

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA
RAMO TECNOLOGIAS DE PROTECÇÃO AMBIENTAL



Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nuno Roberto Brandão de Brito

Outubro, 2011

Orientação: Doutor Eduardo Jorge Valente Soares

MESTRADO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TECNOLOGIAS DE PROTECÇÃO AMBIENTAL

Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nuno Roberto Brandão de Brito

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO
PORTO COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM
TECNOLOGIAS DE ENGENHARIA AMBIENTAL.

ORIENTADOR: Doutor Eduardo Jorge Valente Soares



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Outubro 2011

Agradecimentos

Não teria sido possível concluir este trabalho sem a ajuda de diversas pessoas.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha mais sincera e profunda gratidão ao meu orientador, Professor Eduardo Soares, por me dar a oportunidade de trabalhar numa área tão interessante e abrangente, pela paciência, pela transmissão de conhecimentos e pela orientação que me proporcionou durante todo este processo.

Gostaria de agradecer ao Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto e ao Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia (IBB), pelas facilidades em termos de equipamentos e financiamento necessários à realização desta tese de mestrado.

Agradeço também a ajuda da Doutora Manuela Machado, por todo o apoio, disponibilidade, incentivo e conhecimento partilhado para a elaboração deste trabalho.

A todos os meus incríveis amigos, em particular, à Laura Sousa, à Filipa Bessa, ao Hélder Gonçalves e ao Álvaro Torrinha, por todo o apoio, motivação e energia positiva partilhados durante todos estes anos.

Ao Dr. António Maia, pela disponibilidade e a vontade que sempre demonstrou, libertando a minha agenda profissional na realização deste trabalho.

Um agradecimento especial, de forma muito carinhosa, à minha avó, aos meus irmãos e aos meus pais, pela possibilidade e apoio fornecidos para usufruir deste trabalho, tão enriquecedor para a minha vida futura, dando rumo a um sonho.

E, finalmente, gostaria de agradecer à Tânia Barros, pela sua compreensão, amizade e apoio, principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida.

A todos, o meu muito Obrigado.

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Resumo

O impacto dos metais pesados em ambientes aquáticos, incluindo águas residuais, é vulgarmente determinado através de testes de toxicidade. A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* é usada nos métodos de toxicidade recomendados por organismos Internacionais como a EPA (*Environmental Protection Agency*) e a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico).

O presente trabalho teve como objectivo avaliar o impacto do cádmio e do zinco no crescimento, na autofluorescência e na actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. Para tal, a alga, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada no meio de cultura contendo Cd (150, 500 ou 700 nmol/l) ou Zn (300, 1800 ou 6000 nmol/l). A concentração mais baixa de Cd e Zn não provocou qualquer efeito inibitório. Para uma concentração intermédia de Cd e Zn, observou-se uma redução do crescimento, ao fim de 72 h, de 63 e 50 %, respectivamente. No caso da concentração mais elevada de Cd e de Zn, observou-se uma redução do crescimento, ao fim de 72 h, de 83 e 97 %, respectivamente. A perda de autofluorescência da alga, devido à presença de Cd e de Zn, seguiu um padrão similar ao efeito sobre o crescimento. Resultados preliminares mostraram que a exposição das células de *P. subcapitata* a 700 nmol/l de Cd, durante 1h, induziu uma inibição da actividade esterásica de 52 %, enquanto que a incubação com 6000 nmol/l de Zn, durante 6 h, provocou uma redução da actividade esterásica de ~ 50 %.

Em conclusão, os resultados obtidos mostram que o Cd é mais tóxico que o Zn para a alga *P. subcapitata*. A perda de autofluorescência, devido à exposição aos metais pesados em estudo, ocorreu segundo um padrão similar ao efeito inibitório sobre o crescimento. O Cd e Zn provocaram uma rápida perda (no espaço de 6 h) da actividade esterásica. Estes resultados sugerem que a avaliação da actividade esterásica da alga *P. subcapitata* poderá constituir um indicador sensível na avaliação da toxicidade.

Palavras-chave: autofluorescência; cádmio; diacetato de fluoresceína (DAF); microalga; *Pseudokirchneriella subcapitata*; toxicidade; zinco.

