Como alimento foram utilizadas as mesmas espécies algais descritas anteriormente, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*.

Os resultados mostraram que o cromo, nas condições testadas, não afetou a sobrevivência de *C. dubia* e *C. silvestrii*, o que era esperado, uma vez que a concentração de cromo utilizada neste estudo ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) estava abaixo da CE_{50} para estas espécies conforme descrito na literatura. Rodgher (2005), por exemplo, encontrou CE_{50} ; 48h de $69 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo para *C. dubia* e Masutti (2004) obteve o valor médio de CE_{50} de $55 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, mas com valores que variaram entre 28 e $111 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. Elnabarawy et al. (1986) obtiveram uma CE_{50} de $195 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo para *C. dubia* e Oliveira-Neto (2000) obteve uma CE_{50} de $60 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo para *C. silvestrii*.

Porém, o cromo afetou a fecundidade dos organismos zooplancctônicos nos tratamentos com meio contaminado (MC) e alimento e meio contaminado (AMC), provocando uma diminuição no número de neonatos produzidos por fêmea. O tratamento com alimento contaminado (AC) não diferiu do tratamento controle. A mesma resposta foi obtida ao avaliar a taxa de alimentação dos organismos zooplancctônicos, pois nos tratamentos MC e AMC houve redução do consumo alimentar de *C. dubia* e *C. silvestrii*.

Dessa maneira, no presente estudo, parece que o meio aquoso foi a principal via de contaminação para os organismos zooplancctônicos em relação à reprodução. Rodgher e Espíndola (2008b) obtiveram resultados semelhantes ao observarem efeitos tóxicos mais pronunciados em *C. dubia* quando exposta ao cromo dissolvido em meio aquoso, comparado à exposição ao metal via alimentação. Para Gulati et al. (1988) a perda de exúvia e muda

periódica dos organismos zooplanctônicos, como os cladóceros, pode levar a uma maior absorção através da superfície do corpo de materiais tóxicos em solução, o que pode aumentar a vulnerabilidade destes animais ao metal. Alguns autores (BAUDIN e FRITSCH, 1989; MILLER et al., 1993; RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008b; BARATA et al., 2002) têm discutido os mecanismos de assimilação de diferentes compostos por organismos aquáticos, sendo observada diferença de assimilação por via aquosa e dietética, com respostas mais acentuadas na exposição aquosa.

Para Handy et al. (2005), a dificuldade na interpretação de experimentos com metal via dieta alimentar surge porque muitos dos princípios fundamentais da ecotoxicologia são derivados de estudos de exposição pela água, assim os processos de exposições via dieta alimentar podem ser diferentes. Para os autores, os padrões de sensibilidade das espécies podem ser diferentes na exposição via água e via dieta alimentar. Além disso, os *endpoints* experimentais apropriados para exposição ao metal via água pode não ser pertinente para a exposição via dieta alimentar. A biodisponibilidade e os processos físicos e químicos dos metais nos alimentos e no trato digestivo dos organismos provavelmente também diferem dos processos que ocorrem na água, com conseqüente efeito sobre a toxicidade.

Desta forma, no presente estudo, apesar da contaminação por cromo via meio aquoso parecer refletir maior toxicidade para *C. dubia* e *C. silvestrii*, os parâmetros avaliados nesta etapa da pesquisa podem não ter sido significativos para avaliar a toxicidade via dieta alimentar. Ainda assim é importante ressaltar que esta via de toxicidade não deve ser negligenciada, uma vez que diversos autores (SOFYAN et al., 2007; GULATI et al., 1988; TAYLOR et al., 1998; RODGHER e ESPÍNDOLA, 2008a e 2008b; MUNGER e HARE, 1997; HOOK e FISHER, 2001; DE SCHAMPHELARE et al., 2004) mostram que a dieta e a exposição combinada (água e alimento contaminado) são toxicologicamente relevantes e podem ser tão importantes como a exposição à água.

Gulati et al. (1988) reforçam esta afirmação ao discutir que os diferentes grupos do zooplâncton tem uma vulnerabilidade diferente para a assimilação de metais via alimentação, estabelecendo uma relação entre o tamanho da partícula alimentar e assimilação do contaminante. Os Cladocera e Copepoda Calanoida, por exemplo, filtram partículas menores de alimentos, quando comparadas ao alimento de Copepoda Cyclopoida, que recolhem partículas maiores. As partículas maiores de alimentos, com menores taxas de crescimento, podem assimilar menos metal, assim a entrada de contaminantes para Cyclopoida via alimentação pode ser menor em comparação com a alimentação de Cladocera. A dieta mais onívora reduz a assimilação de contaminantes comparada a uma dieta de origem fitoplanctônica, diminuindo assim a vulnerabilidade ao material tóxico via alimentação. Os resultados dos autores reforçam a importância desta via de contaminação em estudos de toxicidade e a possibilidade de acumulação de metais ao longo da cadeia alimentar.

Como no presente estudo não foi possível quantificar a concentração de cromo adsorvido ou absorvido por *C. dubia* e *C. silvestrii* após os ensaios de toxicidade, não poderão ser feitas afirmações quanto ao risco de acumulação de cromo por estes organismos.

Outra possível explicação por não ter havido diferença na toxicidade nos tratamentos com alimento contaminado é que a transferência do cromo ao longo da cadeia alimentar alga - dafnídeos não é eficiente. Gorbi e Corradi (1993) e Gorbi et al. (1996) sugeriram que o cromo é acumulado por algas em formas químicas não disponíveis para os organismos de consumo. Jouany et al. (1982) igualmente não observaram uma relação direta na transferência de cromo em experimentos com *D. magna* e *C. vulgaris*. Rodgher e Espíndola (2008b) também não observaram alterações na sobrevivência e fecundidade de *C. dubia* alimentada com *P. subcapitata* previamente exposta a diferentes concentrações de cromo (94 a 380 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Alguns autores (NI et al., 2000; BRICELJ et al., 1994) consideram o cromo inerte quando

associado ao alimento devido à sua baixa assimilação por algumas espécies de invertebrados aquáticos.

Com relação aos resultados obtidos para sobrevivência e fecundidade, dados semelhantes têm sido descritos na literatura. Ghazy e Habashy (2003) obtiveram resultados análogos com *Daphnia magna* ao testar concentrações mais baixas que as utilizadas no presente estudo. Os autores observaram que $17 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo permitiram a sobrevivência, mas afetaram a fecundidade de *D. magna*. Gorbi et al. (2002) observaram efeitos negativos na sobrevivência e fecundidade de *D. magna* na concentração de $14 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo associada a diferentes condições alimentares. Biesinger e Christenses (1972) também observaram redução na reprodução de *D. magna* exposta ao cromo, porém em concentrações maiores ($330 \mu\text{g.L}^{-1}$). Rodgher (2005) observou efeitos significativos na reprodução de *C. dubia* quando exposta a concentração de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo, porém não foram observados efeitos na sobrevivência do organismo.

Com relação à taxa de alimentação de *C. dubia* e *C. silvestrii*, assim como observado no presente estudo, a redução na atividade alimentar de organismos zooplancônicos após a exposição ao cromo tem sido mencionada por diversos autores. Moraitou-Apostolopoulou e Verriopoulos (1982), por exemplo, observaram progressiva redução na capacidade alimentar do copepoda *Acartia clausi* quando exposto a concentrações crescentes de cromo. Ghazy e Habashy (2003) observaram melhor conversão alimentar no crustáceo *Macrobrachium rosenbergii* no tratamento controle quando comparado ao tratamento com cromo. Para outros metais também têm sido descritos resultados semelhantes. Sofyan et al. (2007) realizaram um experimento onde avaliaram o efeito da toxicidade do cádmio na água, no alimento e exposição combinada (água e alimento), utilizando *C. dubia* como organismo-teste. Os autores observaram redução no consumo alimentar do organismo zooplancônico, associando esta resposta com um possível “evitamento ao alimento” ou danos digestivos causados pela

toxicidade. Taylor et al. (1998) também observaram que a ingestão de células de *C. vulgaris* contaminada com cádmio foi inibida, levando à redução da reprodução de *Daphnia magna*. Os autores sugeriram alguns mecanismos que podem estar ligados à diminuição do consumo alimentar, como interferência no processo de alimentação por inibição da filtração ou nos apêndices torácicos, ou a rejeição do alimento pelo animal. Outra possibilidade é que as células algais contaminadas são recolhidas e ingeridas normalmente, mas o contaminante interfere na digestão.

