



universidade
de aveiro

Departamento de Biologia
2022/2023

Licenciatura em Ciências do Mar



Funded by the
European Union



EPIBOOST is funded by the European Union (EU) through the Grant 101078991 - views and opinions expressed those of the authors only and do not necessarily reflect those of the EU or the European Research Executive Agency; neither the EU nor the granting authority can be held responsible for them.

Bioensaios Ecotoxicológicos
com micro-crustáceos:

Daphnia magna

Sofia Ramos 49353

Orientadora: Dra Tânia Vidal
Co-orientadora: Dra Inês Macário

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu percurso na Universidade de Aveiro, em especial:

À minha orientadora Tânia Vidal que me permitiu fazer parte da equipa e me inseriu num projeto inovador como o EPIBOOST

À Inês e ao Albano pelo apoio ao longo do semestre e por me integrarem no laboratório.

À Telma, ao Micael e toda a equipa do laboratório que se mostraram sempre disponíveis para me ajudar

À minha mãe e a minha avó que me apoiam incondicionalmente em tudo desde que me conheço

As minhas irmãs que são as minhas companheiras e conselheiras sempre que preciso mesmo eu sendo a mais velha

Aos meus amigos, Paulo, Soraia e Angélica por me acolherem em Aveiro, por todas as aventuras que vivemos e pelas longas conversas

E claro, ao Tiago por me dar força e carinho nos momentos difíceis e tentar mostrar-me sempre o lado positivo quando eu não consigo ver.

A todas as pessoas mencionadas e aquelas que não mencionei porque as páginas são curtas, mais uma vez obrigado pelo carinho, dedicação e por fazerem parte deste caminho.

Resumo

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto EPIBOOST e teve como objectivo principal estudar o efeito tóxico do cádmio no microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*, num contexto de alterações climáticas. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade de *D. magna* a cádmio, em três temperaturas diferentes, 15°C, 20°C e 25°C. As culturas foram mantidas em condições controladas de temperatura (15°C, 20°C e 25°C) e fotoperíodo (16L:8N), utilizando meio ASTM, extrato de *Ascophyllum nodosum* e *Raphidocellis subcapitata* como fonte de alimento. Foi testada uma gama fixa de sete concentrações de cádmio (2,1 µg/L - 238 µg/L) nas três temperaturas, de acordo com a diretriz da OECD para o teste de imobilização aguda de *Daphnia* sp. De acordo com os resultados, a temperatura mostrou influenciar a sensibilidade dos organismos a este poluente. Temperaturas mais elevadas aumentaram a sensibilidade ao metal, resultando numa diminuição dos valores de EC (15º C - não se registou imobilização; 20º C - EC₅₀ = 32.294 µg/L; e 25º C - EC₅₀ = 2.130 µg/L). Este trabalho contribuiu para demonstrar a influência negativa do aquecimento global num organismo modelo, com um papel essencial na saúde do ecossistema.

Abstract

This work was developed under the scope of EPIBOOST project, focusing on the freshwater micro crustacean *Daphnia magna* and the toxic effect of cadmium, allaying the study of the ecotoxicity of an emergent pollutant, with the context of climate change and predicted global warming. Hence, the main goal of this work was to compare the sensitivity of *D. magna* to cadmium at three different temperatures, 15°C, 20°C and 25°C. The cultures were maintained in controlled conditions of temperature (15°C, 20°C and 25°C) and photoperiod (16^L:8^N), using ASTM medium, *Ascophyllum nodosum* extract and *Raphidocellis subcapitata* as a food source. A fixed range of seven concentrations of cadmium (2.1 µg/L – 238 µg/L) was tested under the three temperatures according to the OECD guideline for *Daphnia* sp. acute immobilization test. The temperature showed to influence the sensitivity to cadmium. Higher temperatures increase the sensitivity to this metal, resulting in a diminishing of the EC values (15º C – no immobilization recorded; 20º C - EC₅₀ = 32.294 µg/L; and 25º C - EC₅₀ = 2.130 µg/L). This work contributed to showing the negative influence of global warming on a model organism with an essential role in the health of the ecosystem.

Índice Geral

Índice de figuras	5
Índice de tabelas	5
1. Introdução	6
1.1. Contaminação aquática por metais.....	6
1.2. Poluentes Conservativos: O problema da bioacumulação	6
1.3. Cádmio	7
<i>Daphnia magna</i>	8
1.4. Características gerais.....	8
1.5. Reprodução	10
1.6. Importância como indicador ecológico	11
2. Projeto Epiboost	11
3. Objetivo do trabalho	12
4. Material e Métodos	12
4.1. Manutenção das culturas.....	12
4.2. Teste de imobilização aguda: Cádmio	13
5. Resultados	14
5.1. Ensaio ecotoxicológicos	14
5.2. Tabela de ECs.....	16
6. Discussão	16
6.1. Efeitos da contaminação por cádmio em <i>D. magna</i>	16
6.2. Efeito de variações térmicas na espécie <i>Daphnia magna</i>	17
6.3. Considerações finais.....	18
7. Bibliografia.....	19

Índice de figuras

Figura 1 - <i>Daphnia magna</i> onde são visíveis os ovos provenientes de partenogênese (Ebert, 2005)....	9
Figura 2 - Diagrama representativo do sistema de reprodução assexuada e sexuada na <i>Daphnia magna</i> , onde se observa a produção de ovos dentro da mãe que se transformam sem haver fecundação em clones. O mesmo organismo pode gerar ovos que necessitam de ser fecundados (Ebert, 2005)	10
Figura 3 - Tanque de monocultura <i>Daphnia magna</i>	13
Figura 4 - Diagrama dos tubos de ensaio com os grupos de controlo e de concentração	14
Figura 5 - Percentagem de imobilização a 15, 20 e 25° C para as diferentes concentrações	15
Figura 6 - Comparação da imobilização a 20 e 25° C para as sete concentrações. O asterisco assinala os tratamentos que apresentam uma diferença significativa entre eles ($p < 0,05$)	16

Índice de tabelas

Tabela 1 - Nesta tabela são apresentados as sete concentrações diferentes e os volumes de solução stock de cádmio e ASTM para um volume total de 20ml	14
Tabela 2 - Teste de variância equitativa entre as temperaturas 20 e 25° com $P=0,203$	15
Tabela 3 - Níveis de concentração necessários para que exista imobilização de 10, 20 e 50 por cento da população de <i>D. magna</i>	16

1. Introdução

1.1. Contaminação aquática por metais

A água é considerada um recurso vital ao nosso planeta, é essencial para a sobrevivência dos ecossistemas e da vida humana.