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Abstract

The impact of heavy metals in aquatic environments, including sewage, is commonly evaluated using toxicity tests. The microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* is used in the toxicity methods recommended by international agencies, such as EPA (Environmental Protection Agency) or OECD (Organization for Economic Cooperation and Development).

The aim of the present work was to assess the impact of cadmium and zinc on growth, autofluorescence and metabolic activity of the algae *P. subcapitata*. Thus, the algae, in the exponential phase of growth, was inoculated in culture medium containing Cd (150, 500 or 700 nmol/l) or Zn (300, 1800 or 6000 nmol/l). The lowest concentration of Cd or Zn did not cause any inhibitory growth effect. For an intermediate concentration of Cd and Zn, a reduction of the growth of 63 and 50 %, respectively, was observed after 72 h of growth. In the case of the highest concentration of Cd and Zn, a reduction of growth, after 72 h, of 83 and 97 %, respectively, was observed. The loss of autofluorescence of the algae, due to the presence of Cd and Zn, followed a similar pattern to the effect on growth. Preliminary results showed that exposition of cells of *P. subcapitata* to 700 nmol Cd, for 1 h, induced an inhibition of esterase activity of 52 %, whereas incubation with 6000 nmol/l Zn, for 6 h, caused a reduction of ~ 50 % of esterase activity.

In conclusion, the results show that Cd is more toxic than Zn to the algae *P. subcapitata*. The loss of autofluorescence, due to exposure to heavy metals, under study, followed a similar pattern to the inhibitory effect on growth. The Cd and Zn caused a rapid loss (within 6 h) of esterase activity. These results suggest that evaluation of the esterase activity of the algae *P. subcapitata* could be a sensitive indicator for assessing the toxicity.

Keywords: autofluorescence; cadmium fluorescein diacetate (FDA); microalgae; *Pseudokirchneriella subcapitata*; toxicity, zinc.

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Índice

<i>Índice</i>	xi
<i>Índice de tabelas</i>	xiii
<i>Índice de figuras</i>	xv
<i>Capítulo 1 - Introdução</i>	1
1.1. A poluição	3
1.1.1. A poluição das águas	3
1.1.2. Poluição marinha.....	4
1.1.3. Poluição por metais pesados	5
1.1.4. Principais fontes poluidoras por metais pesados.....	5
1.1.5. Efeitos tóxicos tóxicos de metais pesados.....	6
1.1.6. Características gerais de alguns metais pesados.....	7
1.1.7. Remoção de metais pesados das águas	10
1.2. As algas na avaliação da toxicidade	11
1.2.1. Ecotoxicologia.....	11
1.2.2. Ensaio toxicidade crónica e aguda.....	12
1.2.3. As algas	13
1.2.4. A alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	14
<i>Capítulo 2 – Materiais e Metodos</i>	15
2.1. Microrganismos, meio de cultura e condições culturais.....	17

2.2.	Preparação das suspensões celulares	18
2.3.	Contacto das algas com os metais pesados.....	19
2.4.	Avaliação da concentração celular	19
2.5.	Avaliação da autofluorescência.....	20
2.6.	Avaliação da actividade metabólica.....	20
2.7.	Observação microscópica da <i>P. subcapitata</i>	21
2.8.	Reprodutibilidade de resultados.....	21
<i>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</i>		23
3.1.	Efeito do Cd e Zn no crescimento celular.....	25
3.2.	Efeito do Cd e Zn na autofluorescência.....	31
3.3.	Efeito do Cd e Zn na actividade metabólica.....	35
<i>Capítulo 4 – Conclusão.....</i>		39
<i>Capítulo 5 – Trabalhos Futuros.....</i>		43
<i>Capítulo 6 – Referências Bibliográficas.....</i>		47

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de fontes poluidoras de metais pesados.	6
Tabela 2- Composição do meio de cultura para algas.....	17