Para alguns autores (ALLEN et al., 1995; TAYLOR et al., 1998; BAILLIEUL e BLUST, 1999; MOORE e FOLT, 1993) a redução na ingestão de alimentos induzida por contaminantes pode acarretar consequências nas populações zooplancônicas, como reduzida reprodução ou vulnerabilidade à predação, alterações na transparência da água e nas taxas de regeneração de nutrientes e, em última análise, alteração do tamanho da população de invertebrados e vertebrados predadores. Jak et al. (1996) destacaram este problema ao demonstrar que níveis subletais de contaminantes no ambiente aquático pode promover a eutrofização pela inibição tóxica das taxas de pastagem de cladóceros.

Para Taylor et al. (1998) a redução da taxa de alimentação em consumidores primários pode resultar em mudanças profundas na população, uma vez que sobrevivência, reprodução e o crescimento da população são dependentes da entrada de energia nos animais. Para Rodgher (2005), concentrações não letais de um tóxico que afetam a alimentação de um organismo são prováveis de ocasionar consequências na história de vida do indivíduo (menor crescimento, fecundidade e longevidade reduzida), sendo que estes efeitos serão refletidos nas relações com outros organismos que deles dependam.

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo foi possível observar os efeitos tóxicos do cromo para *C. dubia* e *C. silvestrii*. A redução da fecundidade e da taxa alimentar dos organismos pode estar relacionada aos efeitos diretos do cromo em células alvos ou

tecidos responsáveis pela produção de ovos, por exemplo. Efeitos indiretos também seriam esperados, pois a perturbação no processo de filtração poderia ter implicações negativas sobre o crescimento e a fecundidade dos organismos.

Para uma melhor compreensão dos possíveis efeitos tóxicos do cromo nas populações e na interação trófica de organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos, ainda no presente estudo foram realizados experimentos para avaliar o conteúdo de proteína, carboidrato e lipídeos, bem como a taxa de crescimento populacional dos organismos-teste *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostos simultaneamente à água e alimento contaminados com cromo. Ressalta-se que a partir dos resultados gerados na etapa II, optou-se por nesta etapa avaliar somente o “pior cenário” e possivelmente o de melhor representação ambiental, ou seja, quando os organismos zooplanctônicos estão expostos tanto ao meio aquoso contaminado como ao alimento contaminado (simultaneamente).

Conforme já discutido anteriormente, os ensaios ecotoxicológicos realizados com as algas *P. subcapitata* e *C. vulgaris* (etapa I desta pesquisa) demonstraram que o cromo afetou a composição bioquímica destas espécies algais, assim um dos objetivos da etapa III foi avaliar como essas alterações refletiriam em seus consumidores. Segundo Brown e Miller (1992), o valor nutricional de uma espécie de alga é dependente de diversas características, incluindo forma, tamanho, digestibilidade e toxicidade. No entanto, o fator primário determinante para estabelecer a qualidade do alimento transferido para os demais níveis tróficos da cadeia alimentar parece ser a composição bioquímica das algas.

Com relação ao zooplâncton, estes organismos desempenham um papel importante nas cadeias tróficas dos ecossistemas aquáticos, contribuindo de forma significativa para o fluxo de matéria e energia dos produtores primários para os consumidores maiores (ABRANTES e GONÇALVES, 2003). Quando o zooplâncton vive em boas condições de alimentação e cultivo uma quantidade maior de energia é alocada em reprodução, enquanto que, quando eles

estão em condições de estresse, a energia é principalmente alocada em sobrevivência e manutenção do metabolismo (SANTOS et al., 2006; DE COEN e JANSSEN, 2003).

Alterações nas funções bioquímicas e fisiológicas de um organismo podem ser tomadas como a primeira indicação que mostra o efeito da perturbação ambiental. Estas alterações podem ser utilizadas como indicadores rápidos e sensíveis ao estresse tóxico e pode ajudar a explicar outras alterações observadas na sobrevivência, crescimento e reprodução de organismos-teste (GHAZY e HABASHY, 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram alterações significativas na taxa de crescimento populacional (r) e no conteúdo bioquímico de *C. dubia* e *C. silvestrii* expostas ao tratamento com água e alimento contaminados com cromo. A redução da taxa r era esperada, uma vez que na etapa anterior deste estudo já havia sido observado diminuição na fecundidade de *C. dubia* e *C. silvestrii* quando exposta ao cromo. Wong (1993) também observou redução na taxa de crescimento populacional após exposição ao cromo, utilizando *Moina macrocopa* como organismo-teste.

Com relação à composição bioquímica, foi observado um aumento significativo no conteúdo de proteínas, carboidratos e lipídeos de *C. dubia* e *C. silvestrii* no tratamento com água e alimento contaminados com cromo. Ghazy e Habashy (2003) também observaram aumento de lipídeos em *D. magna* em concentrações crescentes de cromo, porém relataram redução no conteúdo de proteínas. De Coen e Janssen (2003) obtiveram resultados semelhantes, em experimentos com *D. magna* exposta ao cromo, ao observarem aumento no conteúdo de carboidratos e proteínas na concentração de $0,056 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo, porém a concentração de lipídeos foi reduzida. Para os autores o tratamento com cromo provocou decréscimo no consumo de energia, sendo uma alocação energética negativa para os organismos.

O aumento no conteúdo de proteínas é esperado sob condições de estresse tóxico (MOORE e FOLT, 1993). As razões para o aumento desta biomolécula na exposição aos metais não são claras, mas possivelmente estão relacionadas à dinâmica molecular dos animais, tais como aquelas que envolvem os efeitos de indução de enzimas formadoras de proteína foram alteradas, provocando assim um aumento geral no metabolismo das proteínas (BIESINGER e CHRISTENSES, 1972). Para Callow (1991), a síntese de proteínas de proteção pode ser induzida para neutralizar a toxicidade de compostos químicos. Pook et al. (2009) relacionam o aumento na produção de proteínas com mecanismos envolvidos na desintoxicação e resistência ao metal.

No presente estudo, as alterações no conteúdo bioquímico de *C. dubia* e *C. silvestrii* podem estar diretamente relacionadas com redução na taxa de crescimento populacional e com os efeitos tóxicos observados na etapa anterior, como a redução da fecundidade e taxa alimentar. Calow (1991) e Pook et al. (2009) sugerem que o estresse tóxico induz troca metabólica em um organismo, resultando em efeitos adversos no crescimento e reprodução.

Em geral, a fração lipídica é mobilizada para manter a homeostase durante a exposição tóxica (DE COEN e JANSSEN, 2003). Elendt (1989) sugeriu que em dafnídeos adultos a parte principal da fração lipídica está envolvida na produção de ovos. Se, devido ao estresse tóxico, o *status* de lipídeos de uma fêmea é alterado, um mecanismo de compensação pode existir entre a sobrevivência da mãe e o número total de descendentes produzidos (DE COEN e JANSSEN, 1997). Para os autores, essa alteração poderá refletir na dinâmica populacional da espécie. Lynch e Ennis (1983) demonstraram que a alteração lipídica teve efeitos duradouros sobre o crescimento, reprodução e sobrevivência de *D. magna* por duas gerações.

Alguns estudos (GOULDEN e PLACE, 1993; DEIBEL et al., 2012; CONNELLY et al., 2012) têm indicado que a maior parte da composição lipídica de organismos zooplancctônicos consiste em lipídeos de armazenamento (triglicerídeo e éster de cera) e

lipídeos estruturais (esterol e fosfolipídeos), variando entre os diferentes grupos taxonômicos. Para Goulden e Place (1993) grande parte dos lipídeos é transferida para os ovários e depois para os ovos, sendo utilizados no desenvolvimento de embriões. Esta gema pós-embrionária provavelmente representa uma importante fonte de energia para os neonatos, que os permite sobreviver num período crucial de desenvolvimento, quando o neonato deve encontrar alimento e iniciar o processo alimentar e digestivo.