Os processos geoquímicos e atividades antropogénicas são responsáveis pela presença e distribuição de metais nos ecossistemas. A expansão industrial levou a um grande desenvolvimento de várias indústrias, que maioritariamente estão situadas junto a sistemas fluviais. As descargas e consequente pressão sobre os sistemas aquáticos leva à acumulação de poluentes e contaminação das águas por diversos poluentes, como é o caso dos metais. Alguns exemplos de metais são o cobre, zinco, mercúrio e cádmio (Baby et al., 2010). Estes compostos têm um impacto sobre os ecossistemas e na saúde humana, pois não são decompostos ou degradáveis naturalmente e têm tendência a bioacumular. Mesmo a concentrações baixas estes contaminantes tem um efeito nocivo para os organismos aquáticos, incluindo plâncton, plantas aquáticas, vertebrados e invertebrados. O ambiente aquático permite a transposição da barreira entre o ambiente abiótico e biótico, pois os organismos aquáticos filtram grandes quantidades de água através das membranas respiratórias conseguindo assim extrair os metais presentes na água. Os peixes conseguem acumular uma grande quantidade de contaminantes devido ao seu sistema de guelras que filtra a água diretamente do meio (Atici et al., 2010).

Níveis baixos de metais podem causar stress crónico nos organismos, não provocando morte imediata, mas reduzindo a sua capacidade de competir por alimento e habitat. Assim sendo, a exposição a metais constitui um problema muito significativo com consequências não só para os produtores e fauna aquática, mas para os animais e humanos que os ingerem (Singh et al., 2022).

1.2. Poluentes Conservativos: O problema da bioacumulação

Os metais são considerados poluentes conservativos, pois ao contrário dos poluentes orgânicos não estão sujeitos a degradação bacteriológica e mesmo que a degradação venha a existir ocorrerá numa escala de tempo tão alargada que de um ponto de vista prático, acabam por se tornar adições permanentes ao ambiente marinho.

Estima-se que dos metais carcinogénicos mais potentes emitidos para a atmosfera, são provenientes das atividades antropogénicas industriais (60% do arsénio, 40% do crómio, 65% do níquel e 85% do cádmio) (Foulkes, 1990).

Estes contaminantes podem entrar no ecossistema das mais variadas formas: produção industrial, agricultura, efluentes municipais, fertilizantes e pesticidas. A sua toxicidade para o corpo humano causa mau funcionamento de vários órgãos vitais como o cérebro, pulmões, fígado, rins e interfere na

composição sanguínea. Já a exposição prolongada pode comprometer seriamente as funções neurológicas e musculares (Singh et al., 2022).

A capacidade de os seres-vivos regularem a contaminação por metais varia bastante, a maioria consegue apenas até um determinado limite e não totalmente por isso os metais que não conseguem ser excretados permanecem no sistema e tornam-se parte do organismo. Este processo é conhecido por bioacumulação e ocorre logo nos produtores primários como o fitoplâncton, que absorvem os contaminantes diretamente da água mais rapidamente do que conseguem metabolizá-los. Um exemplo prático é o do DDT (um pesticida que foi muito utilizado após a 2ª guerra mundial) que tem a mesma toxicidade que uma aspirina. A dose letal de aspirina é igual à de DDT, no entanto podemos tomar 0.5 a 1 g de aspirina diariamente durante tempo indeterminado sem consequências para a nossa saúde porque esta é excretada, já o DDT não. O que significa que a exposição prolongada a este contaminante faz com que progressivamente se atinja a dose letal (Clark, 2001). Também a exposição ao mercúrio apresenta efeitos semelhantes. Este metal continua a ser um problema na ria de Aveiro, originado a partir do efluente de uma fábrica que recorria a células de mercúrio para produzir soda e cloro. Apesar da produção que utiliza este processo ter sido cessada em 2002 a contaminação por mercúrio na área próxima do complexo ainda é bastante significativa (Reis, A., 2008).

O termo bioacumulação é definido pela absorção e acumulação de contaminantes orgânicos e inorgânicos no ambiente pelos seres vivos. Este processo resulta então de uma combinação complexa de interações entre consumo, excreção, libertação passiva e metabolização. No caso dos peixes, a filtração de água contaminada nas guelras leva a que os contaminantes sejam integrados no sistema através do processo de respiração e por sua vez ficam retidos no organismo do animal pois não são possíveis de ser eliminados através seus processos biológicos naturais.

Quando se fala em bioacumulação está também inerente o conceito de bio magnificação, que ocorre, por exemplo, quando o zooplâncton ingere fitoplâncton contaminado e, por sua vez, absorve o contaminante no seu organismo. O mais comum é que estes também não sejam capazes de excretar o poluente e a concentração do poluente aumenta. O que significa que a concentração do poluente vai aumentando à medida que subimos na cadeia trófica, até aos grandes predadores, tornando-os um potencial risco para os recursos naturais e para a saúde humana (Clark, 2001).

1.3. Cádmio

O cádmio está presente numa vasta parte da crosta terrestre, normalmente associado ao zinco pois é um subproduto da sua fundição. O cádmio é utilizado desde 1950 como estabilizador, na pigmentação de plásticos, soldadores e ligas metálicas. A sua libertação para o ambiente acontece das mais variadas formas mas as atividades humanas têm um enorme impacto na sua dispersão pelo ambiente, como o caso das águas residuais de origem mineira, através do desgaste dos pneus dos automóveis que contêm 20 a 90 ppm de cádmio, ou das descargas de águas residuais em solos para agricultura que podem conter até 30 ppm de cádmio (Clark, 2001).

A exposição de longo prazo a este contaminante quer seja através da água, solo ou alimentos pode causar efeitos cancerígenos, e elevados níveis de toxicidade nos sistemas vitais tais como o respiratório, cardiovascular, urinário, reprodutor e sistema nervoso central e periférico.