Índice de Figuras

Figura 1. Microalgas utilizadas em ensaios.....	13
Figura 2. Fotografia de microscopia de contraste de fase da alga <i>P. subcapitata</i>	25
Figura 3. Evolução do crescimento da alga <i>P. subcapitata</i> na presença de diferentes concentrações de Cd. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo as seguintes concentrações cádmio: (■) 150, (▲) 500 ou (◇) 700 nmol/l. Células na ausência de Cd (●) – controlo.....	27
Figura 4. Inibição do crescimento da alga <i>P. subcapitata</i> devido à presença de Cd .	27
Figura 5. Efeito da presença de Cd no tempo de duplicação (Td) da alga <i>P. subcapitata</i>	28
Figura 6. Evolução do crescimento da alga <i>P. subcapitata</i> na presença de diferentes concentrações de Zn. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo as seguintes concentrações de Zn: (■) 300, (▲) 1800 ou (◇) 6000 nmol/l. Células na ausência de Zn (●) – controlo.	28
Figura 7. Inibição do crescimento da alga <i>P. subcapitata</i> devido à presença de Zn. .	29
Figura 8. Efeito da presença de Zn no tempo de duplicação (Td) da alga <i>P. subcapitata</i>	29
Figura 9. Autofluorescência da alga da alga <i>P. subcapitata</i> . Fotografia de microscopia de fluorescência (a); fluorescência e contraste de fase em simultâneo (b).	31
Figura 10. Evolução da autofluorescência da alga <i>P. subcapitata</i> durante o crescimento na presença de diferentes concentrações de Cd. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo (■) 150, (▲) 500 ou (◇) 700 nmol/l de Cd. Células na ausência de Cd (●) – controlo.	32
Figura 11. Efeito da presença de Cd na autofluorescência da alga <i>P. subcapitata</i> . Percentagem da autofluorescência, ao fim de 72 h (F), sobre a fluorescência no controlo (F0), para o mesmo tempo.	33

Figura 12. Evolução da autofluorescência da alga *P. subcapitata* durante o crescimento na presença de diferentes concentrações de Zn. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo (■) 300, (▲) 1800 ou (◇) 6000 nmol/l de Zn. Células na ausência de Zn (●) – controlo. ..34

Figura 13. Efeito da presença de Zn na autofluorescência da alga *P. subcapitata*. Percentagem da autofluorescência, ao fim de 72 h (F), sobre a fluorescência no controlo (F0), para o mesmo tempo.34

Figura 14. Avaliação da actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. As algas foram incubadas na presença de diacetato de fluoresceína, como descrito nos materiais e métodos. Fotografia de microscopia de fluorescência de células metabolicamente activas (a); células metabolicamente inactivas (c). Fotografias de contraste de fase das mesmas células (b) e (d).35

Figura 15. Efeito da presença de Cd na actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. As células em fase exponencial de crescimento foram expostas a 700 nmol/l Cd. Subsequentemente, as algas foram removidas do meio de cultura, lavadas e incubadas na presença de diacetato de fluoresceína, como descrito nos materiais e métodos.....36

Figura 16. Efeito da presença de Zn na actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. As células em fase exponencial de crescimento foram expostas a 6000 nmol/l Zn. Subsequentemente, as algas foram removidas do meio de cultura, lavadas e incubadas na presença de diacetato de fluoresceína, como descrito nos materiais e métodos.....37

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Capítulo 1 – Introdução

1.1. A Poluição

A poluição constitui um dos impactos mais significativos e negativos da actividade humana sobre a vida tal como a conhecemos e vivemos. Quando falamos em poluição, associamos imediatamente a uma prática de libertação de substâncias tóxicas para o meio ambiente, provocando danos, muitas vezes, irreparáveis.

Vivemos numa sociedade bastante evoluída em termos de tecnológicos. No entanto, muita da tecnologia está ligada à indústria de produção em serie que normalmente trabalha com materiais extremamente poluentes e com energias fósseis. Este crescimento tecnológico está, portanto, ligado ao aumento do nível de poluição atmosférica, hídrica e mesmo poluição sonora.

A poluição é, desde alguns anos, um dos problemas mais preocupantes da humanidade. Por isso, são realizados tratados tendo por fim a adopção de medidas de controlo, através da imposição de regras à actividade industrial, de incentivos no investimento em tecnologias de reciclagem e de uso de energias renováveis, ou apelando à alteração do comportamento quotidiano dos cidadãos.