Assim, no presente estudo, este acúmulo de lipídeos observado no tratamento com água e alimento contaminados com cromo, pode estar diretamente relacionado com a redução da fecundidade. Uma vez que *C. dubia* e *C. silvestrii* tiveram a reprodução diminuída, esta alocação de lipídeos para ovos e embriões pode ter sido diminuída, causando um acúmulo de lipídeos nos organismos.

Outro fator relacionado com este aumento na concentração de lipídeos no tratamento com água e alimento contaminados com cromo é a dieta alimentar do organismo zooplanctônico, pois é reconhecido que grande parte dos lipídeos do zooplâncton é oriunda do alimento ingerido (GOULDEN e PLACE, 1900 e 1993; ZHUKOVA et al., 1998).

Para Goulden e Place (1993) pelo menos 98% dos lipídeos presentes em dafinídeos são derivados da dieta alimentar e apenas 2% dos lipídeos acumulados são sintetizados pelo organismo. Assim, no presente estudo, apesar de ter sido observado redução da taxa alimentar de *C. dubia* e *C. silvestrii* no tratamento com cromo, também foi verificado que a alga *P. subcapitata*, utilizada como alimento, acumulou lipídeos após exposição ao cromo (conforme descrito na etapa I deste estudo). Assim, este maior conteúdo de lipídeos nos organismos zooplanctônicos pode estar relacionado com a ingestão de células algais com maior conteúdo de lipídeos, quando comparado ao tratamento controle, que recebeu alimento sem exposição previa ao metal e, portanto, com menor concentração de lipídeos.

Os resultados do presente estudo permitiram avaliar a toxicidade do cromo em organismos fitoplanctônicos e zooplanctônicos e como as relações entre estas populações poderiam ser alteradas na presença do contaminante. Foi possível observar inibição do crescimento e alterações na concentração de pigmentos fotossintéticos nos organismos fitoplanctônicos e redução da fecundidade e do crescimento populacional, além de alterações na taxa alimentar dos organismos zooplanctônicos. O acúmulo de biomoléculas por *P. subcapitata* e *C. vulgaris* e por *C. dubia* e *C. silvestrii* nos tratamentos contaminados com cromo evidenciaram uma alocação de energia nestes organismos, que pode estar diretamente relacionado com os efeitos tóxicos já descritos, como redução de crescimento nas algas e redução da fecundidade no zooplâncton. Essas alterações observadas também podem estar relacionadas com um mecanismo de sobrevivência nas condições de estresse provocadas pelo cromo.

Verificou-se, ainda, que grande parte do cromo adicionado ao meio de cultura ficou adsorvido ou absorvido nas células algais, mas não foi possível avaliar se este acúmulo de metais nas células algais reflete efeitos tóxicos no zooplâncton. Talvez os *endpoints* utilizados neste estudo não tenham sido representativos para avaliar os efeitos da contaminação por cromo, via deita alimentar, em organismos zooplanctônicos, ou ainda a forma química do cromo quando ingerido pelo zooplâncton possa ser inerte para este organismo.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que:

- 1) Nos ensaios ecotoxicológicos realizados com as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, verificou-se inibição do crescimento celular de ambas as espécies e redução na biomassa seca de *P. subcapitata* na presença do cromo;
- 2) O cromo, nas condições testadas, reduziu a concentração de clorofila *a* da alga *P. subcapitata*, promoveu um aumento no conteúdo de feofitina de *P. subcapitata* e *C. vulgaris*, e causou alterações na concentração de carotenoides de ambas as espécies. Além disso, verificou-se um estresse bioquímico em ambas as espécies, gerando um aumento na concentração de proteínas, carboidratos e lipídeos totais.
- 3) Com relação à composição lipídica, as classes mais afetadas, após a exposição ao cromo, foram os lipídeos relacionados com a clorofila e com a integridade das membranas celulares, como os lipídeos polares móveis em acetona, fosfolipídeos e ácidos graxos livres.
- 4) Nos ensaios ecotoxicológicos realizados com os organismos zooplancônicos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* não se verificou alteração na sobrevivência das espécies nos diferentes tratamentos com cromo. No entanto, nos tratamentos com meio aquoso contaminado com cromo e exposição combinada (meio aquoso e alimento contaminados com cromo) houve redução na fecundidade de *C. dubia* e *C. silvestrii* e diminuição da taxa alimentar destes organismos.
- 5) O tratamento somente com alimento contaminado com cromo não diferiu do tratamento controle, enquanto que o tratamento de exposição combinada (meio aquoso e alimento contaminados com cromo) foi estatisticamente igual ao tratamento com meio aquoso

contaminado. Dessa maneira, parece que o meio aquoso, nas condições testadas, foi a principal via de contaminação para os organismos zooplanctônicos.

- 6) A redução da fecundidade e da taxa alimentar de *C. dubia* e *C. silvetrii* podem estar relacionada aos efeitos diretos do cromo em células ou tecidos alvos. Efeitos indiretos também seriam esperados, pois a perturbação no processo de filtração poderia ter implicações negativas sobre o crescimento e a fecundidade dos organismos.
- 7) Nos ensaios ecotoxicológicos para avaliar o efeito do cromo no conteúdo bioquímico e na taxa de crescimento populacional de *C. dubia* e *C. silvetrii*, verificou-se redução no crescimento populacional e aumento de proteínas e lipídeos totais em ambas as espécies quando estas foram submetidas ao tratamento com água e alimento contaminados com cromo. O acúmulo de biomoléculas, provocado pelo estresse tóxico, pode estar relacionado com mecanismos de resistência e compensação dos organismos zooplanctônicos ou ainda diretamente relacionado com a redução da fecundidade e crescimento populacional.
- 8) Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que o cromo, nas condições testadas, foi tóxico tanto para as espécies fitoplanctônicas como zooplanctônicas, podendo causar alterações nas cadeias tróficas dos ecossistemas aquáticos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, N.; GONÇALVES, F. The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. **Acta Oecologica**, 24: 245-249, 2003.

AFKAR, E.; ABABNA, H.; FATHI, A.A. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris*, to some heavy metals. **American Journal of Environmental Sciences**, 6(3): 230-237, 2010.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for chromium. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov>. Acesso em 01 de outubro de 2009.

ALI, N.A.; DEWEZ, D.; DIDUR, O.; POPOVIC, R. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex. **Photosynthesis Research**, 89: 81-87, 2006.

ALLEN, Y.; CALOW, P.; BAIRD, D.J. A mechanistic model of contaminant induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 14: 1625-1630, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for Examination Water and Wastewater**. 19th ed. Washington: DC, 1995. 1368p.

ARAÚJO, A.C.P.; NOGUEIRA, D.P.; AUGUSTO, L.G.S. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Saúde Pública**, 34(3): 309-313, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia* ssp (Cladocera, crustácea). Rio de Janeiro, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática - toxicidade crônica - método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011.

BABA, M.; SHIRAIWA, Y. Biosynthesis of lipids and hydrocarbons in algae. 2013. Ed. Zvy Dubinsky. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/56413>. Acesso em 14 de março de 2014.

BAGCHI, D. et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology**, 180: 5-22, 2005.

BAILLIEUL, M.; BLUST, R. Analysis of the swimming velocity of cadmium stressed *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, 44: 245-254, 1999.

BAIRD, C. **Environmental chemistry**. New York: Freeman and Company. 1998.

BARATA, C.; MARKICH, S.J.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Strauss. **Aquatic Toxicology**, 61 (3-4): 143-154, 2002.

BAUDIN, J.P.; FRITSCH, A.F. Relative contributions of food and water in the accumulation of ^{60}Co by freshwater fish. **Water Research**, 23(7): 817-823, 1989.

BIESINGER, K.E.; CHRISTENSES, G.M. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. **Journal Fisheries Research Board of Canada**, 29(12): 1691-1700, 1972.

BIRCH, L.C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **Journal of Animal Ecology**, 17:15-26, 1948.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BRASIL. Ministerio do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, nº 053, de 18 mar. 2005, pg. 58-63.

BRICELJ, V.M.; BASS, A.E.; LOPEZ, G.R. Absorption and gut passage time of microalgae in a suspension feeder: an evaluation of the ^{51}Cr : ^{14}C twin tracer technique. **Marine Ecology - Progress Series**, 17: 57-63, 1984.