O cádmio e o zinco são os metais que possuem maiores coeficientes de transferência solo-planta, isto é, uma vez presentes no solo são facilmente absorvidos. No caso do cádmio este é um elemento sem função bioquímica específica ou não essencial e é também o que apresenta maiores níveis de toxicidade para os organismos (Rahimzadeh et al., 2017).

A presença de cádmio nos alimentos para consumo humano é alvo de regulamentação. Num artigo publicado pela universidade de Limerick, na Irlanda, é indicado que arroz, vegetais, farinha e marisco são as principais fontes de cádmio na nossa alimentação. A espécie em que se foca o estudo é *Cancer paguros*, de nome comum caranguejo castanho (Lordan & Zabetakis, 2022). Esta espécie tem um valor económico considerável na Europa e é uma das principais espécies comercializadas. Portugal é um dos países onde o seu consumo é bastante elevado (Maulvault et al., 2013).

No caso dos crustáceos o cádmio tem tendência para acumular na glândula digestiva, hepatopâncreas, e no fluído circulatório, conhecido por hemolinfa que é análogo ao sangue e fluídos intersticiais nos vertebrados (Wyatt et al., 1956). Existem fatores que influenciam ativamente a absorção de cádmio em crustáceos, tais como maturação ovárica, hidratação dos tecidos, tamanho, entre outros. Em *Cancer paguros*, há evidências que os níveis variam de acordo com o local de onde são extraídos e com o tipo de confeção. Os níveis aumentam de acordo com o tamanho do hepatopâncreas, o que indica que os níveis também podem ser mais elevados em indivíduos mais velhos. Dependendo da dose nutricional e composição do alimento, o corpo humano retém cerca de 3 a 5% do cádmio ingerido. Em casos extremos, uma vez depositado no trato intestinal e na corrente sanguínea, liga-se às proteínas e pode ser transportado para o fígado causando necrose. Apesar do envenenamento por cádmio ser raro, pode acontecer e afetar funções celulares importantes que impedem os mecanismos de reparação do ADN e causar danos nas funções da tiróide. No caso de exposição crónica pode causar cancro (Lordan & Zabetakis, 2022). No Japão houve um caso grave de contaminação humana por cádmio, na zona do rio Jinzu em Toyama, onde estas águas contaminadas eram usadas para consumo humano, confeção de alimentos, banhos, inclusive utilizada na irrigação do arroz. A população da zona sofreu graves disfunções tubulares renais e mineralização óssea, reconhecidos como sintomas da doença de Itai-itai (Aoshima, 1987).

Daphnia magna

1.4. Características gerais

O grupo do zooplâncton divide-se em três grupos distintos: os rotíferos, que obtiveram o seu nome por causa do aspeto e movimento característico dos cílios à volta da boca; os copépodes, que têm antenas longas e pés em formato de remo; e os cladóceros que são pequenos crustáceos que vivem em ambientes de água doce. É dentro deste grupo que podemos distinguir *Daphnia magna* (Fig.1) (Pereira, J.,2008).

O género *Daphnia* possui mais de cem espécies conhecidas, com formato oval e tamanho variável de 1 a 5 mm são maioritariamente pelágicas e filtradores, isto é, alimentam-se de partículas em suspensão na coluna de água nomeadamente microalgas.



Figura 1 - *Daphnia magna* onde são visíveis os ovos provenientes de partenogênese (Ebert, 2005).

A sua cor varia de acordo com o alimento predominante, mas são maioritariamente transparentes. No entanto, podem apresentar uma tonalidade amarelada ou esverdeada dependendo do alimento disponível na zona onde se encontram. Possuem uma carapaça externa, que lhes fornece proteção contra predadores e também duas antenas, sendo uma delas mais longa e sensível, que permite a deteção de estímulos químicos e mecânicos na água. Usualmente são conhecidas como pulgas de água doce devido à locomoção característica, utilizando as antenas maiores para se moverem e direcionarem na coluna de água num movimento de cima para baixo e quando param, devido à sua densidade considerável afundam (Ebert, 2005).

Para além do fitoplâncton, *Daphnia magna* também se alimenta de bactérias e outros microrganismos que estejam presentes na água. A sua alimentação representa uma contribuição fundamental no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, influencia a densidade populacional de fitoplâncton e a disponibilidade de nutrientes na água. Tem uma grande capacidade de se adaptar a vários habitats e responde aos stresses no ecossistema. Um exemplo, é a capacidade de intercalar o tipo de reprodução entre assexuada ou sexuada tendo em conta as condições do ambiente ou alterar os períodos migratórios (Colbourne et al., 2011).

Daphnia migra dentro da coluna de água diariamente para evitar predadores e a competição intra e interespecífica, a esse comportamento chama-se de migração vertical diurna (DVM). Para além disso, este fator também as expõe naturalmente a uma ampla faixa de temperaturas. À medida que as temperaturas superficiais da água continuam a aumentar devido às alterações climáticas, mesmo em

sistemas água doce, é previsível que o grau de estratificação térmica tenha uma variação maior, levando conseqüentemente a alterações na mistura vertical (Glaholt et al., 2016a).

Sob o ponto de vista laboratorial são extremamente interessantes por serem fáceis de cultivar, pois não exigem grande esforço de material para serem mantidas em quantidade e qualidade suficiente. O seu tamanho reduzido faz com que os custos de manutenção sejam baixos e o seu ciclo de vida é curto mas bastante produtivo, o que faz com que sejam ideais para ensaios laboratoriais (Pereira, 2008).

1.5. Reprodução

Daphnia sp. é um organismo que consegue alternar a sua estratégia de reprodução. Em condições ótimas a reprodução é assexuada, por partenogênese, onde em intervalos cíclicos são depositados ovos numa câmara marsupial situada do dorso das fêmeas e que não necessitam de fertilização. Ao longo do tempo a população torna-se maioritariamente fêmea, todas geneticamente idênticas, isto é conhecido como fenómeno de clonagem. Contudo, se existirem elementos de stress estes organismos são estimulados pelo ambiente a produzir machos dando origem a uma reprodução sexuada. Criam-se então ovos de resistência, que conseguem suportar circunstâncias desfavoráveis num estado latente e só eclodem quando existirem condições ideais que permitam a conservação da população (Fig.2) (Inácio et al., 2010). A produção de ovos de resistência associada a este tipo de reprodução, aumenta a probabilidade de sobrevivência em condições desfavoráveis pois os ovos possuem uma camada protetora rígida que os permite persistir (Ebert, 2022).