1.1.1. A poluição das águas

Ainda não há muito tempo, a água era considerada um recurso natural inesgotável. No entanto, esta ideia tem vindo a mudar devido à forma como o Homem utiliza e polui este bem essencial. Deste modo, a poluição das águas é um problema que afecta toda a sociedade, podendo provocar graves consequências no nosso quotidiano.

O Homem é o principal responsável pela poluição da água. E fá-lo de diversas formas: através dos esgotos domésticos, por derrame de substâncias tóxicas, através de descargas de efluentes industriais ou do uso de pesticidas na agricultura.

Embora a imagem do planeta Terra, visto do espaço, transmita a ideia que existe muita quantidade de água distribuída pelos rios, lagos e mares, a verdade é que apenas uma pequena parcela (cerca de 1%), pode ser considerada água limpa para uso quotidiano. Isto significa que o nosso planeta corre graves riscos de estagnar o seu desenvolvimento.

Com a poluição e contaminação das águas, verificamos que várias espécies podem estar em risco de morte. Além dos efeitos nefastos para as espécies marinhas, esta contaminação arrasta consigo graves consequências para o Homem. A água é um componente vital no sistema de sustentação da vida na Terra. Se esta estiver poluída, poderá provocar doenças ou mesmo a morte (Fellenberg, 1980).

1.1.2. Poluição marinha

A poluição dos mares pode ser provocada por inúmeros factores e elementos poluentes, mas grande parte da responsabilidade do aumento dos níveis de compostos tóxicos das águas, principalmente nas zonas costeiras, deve-se ao desenvolvimento industrial insustentável. A sociedade está cada vez mais industrializada, e o mar é visto como um “deposito” e meio natural de depuração, através dos seus ciclos biológicos. Porém, esta capacidade regeneradora tem os seus limites.

Os poluentes, quer de origem doméstica quer de origem industrial, podem causar efeitos catastróficos para as comunidades costeiras, uma vez que podem percorrer toda a cadeia trófica marinha, desde o fitoplâncton até aos moluscos e peixes ingeridos pelo homem. A falta de controlo da descarga de efluentes domésticos e industriais, nos meios marinhos, é a grande responsável pelo aparecimento de microrganismos nas zonas costeiras (Rúbio *et al.*, 1990). No entanto, a poluição química das águas do mar apresenta, geralmente, uma maior importância do que a poluição biológica. Detergentes e pesticidas são, todos os dias, arrastados pelas águas pluviais, tendo assim um efeito extremamente nocivo sobre a fauna e a flora.

A poluição devido a hidrocarbonetos é uma das principais formas de poluição marinha. Os grandes derrames provenientes de acidentes com navios, dão origem

às chamadas “marés negras” e são sempre muito mediáticos. Mas a verdade é que todos os produtos petrolíferos têm um efeito extremamente nefasto sobre a vida marinha. A maior parte dos hidrocarbonetos espalhados nos mares e oceanos têm origem na limpeza dos depósitos dos grandes petroleiros, efectuadas em “alto mar”. Estas acções, condenáveis, contribuem para a destruição do ecossistema marinho: o elevado teor de hidrocarbonetos dificulta a fotossíntese e a oxigenação das águas e pode levar à intoxicação de muitos animais (Rúbio *et al.*, 1990).

1.1.3. Poluição por metais pesados

Os metais pesados são utilizados no fabrico de vários utensílios com grande utilidade no dia-a-dia, como por exemplo: canos, baterias e pilhas. No entanto, os metais pesados podem ser um dos principais agentes tóxicos (Cunha, 1987).

Os metais pesados são elementos químicos, de natureza metálica, os quais podem apresentar efeitos adversos à saúde humana. A quantidade de metais pesados introduzida na água com origem antropogénica, é muito maior do que a de origem natural. E, ao contrário da maioria dos compostos orgânicos, os metais pesados não são biodegradados permanecendo, indefinidamente, na natureza.