BROWN, M.R.; MILLER, K.A. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in marine culture. **Journal of Applied Phycology**, 4: 205-215, 1992.

BRULAND, K.W.; DONAT, J.R.; HUTCHINS, D.A. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. **Limnology and Oceanography**, 36(8): 1555-1577, 1991.

CALLENDER, E. Heavy metals in the environment- historical trends. In: Lollar, B.S. **Treatise on geochemistry- Environmental Geochemistry**. 9. Spain: Elsevier Pergamon. 67-105p. 2004.

CALOW, P. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 100(1-2): 3-6, 1991.

CERVANTES, C. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, 25: 335-347, 2001.

CHIA, M.A.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.M. Cadmium, nitrogen and phosphorus induced changes in growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), 2012. In press.

CHIA, A.M.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.M.; PARRISH, C.C. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphorus concentrations. **Aquatic Toxicology**, 128-129: 171-182, 2013a.

CHIA, A.M.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.M.; PARRISH, C.C. Effect of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, 48: 1-11, 2013b.

CONNELLY, T.L.; DEIBEL, D.; PARRISH, C.C. Elemental composition, total lipid content, and lipid class proportions in zooplankton from the benthic boundary layer of the Beaufort Sea shelf (Canadian Arctic). **Polar Biology**, 35: 941-957, 2012.

COUGWLAN, J. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. **Marine Biology**, 2: 356-358, 1969.

CZERPAK, R.; PIOTROWSKA, A.; SZULECKA, K. Jasmonic acid affects changes in the growth and some components content in *Chlorella vulgaris*. **Acta Physiologiae Plantarum**, 28(3): 195-203, 2006.

DE COEN, W.M.; JANSSEN, C.R. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: A new biomarker to assess the energy budget of toxicant-

stressed *Daphnia* populations. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6: 43-55, 1997.

DE COEN, W.M.; JANSSEN, C.R. The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22(7): 1632-1641, 2003.

DEIBEL, D. et al. Lipid class and fatty acid content of the *Leptocephalus* larva of tropical eels. **Lipids**, 47: 623-634, 2012.

DE SCHAMPHELAERE, K.A.C.; JANSSEN, C.R. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23(8): 2038-2047, 2004.

EBRAHIMPOUR, M.; MUSHRIFAH, I. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. **Environmental Geology**, 54: 689-698, 2008.

EINICKER-LAMAS, M.; SOARES, M.J.; SOARES, M.S.; OLIVEIRA, M.M. Effects of cadmium on *Euglena gracilis* membrane lipids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 29(8): 941-948, 1996.

EINICKER-LAMAS, M. et al. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. **Environmental Pollution**, 120: 779-786, 2002.

ELENDT, B.P. Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*. **Archiv für Hydrobiologie**, 116: 415-433, 1989.

ELNABARAWY, M.T.; WELTER, A.N.; ROBIDEAU, R.R. Relative sensitivity of three daphnid species to selected organic and inorganic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 5(4): 393-398, 1986.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 12(3): 347-354, 2008.

GHAZY, M.M.; HABASHY, M.M. Experimental toxicity of chromium to two freshwater crustaceans; *Daphnia magna* and *Macrobrachium rosenbergii*. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, 7(3): 49-70, 2003.

GOULDEN, C.E.; PLACE, A.R. Fatty acid synthesis and accumulation rates in Daphniids. **The Journal of Experimental Zoology**, 256: 168-178, 1990.

GOULDEN, C.E.; PLACE, A.R. Lipid accumulation and allocation in Daphniid Cladocera. **Bulletin of Marine Science**, 53(1): 106-114, 1993.

GORBI, G.; CORRADI, M.G. Chromium toxicity on two linked trophic levels. I. Effects of contaminated algae on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 25(1): 72-78, 1993.

GORBI, G.; CORRADI, M.G.; TORELLI, A.; BASSI, M. Comparison between a normal and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* as a food source to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 35: 109-111, 1996.

GORBI, G. et al. Is Cr(VI) toxicity to *Daphnia magna* modified by food availability or algal exudates? The hypothesis of a specific chromium/algae/exudates interaction. **Water Research**, 36: 1917-1926, 2002.

GULATI, R.D. et al. Effects of cadmium exposure on feeding of freshwater planktonic crustaceans. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 90(2): 335-340, 1988.

GUSCHINA, I.A.; HARWOOD, J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, 45: 160-186, 2006a.

GUSCHINA, I.A.; HARWOOD, J.L. Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. **Phytochemistry**, 67: 1731-1739, 2006b.

HAN, F.X. et al. Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. **Naturwissenschaften**, 89: 497-504, 2002.

HANDY et al. Toxic effects of dietborne metals: laboratory studies In: MEYER, J.S. et al. **Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms**. Setac: Pensacola, 2005. 291p. p. 59-98.

HANEDA. R.N.; et al. (dados não publicados) A novel design of photobioreactor for microalgae cultivation.

HARISH, V. et al. Assessing the effect of leachate of copper slag from the ISASMELT process on cell growth and proximate components in microalgae, *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). **Toxicological & Environmental Chemistry**, 93(7): 1399-1412, 2011.

HOOK, S.E.; FISHER, N.S. Sublethal effects of silver in zooplankton: importance of exposure pathways and implications for toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20(3): 568-574, 2001.

HÖRCSIK, Z.T.; BALOGH, A. Intracellular distribution of chromium and toxicity on growth in *Chlorella pyrenoidosa*. **Acta Biologica Szegediensis**, 46(3-4): 57-58, 2002.

HÖRCSIK, Z.T. et al. Effect of Chromium(VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. **Acta Biologica Szegediensis**, 50(1-2): 19-23, 2006.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, 54: 621-639, 2008.

JAK, R.G.; MAAS, J.L. SCHOLTEN, M.C.T. Evaluation of laboratory derived toxic effect concentrations of a mixture of metals by testing fresh water plankton communities in enclosures. **Water Research**, 30(5): 1215-1227, 1996.

JOUANY, J.M.; VASSEUR, P.; FERARD, J.F. Ecotoxicité directe et intégrée du chrome hexavalent sur deux niveaux trophiques associés: *Chlorella vulgaris* et *Daphnia magna*. **Environmental Pollution** (Series A), 27(3): 207-221, 1982.

JUNEJA, A.; CEBALLOS, R.M.; MURTHY, G.S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. **Energies**, 6: 4607-4638, 2013.

KHAN, R.; ISRAILI, S.H.; AHMAD, H.; MOHAN, A. Heavy metal pollution assessment in surface water bodies and its suitability for irrigation around the Neyevli lignite mines and associated industrial complex, Tamil Nadu, India. **Mine Water and the Environment**, 24: 155-161, 2005.

KOTÁS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. **Environmental Pollution**, 107: 263-283, 2000.

KRENKEL, P.A. **Heavy metals in the aquatic environment**. Pergamon Press: Oxford. 488p. 1973.

KÜPPER, H. et al. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**, 38(3): 429-441, 2002.

LANO, R.P.; HICKIE, B.E.; DIXON, D.G. Feeding and nutritional considerations in aquatic toxicology. **Hydrobiologia**, 188-189: 527-531, 1989.

LASHEEN. M.R. et al. Effect of cadmium, copper and chromium (VI) on the growth of Nile water algae. **Water, Air, and Soil Pollution**, 50: 19-30, 1990.

LEMES, M.J.L. **Avaliação de metais e elementos-traço em águas e sedimentos das bacias hidrográficas dos Rios Mogi-Guaçu e Pardo, São Paulo**. 2001. 215p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares – Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 215p.

LIMA, P.C.G. **Estudo dos mecanismos de detoxificação e tolerância aos metais cromo e cobre em *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Pistia stratiotes* e o uso das macrófitas *Typha* sp e *Phragmites* sp na remoção de nutrientes em wetlands construídos**. 2010. 263p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. 236p.

LIU, D.; WONG, P.T.S.; DUTRA, B.J. Determination of carbohydrate in Lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. **Water Research**, 7: 741-746, 1973.

LOMBARDI, A.T; VIEIRA, A.A.H. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. **Phycologia**, 39: 118-125, 2000.

LOMBARDI, A.T.; WANGERSKY, P.J. Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. **Hydrobiologia**, 306: 1-6, 1995.