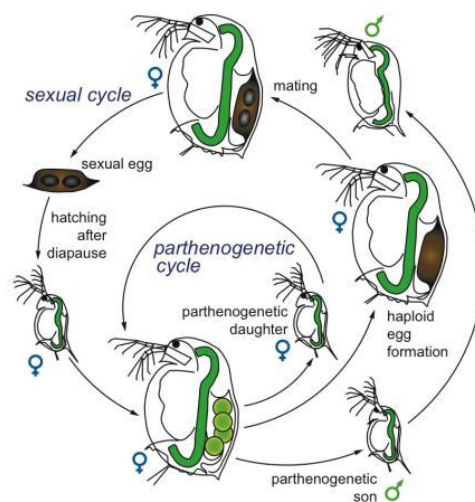


Figura 2 - Diagrama representativo do sistema de reprodução assexuada e sexuada em *Daphnia magna*, onde se observa a produção de ovos dentro da mãe que se transformam sem haver fecundação em clones. O mesmo organismo pode gerar ovos que necessitam de ser fecundados (Ebert, 2005)

A temperatura, disponibilidade de alimento, fotoperíodo e qualidade da água são fatores muito importantes na reprodução de *D. magna* (Inácio et al., 2010).

No caso específico da temperatura do meio, esta causa diferenças significativas. A uma temperatura de 20° existem condições favoráveis para reprodução assexuada, enquanto temperaturas mais baixas

a reprodução sexuada é favorecida. Um comportamento típico da *D. magna* é a migração vertical, influenciada pela duração dos períodos de luz, no inverno quando os dias são mais curtos a tendência é que a reprodução seja sexuada (Glaholt et al., 2016). Fatores como o pH, níveis de oxigênio e presença de substâncias tóxicas afeta não só a reprodução como a viabilidade dos ovos e neotatos (Ebert, 2022).

É importante destacar que estes fatores ambientais podem interagir entre si, e a resposta de *D. magna* pode ser complexa e variável.

1.6. Importância como indicador ecológico

Os testes de toxicidade regem-se por um princípio fundamental que é a resposta de organismos ecologicamente relevantes à presença ou exposição de poluentes em determinadas concentrações. Ou seja, os testes ecotoxicológicos baseiam-se na relação entre a concentração a que o organismo está exposto e o nível de efeitos nocivos, de forma a conseguir determinar o risco efetivo no ambiente. Estes testes podem ser agudos ou crónicos. No primeiro caso os organismos são expostos a concentrações elevadas da substância num curto espaço de tempo e regista-se a taxa de imobilização, por exemplo. Nos testes crónicos o objetivo é perceber a que concentrações é que não há danos para o organismo, este é exposto a baixas concentrações de um elemento num período mais alargado, cerca de três a cinco semanas (Cassidy, 2010).

A importância da *D. magna* como indicador ecotoxicológico e como bioindicador é notável. A sua sensibilidade a poluentes e stress ambiental faz dela um organismo modelo na avaliação de sistemas aquáticos. Um biomarcador permite avaliar impactos negativos no ambiente causados por um stress químico, físico ou biológico. A utilização de biomarcadores suscetíveis indica-nos a capacidade de resposta à exposição, que inclui fatores genéticos e alterações nos recetores que modifiquem a suscetibilidade do organismo. (Neves, Micael, 2012).

Sendo um elemento-chave na cadeia trófica, a sua resposta aos contaminantes é essencial no funcionamento do ecossistema. Para além de servir de alimento a outros organismos, como se alimenta de produtores primários, também tem um papel importante no controlo da circulação de nutrientes nos ambientes de água doce. A monitorização da sobrevivência, reprodução e respostas fisiológicas de *Daphnia* permite tirar conclusões sobre os potenciais riscos e implicações ecológicas da contaminação (Sarma & Nandini, 2006).

Perceber a importância ecotoxicológica da *D. magna* permite-nos melhorar a nossa capacidade de proteger e conservar a integridade dos ambientes aquáticos.

2. Projeto Epiboost

Este projeto junta dois parceiros internacionais, Ugent e CSIC com a Universidade de Aveiro para tornar possível reunir uma equipa de investigação de excelência no campo da Epigenética ambiental. Trata-se de uma área inovadora, que regula a expressão genética e consequentemente a resposta dos organismos ao seu ambiente. Durante o desenvolvimento, o DNA acumula determinadas marcas químicas que definem a quantidade de genes. Este conjunto de marcas químicas é conhecido como “epigenoma”.

O objetivo dos parceiros é auxiliar a equipa da Universidade de Aveiro, providenciando suporte nas instalações para experimentação animal e na sequenciação, assim como orientar as práticas científicas no sentido de as tornar mais eficientes.

Cientificamente procura gerar novos conhecimentos dos efeitos epigenéticos e como eles se traduzem em mudanças fenotípicas das perturbações ambientais das espécies marinhas e de água doce, tem como objetivos específicos otimizar as técnicas de extração de DNA, para observar os processos de metilação em espécies selecionadas depois de terem sido submetidas a um fator de stress, nomeadamente um metal, um antibiótico e uma toxina e perceber os seus efeitos fenotípicos daí a relevância da epigenética na avaliação de risco ecológico.

3. Objetivo do trabalho

Os testes de ecotoxicidade são normalmente efetuados em condições ótimas para a espécie, no entanto no ambiente existem várias condições que influenciam o ambiente. Não só estes organismos estão sujeitos às variações normais de temperatura provocadas pelas estações do ano, como são também afetados pelo aumento da temperatura global (Vergauwen et al., 2013).

A interação entre um contaminante metálico e o aumento de temperatura tem duas consequências nestes organismos aquáticos ectotérmicos: aumenta a sensibilidade ao contaminante e diminui a sua tolerância térmica. O aumento da atividade metabólica causado pela subida de temperatura no meio tende a aumentar a sensibilidade ao contaminante (Glaholt et al., 2016).