1.1.4. Principais fontes poluidoras por metais pesados

Os metais pesados integram os ciclos biogeoquímicos do planeta. A erosão é um fenómeno natural que provoca a dissolução de diversos componentes da natureza, promovendo a transmissão de metais aos solos, ao ar e à água, correndo o risco destes serem incorporados na cadeia alimentar (Castro *et al.*, 2005).

O acentuado desenvolvimento tecnológico, observado nas últimas décadas, teve como consequência um aumento do bem-estar do homem; contudo, tem arrastado, também, consigo um impacto negativo no meio ambiente, comprometendo a sua qualidade de vida. A principal fonte de poluição das águas, por metais pesados, esta relacionada com as descargas de efluentes de origem industrial como aqueles que são originados das fábricas de extracção de metais, das empresas de electrodeposição ou produção de energia (Tabela 1); além destas fontes, os metais pesados podem ainda estar presentes em efluentes de indústrias

químicas, como a responsável de produção de compostos orgânicos e outros elementos inorgânicos, indústrias de couro, peles, têxtil, ferro e aço, lavandarias e indústrias petrolíferas (ICHME, 1981).

Tabela 1. Exemplos de fontes poluidoras de metais pesados*.

Indústria	Metais	Possíveis Interferentes
Mineira	Aniões - Cr, As, Se,... Catiões - Cu, Zn, Pb, Mn,...	Sulfatos, Fosfatos Fe, Al
Galvanoplastias	Cr, Ni, Cd, Zn	Fe, compostos surfactantes
Processamento de metais	Cu, Zn, Mn	Fe, Al, compostos surfactantes
Geração de energia por carvão	Cu, Cd, Mn, Zn, . . .	Fe, Al
Nuclear	U, Th, Ra, Sr, Eu, Am, . .	Fe

* Adaptado de Volesky (2001).

1.1.5. Efeitos tóxicos dos metais pesados

No passado, os efeitos tóxicos dos metais eram considerados como eventos de curto prazo, agudos e evidentes. É exemplo a diarreia sanguinolenta, provocada pela ingestão de mercúrio (Ávila Campos, 2008). Actualmente, observam-se efeitos a médio e longo prazo, o que torna difícil a distinção do seu efeito com a provocada por outros agentes tóxicos.

A presença de metais afecta praticamente todas as formas de vida, dependendo da concentração e da forma química (por exemplo, estado de oxidação) em que se encontram. Alguns metais são essenciais ao crescimento dos seres vivos, actuando como co-factores enzimáticos e/ou estabilizando estruturas

celulares; no entanto, estes mesmos metais, acima de determinada concentração exercem efeitos tóxicos.

De acordo com Ávila-Campos (2008), os metais podem ser classificados em:

- Elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio;
- Elementos micro-contaminantes ambientais: arsénio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungsténio;
- Elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: crómio, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel.

As pessoas mais idosas, assim como as crianças, parecem ser mais susceptíveis ao efeito tóxico dos metais pesados, pelo facto de apresentarem um índice de absorção gastrointestinal mais elevado.

1.1.6. Características gerais de alguns metais pesados

COBRE

O cobre é um dos metais encontrados na superfície terrestre, muitas vezes associado ao ferro, carbono e oxigénio. É um elemento químico essencial aos processos fisiológicos e bioquímicos, uma vez que faz parte de diversas enzimas, participa no metabolismo celular e, nos animais, participa no transporte de ferro. Contudo, quando em elevadas concentrações e por períodos prolongados de exposição, o cobre apresenta efeitos tóxicos, podendo causar a morte dos seres vivos (Oliveira, 2003).

As formas tóxicas de cobre incluem CuCO_3 , $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$, CuOH^+ ; contudo, a espécie química Cu^{2+} é considerada a forma mais tóxica. O cobre é um dos metais mais tóxicos para os peixes, sendo responsável por uma rápida perda de electrólitos. O cobre, assim como outros metais pesados, é transportado, no sangue dos animais, ligado a proteínas. Os peixes quando expostos por longos períodos a concentrações tóxicas de cobre, apresentam vários distúrbios como sejam: problemas de crescimento, anormalidades corporais, aumento no tamanho dos

ovos, aumento na mortalidade de embriões, alterações histopatológicas nas brânquias e fígado e peroxidação dos lípidos (Oliveira, 2003).