LORENZEN, C.J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, 12: 343-346, 1967.

LYNCH, M.; ENNIS, R. Resource availability, maternal effects and longevity. **Experimental Gerontology**, 18(2): 147-165, 1983.

MACGRATH, S.P.; SMITH, S. Chromium and nickel. In: ALLOWAY, B.J. (Ed.) **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, Inc., cap 7, 1990.p.125-150.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55: 64-69. 2003.

MARGALEF, R. El ecosistema. In: **Ecologia marine**. Fundación La Salle de Ciencias Naturales: Caracas: 1967. p 377-453.

MASUTTI, M. B. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e “in situ” (experimentos em micro e mesocosmos)**. 2004. 390p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004. 390p.

McLARNON-RICHES, C.J. ROLPH. C.E.; GREENWAY, D.L.A.; ROBINSON, P.K. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. **Phytochemistry**, 49(5): 1241-1247, 1998.

MILLER, P.A.; LANNO, R.P.; McMASTER, M.E.; DIXON, D.G. Relative contributions of dietary and waterborne copper to tissue copper burdens and waterborne-copper tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 50(8): 1683-1689, 1993.

MONTEIRO, M.T.; OLIVEIRA, R.; VALE, C. Metal stress on the plankton communities of Sado River (Portugal). **Water Research**., 29: 695–701. 1995.

MOORE, J.W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters**. Applied monitoring and impact assessment. Springer-Verlag. 268p. 1947.

MOORE, M.; FOLT, C. Zooplankton body size and community structure: effects of thermal and toxicant stress. **Tree**, 8(5): 178-183, 1993.

MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M.; VERRIOPOULOS, G. Toxicity of chromium to the marine planktonic copepod *Acartia clausi*, Giesbrecht. **Hydrobiologia**, 96: 121-127, 1982.

MUNAWAR, M.; MUNAWAR, I.F.; LEPPARD, G.G. Early warning assays: an overview of toxicity testing with phytoplankton in the North American Great Lakes. **Hydrobiologia**, 188-189: 237-246, 1989.

MUNGER, C.; HARE, L. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. **Environmental Science & Technology**, 31(3): 891-895, 1997.

MURATA, N.; AIEGENTHALER, P.A. Lipids in photosynthesis: an overview. In: SIEGENTHALER, P.A.; MURATA, N. (Eds.) **Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetic**. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1998. pp. 1-20.

NACORDA, J.O.O.; MARTINEZ-GOSS, M.R.; TORRETA, N.K.; MERCA, F.E. Metal resistance and removal by two strains of the green alga, *Chlorella vulgaris* Beijerinck, isolated from Laguna de Bay, Philippines. **Journal of Applied Phycology**, 19(6): 701-710, 2007.

NACORDA, J.O.O.; MARTINEZ-GOSS, M.R.; TORRETA, N.K. Bioremoval and Bioreduction of Chromium (VI) by the Green Microalga, *Chlorella vulgaris* Beij., Isolated from Laguna de Bay, Philippines. **Philippine Journal of Science**, 139(2):. 181-188, 2010.

NICHOLS, P.B.; COUCH, J.D.; AL-HAMDANI, S.H. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. **Aquatic Botany**, 68: 313-319, 2000.

NI, I.H.; WANG, W.X.; TARN, Y.K. Transfer of Cd, Cr and Zn from zooplankton prey to mudskipper *Periophthalmus cantonensis* and glassy *Ambassis urotaenia* fishes. **Marine Ecology Progress Series**, 194: 203-210, 2000.

NOGUEIRA, P.F.M. **Interação entre a matéria orgânica natural, o cobre e microorganismos heterotróficos: implicações na dinâmica do metal e sua disponibilização para a biota aquática**. 2007. 163p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007. 163p.

NRIAGU, J.O.; NIEBOER, E. **Chromium in the natural and human environments**. Ontario: Wiley Inter-Science, 1988.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archiv für Hydrobiologie**, 14: 14-36, 1980.

OLIVEIRA NETO, A.L. **Toxicidade de alguns metais pesados (Cd, Cr e Pb) em organismos planctônicos lacustres da região subtropical**. 2000. 91p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos -Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000. 91p.

OMAR. H.H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 50: 95-100, 2002.

OSMAN, M.E.H.; EL-NAGGAR, A.H.; EL-SHEEKH, M.M.; EL-MAZALLY, E.E. Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 16: 169-178, 2004.

PARRISH, C.C.; WANGERSKY, P.J. Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. **Marine Ecology - Progress Series**, 35: 119-128, 1987.

PARRISH, C.C. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: ARTS, M.T.; WAINMAN, B.C. (Eds). **Lipids in freshwater ecosystems**. Springer-Verlag, New York, 1999. p. 4-20.

PARSONS, T.R.; MAITA, Y.; LALLI, C.M. **A manual of chemical and biological methods for seawater analysis**. Pergamon Press, Oxford, 1984. 173p.

PEMPKOWIAK, J.; KOSAKOWSKA, A. Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgais* in the presence of marine humic substances. **Environment International**, 24(6): 583-588. 1998.

PEÑA-CASTRO, J.M.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. **Chemosphere**, 57(4): 1629-1636, 2004.

PFLEEGER, T. et al. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: GORSUCH, J.W. et al. **Plants for toxicity assessment**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2: 355-364. 1991.

PINTO, E.; et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, 39: 1008-1018, 2003.

POOK, C.; LEWIS, C.; GALLOWAY, T. The metabolic and fitness costs associated with metal resistance in *Nereis diversicolor*. **Marine Pollution Bulletin**, 58: 1063-1071, 2009.

RAI, U.N.; TRIPATHI, R.D.; KUMAR, N. Bioaccumulation of chromium and toxicity on growth, photosynthetic pigments, photosynthesis, in vivo nitrate reductase activity and protein content in a Chlorococcalean green alga *Glaucocystis nostochinearum* Itzigsohn. **Chemosphere**, 25(1): 1721-1732, 1992.

RAI, U.N.; SINGH, N.K.; UPADHYAY, A.K.; VERMA, S. Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L.: Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. **Bioresource Technology**, 136: 604-609, 2013.

RAI, V.; MEHROTRA, S. Chromium-induced changes in ultramorphology and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn - an hepatoprotective plant. **Environmental Monitoring and Assessment**. 147: 307-315, 2008.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere, New York, 1985. 65p. p 1-28.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Washington: Taylor & Francis, 1995. p 3-66.

RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. **Hidrobiologia**, 78: 237-251, 1981.

ROCCHETTA, I.; RUIZ, L.B.; MAGAZ, G.; CONFORTI, V.T.D. Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 70: 1045-1051, 2003.

ROCCHETTA, I. et al. Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. **Environmental Pollution**, 141: 353-358, 2006a.

ROCCHETTA, I. RUIZ, L.B.; MOLINA, M.C.R; CONFORTI, V. Chromium toxicity to *Euglena gracilis* strains depending on the physicochemical properties of the culture medium. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 76:512-521, 2006b.

RODGHER, S. **Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos dos metais cádmio e cromo em organismos planctônicos**. 2005. 251p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos -Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. 251p.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, ELG. Effects of interactions between algal densities and cadmium concentrations on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 71: 765-773, 2008a.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, ELG. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for *Ceriodaphnia dubia* Richard (Cladocera, Crustacea). **Brazilian Journal of Biology**, 68(2): 341-348, 2008b.

RODGHER, S.; LOMBARDI, A.T.; MELÃO, M.G.G.; TONIETTO, A.E. Change in life cycle parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. **Ecotoxicology**, 17: 826-833. 2008.

RODRÍGUEZ, M.C et al. Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Research**, 105: 234-239, 2007.

ROMERO, Y.; LODEIROS, C.; ESCLAPÉS, M.; MARÍN, N.; GUEVARA, M.; MORALES, E. Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas. **Interciencia**, 27(3): 104-109. 2002.

SANTOS, M.A.P.F.; MELÃO, M.G.G.; LOMBARDI, A.T. Life history characteristics and production of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) under different experimental conditions. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 18(2): 199-212, 2006.

SELA, M.; GARTY, J.; TEL-OR, E. The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. **New Phytologist**, 112: 7-12, 1989.