Neste contexto, este trabalho contribui para o projeto através da análise do potencial tóxico de um metal (o cádmio), numa das espécies de micro crustáceos de água doce em estudo (*Daphnia magna*). Mais especificamente, este trabalho teve como objetivo comparar a sensibilidade de *D. magna* ao cádmio em três temperaturas diferentes, 15°C, 20°C e 25°C.

4. Material e Métodos

4.1. Manutenção das culturas

Daphnia sp. foi cultivada no nosso laboratório em regime de monocultura, em tanque de plástico com um volume de 4 litros de meio sintético de ASTM, fornecendo como alimento 15 ml de *Raphidocelis subcapitata* (alga verde), 20 ml de *Ascophyllum nodosum*, com uma densidade populacional inicial de 100 organismos (Fig. 5). O tanque foi mantido numa câmara com temperatura controlada, que permitia estabelecer tempos de fotoperíodo (16 horas de luz/ 8 horas de escuridão) favoráveis aos padrões migratórios de *D. magna*. Tendo em conta o crescimento e reprodução acelerada da espécie e a necessidade de manter condições ótimas de sobrevivência, a manutenção da cultura era feita a cada dois dias.

Neste caso específico, em que um dos objetivos era entender o efeito do cádmio a diferentes temperaturas foi necessário manter três culturas diferentes a $15^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

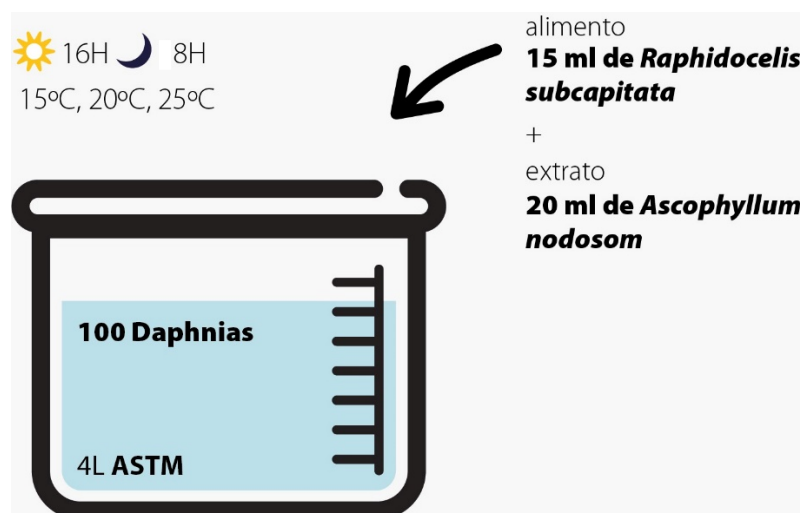


Figura 3 - Tanque de monocultura *Daphnia magna*

4.2. Teste de imobilização aguda: Cádmio

O teste ecotoxicológico adotado seguiu o protocolo de referência sugerido pela OECD (Teste nº 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilization Test) e foram feitos três ensaios distintos, um para cada temperatura, nos quais os organismos foram expostos a uma gama de concentrações de contaminante por um período de 48h e o controlo da imobilização feito duas vezes no decorrer de cada ensaio, a primeira contagem acontecia às 24h e a segunda no final do período de teste.

Foi utilizado cloreto de cádmio (CdCl_2) e foi selecionada uma gama de sete concentrações estipulada por um fator de multiplicação de 2,2 entre cada concentração, sendo a primeira concentração a mais baixa de $2,1 \mu\text{g/L}$, a segunda de $4,62 \mu\text{g/L}$, a terceira de $10,2 \mu\text{g/L}$, a quarta de $22,4 \mu\text{g/L}$, a quinta de $49,2 \mu\text{g/L}$, a sexta de $108,2 \mu\text{g/L}$ e a mais alta de $238,0 \mu\text{g/L}$.

A solução stock inicial, foi preparada com 1,63 mg de $CdCl_2$ (s) em 10 mL de ASTM, com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a partir da solução inicial obteve-se uma solução stock 2 de cádmio à concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ para um volume de 50 mL, o que permitia ter solução suficiente o total do ensaio. Foi feito um grupo de controlo com quatro réplicas e sete grupos de quatro réplicas para as diferentes concentrações em tubos de ensaio de vidro. Os volumes pipetados de solução stock 2 de cádmio e de ASTM são apresentados na tabela 1 perfazendo um total de 20 mL por tubo (Tab. 1).

Um total de 160 neonatos, pertencentes à quarta ninhada (N4) foram transferidos utilizando uma pipeta de Pasteur, em grupos de cinco, do tanque principal para tubos de ensaio (Fig. 4).

Tabela 1 - Nesta tabela são apresentados as sete concentrações diferentes e os volumes de solução stock de cádmio e ASTM para um volume total de 20 mL.

Concentrações ($\mu\text{g/L}$)	Cd(ml)	ASTM (ml)
2,1 $\mu\text{g/L}$ (C1)	0,042	19,96
4,62 $\mu\text{g/L}$ (C2)	0,092	19,9
10,2 $\mu\text{g/L}$ (C3)	0,204	19,8
22,4 $\mu\text{g/L}$ (C4)	0,448	19,55
49,2 $\mu\text{g/L}$ (C5)	0,984	19,02
108,2 $\mu\text{g/L}$ (C6)	2,164	17,83
238,0 $\mu\text{g/L}$ (C7)	4,68	15,32

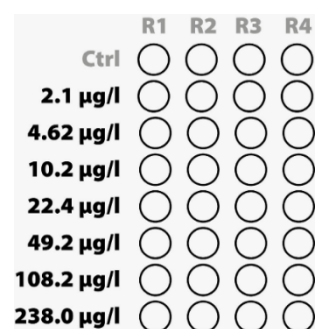


Figura 4 - Diagrama dos tubos de ensaio com os grupos de controlo e de concentração

5. Resultados

5.1. Ensaio ecotoxicológicos

Na figura 5 apresenta-se a percentagem de imobilização que ocorreu em cada ensaio. Os organismos dos grupos de controlo não apresentaram qualquer tipo de imobilização, o que se encontra de acordo com as indicações OECD para testes agudos (não ser superior a 10%).