O cobre é considerado um nutriente essencial para a sobrevivência das bactérias e fungos do solo, podendo tornar-se tóxico quando a concentração for superior a 750 mg/g (Santos, 2006).

NÍQUEL

O níquel é um elemento químico, metálico, que se encontra na Natureza sob a forma de sulfuretos. As suas propriedades de resistência, principalmente à oxidação e aos compostos de hidróxido alcalinos, tornam este metal fundamental na combinação com outros metais para formar misturas chamadas ligas. Os elementos que, geralmente, entram na constituição de ligas metálicas, com o níquel, são o cobre, o ferro, o crómio e o zinco. Estas ligas possuem uma enorme capacidade de suportar certos fenómenos naturais como corrosão ou temperatura elevada tornando-as assim peças fundamentais na produção de moedas e jóias, bem como na produção de válvulas e permutadores de calor. Muitos compostos originados do níquel são usados no processo de niquelagem, na indústria cerâmica, na produção de baterias e como catalisadores químicos (ATSDR, 1996).

As referências sobre a toxicidade do níquel são um pouco escassas, no entanto, é possível que muitas pessoas desenvolvam dermatites devido ao contacto da pele com níquel. Alguns compostos de níquel são carcinogénicos para os seres humanos. O Níquel, sob a forma de complexo, é tóxico a baixos valores de pH. A concentração de 1 mg/L de níquel é o suficiente para ter um teor tóxico considerável em qualquer tipo de organismo de água doce (ATSDR, 1996).

ZINCO

O zinco é um elemento presente na crosta terrestre. A maior parte do zinco encontra-se na natureza sob a forma de sulfureto de zinco. Na forma elementar, é um metal branco-azulado, brilhante, podendo ser encontrado na atmosfera, no solo, na água, e nos alimentos (ATSDR, 2006).

O zinco é usado em indústrias de galvanização, no revestimento de ferro e outros metais, para impedir a corrosão. É também usado para formar ligas como o

latão e bronze. Os compostos de zinco são ainda usados na indústria de tintas e cerâmica (ATSDR, 2006).

Tal como o ferro, o cobre e o níquel, o zinco é um elemento mineral necessário em pequenas quantidades. Nos seres humanos exerce um efeito benéfico sobre a actividade da insulina. A deficiência do zinco nos seres vivos pode provocar atraso de crescimento, atraso na cicatrização de feridas, doenças renais crónicas e outros sintomas (Oliveira, 2007). Contudo, em concentrações elevadas, o zinco é tóxico para os seres vivos. O zinco está presente na água potável. A ingestão de água ou outras bebidas, caso sejam armazenados em recipientes deste metal, podem conter altos níveis de zinco (ATSDR, 2006). Os padrões, para águas de abastecimento público, indicam o valor de 5 mg/l como valor máximo. Acima deste limite, o zinco confere à água um sabor desagradável, tornando-se imprópria para o consumo humano (<https://sites.google.com/site/omarquenosrodeia/poluio>).

CÁDMIO

O cádmio é muito importante a nível industrial, sendo particularmente usado na indústria de galvanoplastia. Surge na natureza quase sempre associado ao zinco, cobre ou chumbo e pode ser dissolvido por soluções ácidas ou por nitrato de amónio (Lobo, 2011).

A agricultura constitui uma das fontes de poluição por cádmio, através da utilização de fertilizantes ricos em fosfatos. A absorção de cádmio pelas plantas é tanto maior quanto menor for o pH do solo (Lobo, 2011).

Na água, a concentração do cádmio é inversamente proporcional ao pH e à concentração de matéria orgânica, ocorrendo no estado de oxidação +2. Por esta razão, o cádmio não é afectado pelo potencial de oxidação-redução da água. O cádmio é mais tóxico na forma iónica, sendo esta a forma dominante em ambientes aquáticos de baixa salinidade (Pietrobeli, 2007).