SHEHATA, S.A.; BADR, S.A. Growth response of *Scenedesmus* to different concentrations of copper, cadmium, nickel, zinc, and lead. **Environment International**, 4: 431-434. 1980.

SILVA, C.S.; PEDROZO, M.F.M. Ecotoxicologia do cromo e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, 5. Salvador. 2001.

SINGHVI, P.; CHHABRA, M. Simultaneous chromium removal and power generation using algal biomass in a dual chambered salt bridge microbial fuel cell. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, 4(5), 2013.

SOFYAN, A.; PRICE, D.J.; BIRGE, W.J. Effects of aqueous, dietary and combined exposures of cadmium to *Ceriodaphnia dubia*. **Science of the Total Environment**, 385: 108-116, 2007.

SOUZA, I.M.M. (2011) **A influência do fósforo na toxicidade de cobre e composição bioquímica de *Chlorella vulgaris***. 2011. 54p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. 54p.

STAUBER, J.L.; FLORENCE, T.M. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. **Marine Biology**, 94: 511-519, 1987.

TAYLOR, G.; BAIRD, D.J.; SOARES, A.M.V.M. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17(3): 412-419, 1998.

TERRY, P.A., STONE, W. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. **Chemosphere**, 47: 249-255, 2002.

TUKAJ, Z.; BAŚCIK-REMISIEWICZ, A.; SKOWROŚNSKI, T.; TUKAJ, C. cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. **Environmental and Experimental Botany**, 60: 291-299, 2007.

ÜNAL, D.; İŞIK, N.O.; SUKATAR, A. Effects of chromium VI stress on green alga *Ulva lactuca* (L.). **Turkish Journal of Biology**, 34: 119-124, 2010.

VAJPAYEE, P. et al. Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. **Chemosphere**, 39: 2159-2169, 2000.

VAN-LOON, J.C. **Select methods of trace metal analysis**. United States: Ed. John Wiley Interscience. 1985.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, 27(1): 139-145, 2004.

VOLLAND, S.; LÜTZ, C.; MICHALKE, B.; LÜTZ-MEINDL, U. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. **Aquatic Toxicology**, 109: 59-69, 2012.

VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton, CRC. 1990.

WILSON, G.; AL-HAMDANI, S.H. Effects of chromium(VI) and humic substances on selected physiological responses of *Azolla caroliniana*. **American Fern Journal**, 87: 17-27, 1997.

WIUM-ANDERSEN, S. The effect of chromium on the photosynthesis and growth of diatoms and green algae. **Physiologia Plantarum**, 32(4): 308-310, 1974.

WONG, C.K. Effects of chromium, copper, nickel, and zinc on longevity and reproduction of the Cladoceran *Moina macrocopa*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 50: 633-639, 1993.

WONG, P.K.; CHANG, L. Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. **Environmental Pollution**, 72: 127-139, 1991.

WU, J.; SELISKAR, D.M.; GALLAGHER, J.L. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress. **American Journal of Botany**, 92(5): 852-858, 2005.

YU, R.Q.; WANG, X.W. Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, 129: 443-456, 2004.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, 606: 135-150. 2008.

ZHUKOVA, N.V.; IMBS, A.B.; YI, L.F. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)**, 120: 499-506, 1998.

ANEXO

Tabela 1: Teste de significância da diferença entre as médias da densidade celular de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Densidade *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 3920000.0000  CALCULATED t VALUE = 6.0417
GRP2 (CROMO) MEAN = 2436666.6667  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 1483333.3333
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 2: Teste de significância da diferença entre as médias da densidade celular de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Densidade *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 516666.6667  CALCULATED t VALUE = 6.3728
GRP2 (CROMO) MEAN = 326666.6667  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 190000.0000
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 3: Teste de significância da diferença entre as médias da biomassa seca de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Biomassa *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION

t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 20.3333 CALCULATED t VALUE = 4.8107
GRP2 (CROMO) MEAN = 14.3333 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 6.0000
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 4: Teste de significância da diferença entre as médias da biomassa seca de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Biomassa *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION

t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 50.6667 CALCULATED t VALUE = 0.6138
GRP2 (CROMO) MEAN = 47.6667 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 3.0000
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776 NO significant difference at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604 NO significant difference at alpha=0.01

Tabela 5: Teste de significância da diferença entre as médias da clorofila *a* de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Clorofila *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION

t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.1100 CALCULATED t VALUE = 6.1017
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.0367 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 0.0733
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 6: Teste de significância da diferença entre as médias da clorofila *a* de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Clorofila *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION

t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.1967 CALCULATED t VALUE = 1.2403
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.1633 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 0.0333
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776 NO significant difference at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604 NO significant difference at alpha=0.01

Tabela 7: Teste de significância da diferença entre as médias da concentração de feofitina de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Feofitina *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.0213  CALCULATED t VALUE = -57.5535
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.0820  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.0607
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 8: Teste de significância da diferença entre as médias da concentração de feofitina de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Feofitina *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.0333  CALCULATED t VALUE = -7.0711
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.0667  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.0333
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 9: Teste de significância da diferença entre as médias da concentração de carotenoide de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Carotenoide *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.0575  CALCULATED t VALUE = 5.0000
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.0200  DEGREES OF FREEDOM = 6
DIFFERENCE IN MEANS = 0.0375
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 6) = 2.447** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 6) = 3.707** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 10: Teste de significância da diferença entre as médias da concentração de carotenoide de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Carotenoide *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.0667  CALCULATED t VALUE = -6.0104
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.1233  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.0567
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 11: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo intracelular de proteína de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Proteína *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 1.7333 CALCULATED t VALUE = -6.1812
GRP2 (CROMO) MEAN = 3.2333 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -1.5000
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 12: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo intracelular de proteína de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Proteína *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 8.5667 CALCULATED t VALUE = -7.1753
GRP2 (CROMO) MEAN = 21.1000 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -12.5333
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 13: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo intracelular de carboidrato de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Carboidrato *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION

t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 3.6333 CALCULATED t VALUE = -10.7331
GRP2 (CROMO) MEAN = 4.4333 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.8000
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 14: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo intracelular de carboidrato de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Carboidrato *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION

t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 15.0000 CALCULATED t VALUE = -11.5953
GRP2 (CROMO) MEAN = 25.5000 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -10.5000
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05

TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 15: Teste de significância da diferença entre as médias de lipídeos totais de *Pseudokirchneriella subcapitata* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Lipídeo *P. subcapitata* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.0213  CALCULATED t VALUE = -42.4264
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.0413  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.0200
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 16: Teste de significância da diferença entre as médias de lipídeos totais de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição ao tratamento controle e contaminado com 0,05 mg.L⁻¹ de cromo. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Lipídeo *C. vulgaris* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (CONTROLE) MEAN = 0.0663  CALCULATED t VALUE = -210.0107
GRP2 (CROMO) MEAN = 0.1653  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.0990
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 17: Teste de Fisher utilizado para a verificação da diferença significativa da sobrevivência de *Ceriodaphnia dubia* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	SIG DEAD	(P=.05)
	C	30	3	
1	AC	30	1	
2	MC	30	3	
3	AMC	30	1	

NO SIGNIFICANT DIFFERENCE

Tabela 18: Teste de Fisher utilizado para a verificação da diferença significativa da sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	SIG DEAD	(P=.05)
	C	30	0	
1	AC	30	0	
2	MC	30	2	
3	AMC	30	0	

NO SIGNIFICANT DIFFERENCE

Tabela 19: Teste de Fisher utilizado para a verificação da diferença significativa da sobrevivência de *Ceriodaphnia dubia* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	SIG DEAD	(P=.05)
	C	30	3	
1	AC	30	3	
2	MC	30	2	
3	AMC	30	0	

NO SIGNIFICANT DIFFERENCE

Tabela 20: Teste de Fisher utilizado para a verificação da diferença significativa da sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	SIG DEAD	(P=.05)
	C	30	1	
1	AC	30	1	
2	MC	30	3	
3	AMC	30	0	

NO SIGNIFICANT DIFFERENCE

Tabela 21: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na fecundidade (número de neonatos produzidos) de *Ceriodaphnia dubia* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Fecundidade *C. dubia* Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED ORIGINAL		GROUP		
		MEAN	MEAN	0	0	0
4	AMC	2.100	2.100	\		
3	MC	2.367	2.367	.\		
1	C	12.000	12.000	**	\	
2	AC	12.067	12.067	**	.\	