A 15°C não houve registo de imobilização em nenhuma das concentrações. Já a 20°C, nas primeiras três concentrações o número de imobilizações está abaixo dos 15%, e a partir da quarta apresenta sempre valores acima dos 40%. Esta tendência é ainda maior a 25°C onde a taxa de imobilização se encontra acima dos 60% desde a primeira concentração, sendo total partir da quarta concentração.

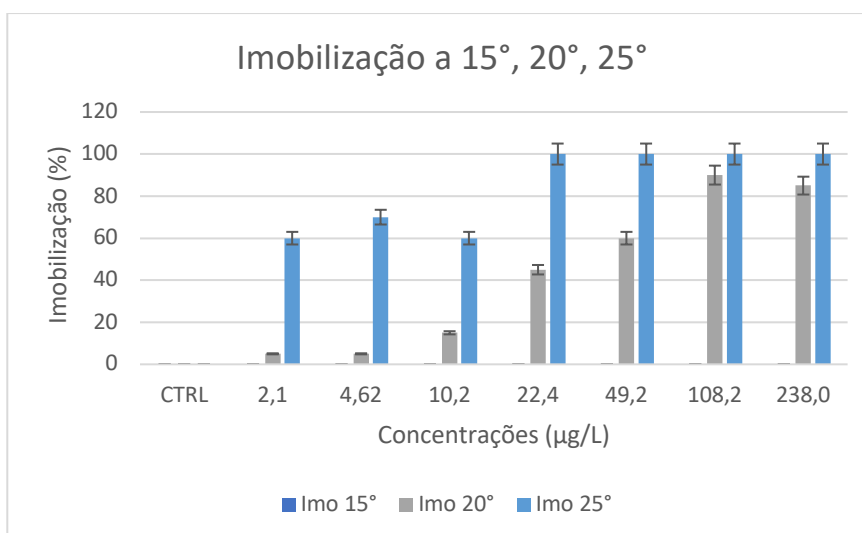


Figura 5 - Percentagem de imobilização a 15, 20 e 25° C para as diferentes concentrações

Para a análise de variância recorremos a uma ANOVA de duas vias utilizando o Teste de Tukey, que é usado para comparar diferenças entre as médias dos grupos e perceber se são ou não significativamente diferentes (Šimeček & Šimečková, 2013). Para isso recorreu-se a um programa estatístico (SPSS) onde foi calculado o valor crítico com nível de significância igual a 0,05 e comparadas as diferenças entre médias de imobilização para cada concentração e para as temperaturas de 20 e 25° (uma vez que não houve imobilização a 15°C, estes dados não foram utilizados para efeitos de comparação) (Tab. 2 e 3). Através dos dados apresentados conseguimos perceber que há uma diferença significativa no efeito tóxico do cádmio nas primeiras cinco concentrações, isto é, para a mesma concentração, a 25° C, ocorre um maior número de imobilizações (Fig.6).

Tabela 2 - Teste de variância equitativa entre as temperaturas 20 e 25° C.

Fonte de variação	Df	MSresidual	F(rácio)	P(valor)
Temperatura	1	50,766	177,218	<0.001
Concentração	7	23,069	80,532	<0.001
Temp. vs Conc.	7	2,908	10,153	<0.001
Residual	48	0,286		
Total	63	3,910		

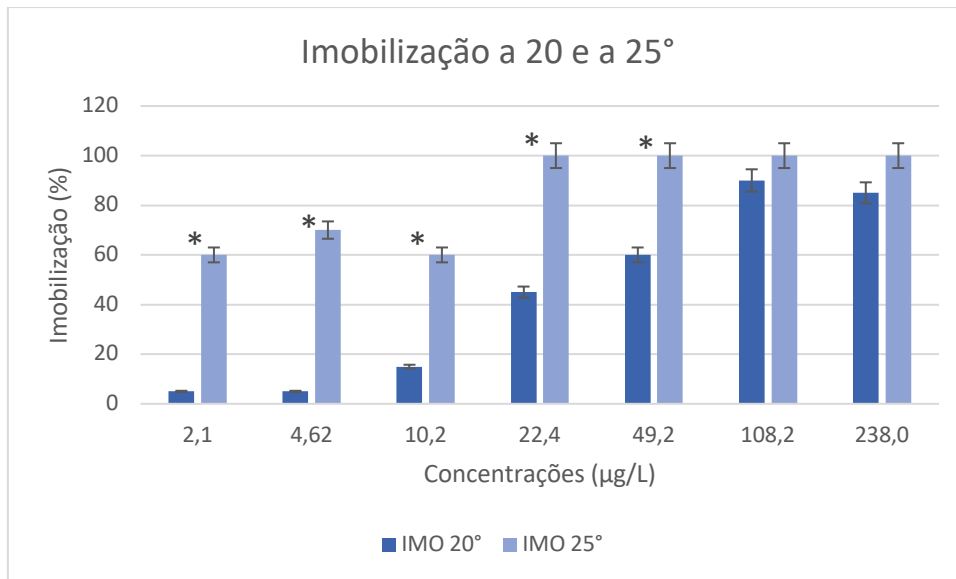


Figura 6 - Comparação da imobilização a 20 e 25° C para as sete concentrações. O asterisco assinala os tratamentos que apresentam uma diferença significativa entre eles ($p < 0,05$)

5.2. Tabela de ECs

Uma vez que não houve mortalidade a 15° C não foi possível determinar a “effect concentration” (EC) nesta gama, mas conseguimos determinar para as outras duas temperaturas. Estes valores representam a concentração necessária de contaminante para que haja imobilização de 10, 20 e 50 % da população e estão representados na tabela seguinte.

Tabela 3 - Níveis de concentração necessários para que exista imobilização de 10, 20 e 50 % na população de *D. magna*

Temperatura	EC10 µg/L	EC20 µg/L	EC50 µg/L
20°	5,203 (2,406±8,514)	9,737 (5,434±14,622)	32,294 (22,343±47,57)
25°	0,274 (0,19±0,796)	0,554 (0,66±1,321)	2,130 (0,693±3,671)

6. Discussão

6.1. Efeitos da contaminação por cádmio em *D. magna*

No meio aquático os organismos estão sempre expostos a múltiplos fatores de stress, tanto naturais como antropogênicos. Em particular a temperatura da água é um elemento abiótico influenciador na

poluição por metais. Descargas térmicas devido a alterações climáticas podem alterar o metabolismo e a sensibilidade ao cádmio (Na et al., 2021).