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,116) = 3.74 s = 4.272

Tabela 22: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na fecundidade (número de neonatos produzidos) de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Fecundidade *C. silvestrii* Transform: NO TRANSFORMATION
TUKEY method of multiple comparisons

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED ORIGINAL		GROUP		
		MEAN	MEAN	0	0	0
4	AMC	6.500	6.500	\		
3	MC	6.600	6.600	.\		
1	C	12.033	12.033	**	\	
2	AC	11.700	11.700	**	.\	

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,116) = 3.74 s = 3.982

Tabela 23: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na fecundidade (número de neonatos produzidos) de *Ceriodaphnia dubia* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Fecundidade *C. dubia*

Transform: NO TRANSFORMATION

TUKEY method of multiple comparisons

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	ORIGINAL MEAN	GROUP			
				0	0	0	0
4	AMC	18.167	18.167	\			
1	C	18.533	18.533	.\			
2	AC	18.633	18.633	..\			
3	MC	19.767	19.767	...\			

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
 Tukey value (4,116) = 3.74 s = 24.276

Tabela 24: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na fecundidade (número de neonatos produzidos) de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Fecundidade *C. silvestrii*

Transform: NO TRANSFORMATION

TUKEY method of multiple comparisons

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	ORIGINAL MEAN	GROUP			
				0	0	0	0
3	MC	12.500	12.500	\			
4	AMC	14.267	14.267	.\			
2	AC	18.633	18.633	**\			
1	C	19.167	19.167	**.\			

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
 Tukey value (4,116) = 3.74 s = 9.763

Tabela 25: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na taxa de alimentação (1ª troca, 2ª troca e final) de *Ceriodaphnia dubia* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: 1ª TROCA Transform: NO TRANSFORMATION
TUKEY method of multiple comparisons

				GROUP
		TRANSFORMED	ORIGINAL	0 0 0 0
GROUP IDENTIFICATION		MEAN	MEAN	4 3 1 2
4	AMC	73.667	73.667	\
3	MC	75.333	75.333	.\
1	C	80.667	80.667	*.\
2	AC	82.000	82.000	**.\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 5.750

File: 2ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

				GROUP
		TRANSFORMED	ORIGINAL	0 0 0 0
GROUP IDENTIFICATION		MEAN	MEAN	4 3 2 1
4	AMC	86.500	86.500	\
3	MC	86.667	86.667	.\
2	AC	91.900	91.900	**.\
1	C	92.333	92.333	**.\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 1.124

File: FINAL Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

				GROUP
		TRANSFORMED	ORIGINAL	0 0 0 0
GROUP IDENTIFICATION		MEAN	MEAN	4 3 2 1
4	AMC	88.333	88.333	\
3	MC	90.500	90.500	.\
2	AC	97.980	97.980	**.\
1	C	98.060	98.060	**.\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 0.693

Tabela 26: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na taxa de alimentação (1ª troca, 2ª troca e final) de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: 1ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

			GROUP					
			TRANSFORMED	ORIGINAL	0	0	0	0
GROUP	IDENTIFICATION	MEAN	MEAN	MEAN	3	4	1	2
3	MC	84.000	84.000	84.000	\			
4	AMC	85.000	85.000	85.000	.	\		
1	C	92.333	92.333	92.333	*	*	\	
2	AC	92.333	92.333	92.333	*	*	.	\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 1.667

File: 2ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

			GROUP					
			TRANSFORMED	ORIGINAL	0	0	0	0
GROUP	IDENTIFICATION	MEAN	MEAN	MEAN	3	4	1	2
3	MC	97.423	97.423	97.423	\			
4	AMC	97.440	97.440	97.440	.	\		
1	C	98.447	98.447	98.447	*	*	\	
2	AC	98.673	98.673	98.673	*	*	.	\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 0.057

File: FINAL Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

			GROUP					
			TRANSFORMED	ORIGINAL	0	0	0	0
GROUP	IDENTIFICATION	MEAN	MEAN	MEAN	3	4	1	2
3	MC	94.500	94.500	94.500	\			
4	AMC	94.500	94.500	94.500	.	\		
1	C	98.310	98.310	98.310	*	*	\	
2	AC	98.847	98.847	98.847	*	*	.	\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 1.258

Tabela 27: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na taxa de alimentação (1ª troca, 2ª troca e final) de *Ceriodaphnia dubia* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: 1ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

				GROUP
		TRANSFORMED	ORIGINAL	0 0 0 0
GROUP IDENTIFICATION		MEAN	MEAN	2 4 3 1
2	AC	75.000	75.000	\
4	AMC	75.333	75.333	.\
3	MC	75.667	75.667	..\
1	C	76.333	76.333	...\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 17.750

File: 2ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

				GROUP
		TRANSFORMED	ORIGINAL	0 0 0 0
GROUP IDENTIFICATION		MEAN	MEAN	1 2 3 4
1	C	98.553	98.553	\
2	AC	98.700	98.700	.\
3	MC	98.730	98.730	..\
4	AMC	98.737	98.737	...\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 0.099

File: FINAL Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

				GROUP
		TRANSFORMED	ORIGINAL	0 0 0 0
GROUP IDENTIFICATION		MEAN	MEAN	3 4 1 2
3	MC	98.380	98.380	\
4	AMC	98.450	98.450	.\
1	C	98.493	98.493	..\
2	AC	98.537	98.537	...\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 0.117

Tabela 28: Teste de comparações múltiplas utilizado para a verificação da diferença significativa na taxa de alimentação (1ª troca, 2ª troca e final) de *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: 1ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

GROUP IDENTIFICATION		TRANSFORMED MEAN	ORIGINAL MEAN	GROUP
				0 0 0 0
3	MC	70.667	70.667	\
4	AMC	72.667	72.667	.\
1	C	84.000	84.000	**\
2	AC	84.667	84.667	**.\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 4.750

File: 2ª TROCA Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

GROUP IDENTIFICATION		TRANSFORMED MEAN	ORIGINAL MEAN	GROUP
				0 0 0 0
4	AMC	94.500	94.500	\
3	MC	94.767	94.767	.\
1	C	98.033	98.033	**\
2	AC	98.033	98.033	**.\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 0.305

File: FINAL Transform: NO TRANSFORM
TUKEY method of multiple comparisons

GROUP IDENTIFICATION		TRANSFORMED MEAN	ORIGINAL MEAN	GROUP
				0 0 0 0
3	MC	97.533	97.533	\
4	AMC	97.633	97.633	.\
1	C	98.710	98.710	**\
2	AC	98.977	98.977	**.\

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 0.091

Tabela 29: Teste de significância da diferença entre as médias da taxa de aumento populacional (r) de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Aumento populacional *C. dubia* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN = 0.4093 CALCULATED t VALUE = 32.8000
GRP2 (AMC) MEAN = 0.3000 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 0.1093
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 30: Teste de significância da diferença entre as médias da taxa de aumento populacional (r) de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Aumento populacional *C. silvestrii* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN = 0.3723 CALCULATED t VALUE = 26.4421
GRP2 (AMC) MEAN = 0.2637 DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = 0.1087
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 31: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo total de proteínas de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Proteína *C. dubia* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN =          0.5067  CALCULATED t VALUE =  -4.6283
GRP2 (AMC) MEAN =          0.9867  DEGREES OF FREEDOM =   4
DIFFERENCE IN MEANS   =  -0.4800
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 32: Teste de significância da diferença entre as médias s do conteúdo total de proteínas de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Proteína *C. silvestrii* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN =          0.7267  CALCULATED t VALUE =  -8.5679
GRP2 (AMC) MEAN =          1.3000  DEGREES OF FREEDOM =   4
DIFFERENCE IN MEANS   =  -0.5733
=====
```

TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10

Tabela 33: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo total de carboidratos de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Carboidrato *C. dubia* Transform: NO TRANSFORM
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN =          0.1067  CALCULATED t VALUE = -82.7315
GRP2 (AMC) MEAN =          0.4967  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS =          -0.3900
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 34: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo total de carboidratos de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Carboidrato *C. silvestrii* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN = 0.0533  CALCULATED t VALUE = -0.6325
GRP2 (AMC) MEAN = 0.0600  DEGREES OF FREEDOM = 4
DIFFERENCE IN MEANS = -0.0067
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776 NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604 NO significant difference at alpha=0.01
=====
```

Tabela 35: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo total de lipídeos de *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Lipídeos totais *C. dubia* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN =          57.3867  CALCULATED t VALUE =  -7.5505
GRP2 (AMC) MEAN =         102.6933  DEGREES OF FREEDOM =   4
DIFFERENCE IN MEANS   =  -45.3067
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 36: Teste de significância da diferença entre as médias do conteúdo total de lipídeos de *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. (Tabela gerada pelo programa TOXSTAT 3.4.)