O cádmio afeta a proliferação, diferenciação e morte celular, por isso estamos à espera de alterações no epigenoma. Estas atividades interagem diretamente com os mecanismos de reparação de ADN, produção de oxigénio e na indução de apoptose, que é imprescindível para o desenvolvimento dos organismos. Este metal também se consegue ligar às mitocôndrias levando à inibição da respiração celular e a fosforilação oxidativa (processo que utiliza a energia libertada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir trifosfato de adenosina para produção de energia) mesmo a baixas concentrações. Isto pode levar a alterações nos cromossomas ou mesmo à eliminação linhas celulares e inibição a atividade das enzimas antioxidantes (Joseph, 2009).

D. magna tem sido amplamente utilizada em testes ecotoxicológicos devido às elevadas taxas de reprodução, sensibilidade, facilidade no cultivo em laboratório e porque os seus mecanismos fisiológicos são hoje muito bem compreendidos.

O valor encontrado na literatura para EC50 no cádmio a 20° C é de 20 µg/L (Traudt et al., 2017), que está próximo do valor calculado na tabela 3. Elevados níveis de cádmio no ambiente podem reduzir significativamente as taxas de sobrevivência de *D. magna* e comprometer os seus processos vitais. Pode também afetar os padrões de reprodução e maturação, em estudos com exposição prolongada as idades de maturação sexual são afetadas, acontecem mais tarde. Num contexto real este fator pode implicar riscos para a densidade populacional. (Heugens et al., 2006).

Resultados de outros estudos mostram também que o efeito nocivo da toxicidade do cádmio na sobrevivência da *D. magna* aumenta significativamente com a temperatura (Heugens et al., 2003)

6.2. Efeito de variações térmicas na espécie *Daphnia magna*

No meio aquático *Daphnia* sp. pode estar exposta a uma variada gama de temperaturas e sendo organismos ectotérmicos, que não possuem mecanismos de termorregulação, a sua temperatura é influenciada pelo meio. Por este motivo, necessitam de desenvolver estratégias para combater temperaturas desfavoráveis e a sua plasticidade fisiológica permite-lhes compensar esta característica. Este conceito refere-se à capacidade de determinados organismos adaptarem as suas respostas fisiológicas e funções de acordo com as condições ambientais de forma a otimizar os processos para que possam sobreviver nestes contextos. No caso de *D. magna*, os índices de reprodução e sobrevivência são maiores a temperaturas médias do que a temperaturas altas. Já com valores mais baixos de temperatura os mecanismos aeróbios (que necessitam de oxigénio) são mais altos (Chopelet et al., 2008).

A nível celular as características da membrana são altamente dependentes da temperatura e sofrem modificações na sua viscosidade. Na presença de condições térmicas mais elevadas normalmente

existe um aumento dos processos metabólicos, mas temperaturas mais baixas levam a uma diminuição na proporção de gorduras nas membranas fosfolipídicas. Quer em testes de longa duração ou testes agudos que envolvam alterações na temperatura do meio, a composição lipídica em *D. magna* é geralmente afetada, pois este organismo necessita de gorduras e esteróis para manter os seus processos fisiológicos. O esterol mais comum é o colesterol que é um componente indispensável da estrutura celular, estando envolvido nos processos de regulação de propriedades da membrana celular. A necessidade de produção destes elementos tem uma correlação positiva com o aumento de temperatura (Lamkemeyer et al., 2011).

6.3. Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a temperatura do meio também afeta o potencial tóxico do cádmio. No caso da temperatura mais baixa onde não se obteve imobilização seria necessário efetuar testes com gamas de concentração mais altas, pois a temperaturas reduzidas a prioridade é manter apenas os processos essenciais ao organismo, o que nos leva a crer que os processos metabólicos são reduzidos e há menos absorção do contaminante presente no meio. Já os resultados da temperatura mais alta, em comparação com o teste a 20° C, apresentam um nível de toxicidade muito maior. As temperaturas elevadas, representam por si só uma condição de stress para este organismo porque causam um aumento no ritmo metabólico, o que leva a que os efeitos toxicocinéticos sejam maiores.

É possível relacionar estes resultados com a preocupação eminente que é o aquecimento global e as alterações climáticas, pois os resultados mostram que um aumento de temperatura de 5°C leva a que o cádmio tenha um efeito tóxico mais elevado. Note-se ainda que este resultado mostra um aumento de 55 % na imobilização em relação à mesma concentração de contaminante a 20°C.

A subida da temperatura global representa uma ameaça a longo prazo que influencia a estabilidade dos ecossistemas aquáticos, perturba a distribuição de espécies, e causa mudanças nos padrões migratórios e perdas de habitat não só nos cladóceros mas também em muitas outras espécies o que pode comprometer a integridade e equilíbrio de um ecossistema.

Num contexto real, a medição dos níveis de toxicidade para o cádmio na espécie *D. magna* pode servir como indicador de contaminação ambiental, sendo um bom biomarcador, as suas respostas podem dar-nos uma melhor perceção da extensão de contaminação, para que seja possível criar estratégias de controlo e mitigação.

7. Bibliografia

- Aoshima, K. (1987). Epidemiology of Renal Tubular Dysfunction in the Inhabitants of a Cadmium-Polluted Area in the Jinzu River Basin in Toyama Prefecture. In *Tohoku J. exp. Med* (Vol. 152, Issue 2).
- Atici, T., Obali, O., Altindag, A., Ahiska, S., & Aydin, D. (2010). The accumulation of heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr) and their state in phytoplanktonic algae and zooplanktonic organisms in Beysehir Lake and Mogan Lake, Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 9(4), 475–487. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Baby, J., Raj, J. S., Biby, E. T., Sankarganesh, P., Jeevitha, M. V, Ajisha, S. U., & Rajan, S. S. (2010). *Toxic effect of heavy metals on aquatic environment*. <http://indexmedicus.afro.who.int>
- Cassidy, J. S. (n.d.). *Universidade de Aveiro 2010 Departamento de Ambiente e Ordenamento Avaliação da qualidade da água do rio Cértima através de ensaios ecotoxicológicos*.
- Chopelet, J., Blier, P. U., & Dufresne, F. (2008). A Journal of Integrative Biology Plasticity of Growth Rate and Metabolism in *Daphnia magna* Populations From Different Thermal Habitats. *J. Exp. Zool*, 309, 553–562. <https://doi.org/10.1002/jez.488>
- Clark, R. B. (2001). *Marine pollution*. Oxford University Press. https://books.google.com/books/about/Marine_Pollution.html?hl=pt-PT&id=RTkQywEACAAJ
- Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., Gilbert, D., Thomas, W. K., Tucker, A., Oakley, T. H., Tokishita, S., Aerts, A., Arnold, G. J., Basu, M. K., Bauer, D. J., Cáceres, C. E., Carmel, L., Casola, C., Choi, J. H., Detter, J. C., Dong, Q., Dusheyko, S., Eads, B. D., ... Boore, J. L. (2011). The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, 331(6017), 555–561. <https://doi.org/10.1126/science.1197761>
- Ebert, D. (2005). Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. *Ecology, Epidemiology, and Parasitism in Daphnia*, 1–25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036/>
- Ebert, D. (2022). *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. In *EvoDevo* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>
- Evelyn H. W. Heugens, Tjalling Jager, Reanne Creyghton, Michiel H. S. Kraak, A. Jan Hendriks, Nico M. Van Straalen, & Andwim Admiraa. (2003). *Temperature-Dependent Effects of Cadmium on Daphnia magna: Accumulation versus Sensitivity*. <https://doi.org/10.1021/es0264347>
- Foulkes, E. C. (1990). *Biological effects of heavy metals*.
- Glaholt, S. P., Kennedy, M. L., Turner, E., Colbourne, J. K., & Shaw, J. R. (2016a). Thermal variation and factors influencing vertical migration behavior in *Daphnia* populations. *Journal of Thermal Biology*, 60, 70–78. <https://doi.org/10.1016/J.JTHERBIO.2016.06.008>

- Glaholt, S. P., Kennedy, M. L., Turner, E., Colbourne, J. K., & Shaw, J. R. (2016b). Thermal variation and factors influencing vertical migration behavior in *Daphnia* populations. *Journal of Thermal Biology*, 60, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.06.008>
- Heugens, E. H. W., Tokkie, L. T. B., Kraak, M. H. S., Hendriks, A. J., Van Straalen, N. M., & Admiraal, W. (2006). Population growth of *Daphnia magna* under multiple stress conditions: Joint effects of temperature, food, and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(5), 1399–1407. <https://doi.org/10.1897/05-294R.1>
- Inácio, A. P., Martins, D., Silva, L., Cardoso, R., & Fonseca, V. (2010). Factores condicionantes da reprodução em *Daphnia magna*. *Universidade de Aveiro*.
- Joseph, P. (2009). *Mechanisms of cadmium carcinogenesis* ☆. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.011>
- Lamkemeyer, T., Zeis, B., & Paul, R. J. (2011). Temperature acclimation influences temperature-related behaviour as well as oxygen-transport physiology and biochemistry in the water flea *Daphnia magna*. <https://doi.org/10.1139/Z03-001>, 81(2), 237–249. <https://doi.org/10.1139/Z03-001>
- Lordan, R., & Zabetakis, I. (2022). Cadmium: A Focus on the Brown Crab (*Cancer pagurus*) Industry and Potential Human Health Risks. In *Toxics* (Vol. 10, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxics10100591>
- Maulvault, A. L., Cardoso, C., Nunes, M. L., & Marques, A. (2013). Risk-benefit assessment of cooked seafood: Black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) and edible crab (*Cancer pagurus*) as case studies. *Food Control*, 32(2), 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.026>
- Micael Mendes Neves. *Respostas bioquímicas e populacionais de Daphnia a um herbicida*. (2012).
- Na, J., Kim, Y., Song, J., Shim, T., Cho, K., & Jung, J. (2021). Evaluation of the combined effect of elevated temperature and cadmium toxicity on *Daphnia magna* using a simplified DEBtox model. *Environmental Pollution*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118250>
- Pereira, J. (2008). *Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes condições de stress*.
- Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. In *Caspian Journal of Internal Medicine* (Vol. 8, Issue 3, pp. 135–145). Babol University of Medical Sciences. <https://doi.org/10.22088/cjim.8.3.135>
- Reis Ana. (2008). *Impacto do mecurio ria de Aveiro*. 1–126.
- Sarma, S. S. S., & Nandini, S. (2006). Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans. *Journal of Environmental Science and Health*, 41(8), 1417–1430. <https://doi.org/10.1080/03601230600964316>
- Šimeček, P., & Šimečková, M. (2013). Modification of Tukey's additivity test. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 143(1), 197–201. <https://doi.org/10.1016/J.JSPI.2012.07.002>

- Singh, A., Sharma, A., Verma, R. K., Chopade, R. L., Pandit, P. P., Nagar, V., Aseri, V., Choudhary, S. K., Awasthi, G., Awasthi, K. K., Sankhla, M. S., Singh, A., Sharma, A., Verma, R. K., Chopade, R. L., Pandit, P. P., Nagar, V., Aseri, V., Choudhary, S. K., ... Sankhla, M. S. (2022). Heavy Metal Contamination of Water and Their Toxic Effect on Living Organisms. *The Toxicity of Environmental Pollutants*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.105075>
- Traudt, E. M., Ranville, J. F., & Meyer, J. S. (2017). Effect Of Age On Acute Toxicity Of Cadmium, Copper, Nickel, And Zinc In Individual-Metal Exposures To *Daphnia magna* Neonates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *36*(1), 113. <https://doi.org/10.1002/ETC.3507>
- Vergauwen, L., Hagenars, A., Blust, R., & Knapen, D. (2013). Aquatic Toxicology Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. *Aquatic Toxicology*, *126*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.004>
- WYATT, G. R., LOUGHHEED, T. C., & WYATT, S. S. (1956). The chemistry of insect hemolymph; organic components of the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, and two other species. *The Journal of General Physiology*, *39*(6), 853–868. <https://doi.org/10.1085/jgp.39.6.853>