File: Lipídeos totais *C. silvestrii* Transform: NO TRANSFORMATION
t-test Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN

```
=====
GRP1 (C) MEAN =          164.0000  CALCULATED t VALUE = -21.6759
GRP2 (AMC) MEAN =         531.0000  DEGREES OF FREEDOM =   4
DIFFERENCE IN MEANS   =  -367.0000
=====
```

```
=====
TABLE t VALUE (0.05 (2), 4) = 2.776** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2), 4) = 4.604** SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.10
=====
```

Tabela 37: Variáveis físicas e químicas monitoradas nos ensaios de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia* exposta ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Fase II deste estudo).

	C	AC	MC	AMC
pH				
Solução-teste do início do experimento	7,34	7,34	7,34	7,34
Solução-teste da 1ª troca	7,42	7,52	7,47	7,55
Solução-teste da 2ª troca	7,34	7,62	7,55	7,55
Final do experimento	7,54	7,71	7,63	7,57
OD (mg.L⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	7,68	7,68	7,68	7,68
Solução-teste da 1ª troca	7,17	6,81	6,74	6,77
Solução-teste da 2ª troca	7,68	7,67	7,60	7,56
Final do experimento	7,50	7,56	7,71	7,60
Condutividade (µS.cm⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	149,9	149,9	149,9	149,9
Solução-teste da 1ª troca	157,0	160,7	157,8	155,1
Solução-teste da 2ª troca	149,9	151,1	147,0	148,7
Solução-teste do início do experimento	153,0	150,3	148,8	151,1
Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)				
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42
Solução-teste da 1ª troca	42	42	42	42
Solução-teste da 2ª troca	42	42	42	42
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42

Tabela 38: Variáveis físicas e químicas monitoradas nos ensaios de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Fase II deste estudo).

	C	AC	MC	AMC
pH				
Solução-teste do início do experimento	7,52	7,55	7,50	7,48
Solução-teste da 1ª troca	7,46	7,45	7,38	7,36
Solução-teste da 2ª troca	7,50	7,46	7,40	7,45
Final do experimento	7,72	7,62	7,68	7,66
OD (mg.L⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	7,65	7,80	7,86	7,75
Solução-teste da 1ª troca	7,52	7,51	7,48	7,53
Solução-teste da 2ª troca	7,38	7,25	7,19	7,20
Final do experimento	7,58	7,60	7,51	7,55
Condutividade (µS.cm⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	148,5	150,8	147,9	147,9
Solução-teste da 1ª troca	145,8	143,0	146,8	145,9
Solução-teste da 2ª troca	150,4	148,9	150,2	149,4
Solução-teste do início do experimento	165,7	162,9	174,6	174,5
Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)				
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42
Solução-teste da 1ª troca	42	42	42	42
Solução-teste da 2ª troca	42	42	42	42
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42

Tabela 39: Variáveis físicas e químicas monitoradas nos ensaios de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia* exposta ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris* (Fase II deste estudo).

	C	AC	MC	AMC
pH				
Solução-teste do início do experimento	7,50	7,46	7,43	7,43
Solução-teste da 1ª troca	7,56	7,45	7,43	7,42
Solução-teste da 2ª troca	7,62	7,48	7,44	7,46
Final do experimento	7,65	7,78	7,72	7,75
OD (mg.L⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	7,56	7,57	7,51	7,60
Solução-teste da 1ª troca	7,72	7,64	7,59	7,55
Solução-teste da 2ª troca	7,36	7,39	7,28	7,35
Final do experimento	7,67	7,83	7,60	7,53
Condutividade (µS.cm⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	147,1	148,2	145,0	148,9
Solução-teste da 1ª troca	149,5	149,4	148,9	148,2
Solução-teste da 2ª troca	149,9	152,1	151,0	153,2
Solução-teste do início do experimento	165,5	176,6	165,8	170,6
Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)				
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42
Solução-teste da 1ª troca	42	42	42	42
Solução-teste da 2ª troca	42	42	42	42
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42

Tabela 40: Variáveis físicas e químicas monitoradas nos ensaios de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao tratamento controle (C) e contaminado com cromo via alimento contaminado (AC), meio aquoso contaminado (MC) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Chlorella vulgaris* (Fase II deste estudo).

	C	AC	MC	AMC
pH				
Solução-teste do início do experimento	7,46	7,45	7,48	7,58
Solução-teste da 1ª troca	7,50	7,38	7,46	7,48
Solução-teste da 2ª troca	7,62	7,58	7,60	7,62
Final do experimento	7,82	7,81	7,83	7,84
OD (mg.L⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	7,28	7,26	7,27	7,26
Solução-teste da 1ª troca	7,63	7,59	7,58	7,57
Solução-teste da 2ª troca	7,43	7,52	7,33	7,43
Final do experimento	7,46	7,45	7,36	7,30
Condutividade (µS.cm⁻¹)				
Solução-teste do início do experimento	149,5	151,5	151,2	150,4
Solução-teste da 1ª troca	147,5	149,2	148,7	149,1
Solução-teste da 2ª troca	150,4	150,3	149,4	150,4
Solução-teste do início do experimento	166,5	164,3	166,6	164,5
Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)				
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42
Solução-teste da 1ª troca	42	42	42	42
Solução-teste da 2ª troca	42	42	42	42
Solução-teste do início do experimento	42	42	42	42

Tabela 41: Variáveis físicas e químicas monitoradas nos ensaios de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Fase III deste estudo).

	C	AMC
pH		
Solução-teste do início do experimento	7,40	7,42
Solução-teste da 1ª troca	7,48	7,49
Solução-teste da 2ª troca	7,52	7,52
Final do experimento	7,59	7,55
OD (mg.L⁻¹)		
Solução-teste do início do experimento	7,38	7,40
Solução-teste da 1ª troca	7,25	7,19
Solução-teste da 2ª troca	6,93	6,94
Final do experimento	6,98	7,01
Condutividade (µS.cm⁻¹)		
Solução-teste do início do experimento	146,1	146,9
Solução-teste da 1ª troca	147,4	149,0
Solução-teste da 2ª troca	147,2	149,4
Solução-teste do início do experimento	147,4	149,2
Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)		
Solução-teste do início do experimento	44	44
Solução-teste da 1ª troca	44	44
Solução-teste da 2ª troca	44	44
Solução-teste do início do experimento	44	44

Tabela 42: Variáveis físicas e químicas monitoradas nos ensaios de toxicidade com *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostas ao tratamento controle (C) e combinação de alimento e meio aquoso contaminados com cromo (AMC), sendo utilizada como alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Fase III deste estudo).

	C	AMC
pH		
Solução-teste do início do experimento	7,46	7,57
Solução-teste da 1ª troca	7,38	7,43
Solução-teste da 2ª troca	7,44	7,48
Final do experimento	7,52	7,55
OD (mg.L⁻¹)		
Solução-teste do início do experimento	7,21	7,13
Solução-teste da 1ª troca	7,23	7,12
Solução-teste da 2ª troca	7,00	6,89
Final do experimento	7,16	7,10
Condutividade (µS.cm⁻¹)		
Solução-teste do início do experimento	146,4	147,2
Solução-teste da 1ª troca	149,9	148,0
Solução-teste da 2ª troca	146,0	146,9
Solução-teste do início do experimento	150,9	151,2
Dureza (mg.L⁻¹ CaCO₃)		
Solução-teste do início do experimento	44	44
Solução-teste da 1ª troca	44	44
Solução-teste da 2ª troca	44	44
Solução-teste do início do experimento	44	44