A remoção do cádmio pelos sedimentos pode realizar-se através de fenómenos de precipitação e adsorção. Estes realizam-se na superfície de componentes minerais, óxidos, hidróxidos de metais ou de matéria orgânica. Os ácidos húmicos são os principais componentes responsáveis pela adsorção, a qual

aumenta com o aumento do valor de pH. A complexação do cádmio com cloretos aumenta com a salinidade. Em ambientes marinhos o Cd existe essencialmente sob a forma de cloro-complexos ($[\text{CdCl}]^+$, $[\text{CdCl}_2]$, $[\text{CdCl}_3]^-$) (Sanches, 2008).

A bioacumulação do cádmio, pode ser realizada tanto pelos organismos aquáticos como pelos terrestres. A absorção deste metal aumenta nos períodos de alguma deficiência de outros metais como o ferro, e com o aumento de gorduras. A concentração deste metal em animais que se alimentam em ecossistemas poluídos por cádmio, correm o risco de acumular quantidades tais que se tornam perigosas para aqueles que se encontram no patamar seguinte da cadeia alimentar, normalmente, o Homem (Oliveira, 2007).

1.1.7. Remoção de metais pesados das águas

A poluição através de metais pesados é um grave problema da sociedade actual. Estudos na área ambiental tentam consciencializar a sociedade para o facto de 1 % do lixo urbano, constituído por resíduo sólidos, conter elementos tóxicos. Estes resíduos têm origem em lâmpadas fluorescentes, termómetros, latas de insecticidas, pilhas, baterias, tintas, entre outros produtos, existindo uma profunda ignorância, na maior parte da população, sobre a presença de substâncias tóxicas nesses resíduos (Tenório e Espinosa, 2008).

O processo mais eficaz de remoção de metais pesados, é a permuta iónica. Esta tecnologia baseia-se na troca de iões de uma resina com outros iões existentes numa determinada solução, neste caso na água. Em função dos iões que se pretendem permutar, as resinas designam-se resinas catiónicas ou resinas aniónicas. A introdução destas resinas, permite assim remover grande parte dos metais presentes na água, viabilizando a utilização desta para actividade industrial (Angerer e Schaller, 1988). No entanto, o avanço tecnológico na área de tratamentos de água aponta para a possibilidade de se utilizar processos de osmose inversa para a remoção de metais pesados das águas, o qual pode ser usado como o ponto final do tratamento (Ferreira *et al.*, 2007).

Para além da troca iónica e da osmose inversa, têm sido utilizadas outras técnicas para o tratamento de efluentes industriais contendo metais pesados, como

seja: precipitação alcalina, adsorção a carvão activado ou técnicas electroquímicas. Contudo, estas técnicas físico-químicas, convencionais, podem não ser completamente eficientes (caso da precipitação e das técnicas electroquímicas), ou apresentam custos elevados (tecnologias de membrana e resinas de troca iónica), quando aplicadas a largos volumes de águas residuais contendo baixas concentrações (1-100 mg/L) de metais pesados. As desvantagens apresentadas pelas técnicas acima referidas têm levado ao desenvolvimento de processos alternativos, utilizando vários tipos de materiais biológicos (algas, bactérias, fungos, filamentosas e leveduras) no tratamento de efluentes industriais contendo metais pesados (Volesky, 2001, 2003; Soares *et al.*, 2011).

1.2. As Algas na Avaliação da Toxicidade

1.2.1. Ecotoxicologia

Os efeitos tóxicos dos metais pesados podem manifestar-se em três momentos: durante a exposição à fonte de metais, no final dessa exposição, ou podem ainda manifestar-se após um determinado tempo de exposição. Estes momentos são determinados pelas características dos diferentes metais em causa.

A monitorização ambiental e biológica deste tipo de poluição é auxiliada por muitas áreas da ciência, entre elas a ecotoxicologia, a qual foi definida, como “o ramo da Toxicologia que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, naturais e artificiais, sobre os organismos vivos, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres, que constituem a biosfera” (Blaise e Vasseur, 2005). A ecotoxicologia permite estudar tanto a acção dos agentes tóxicos no meio ambiente, como a interferência destes com os ecossistemas envolventes (Connell *et al.*, 1999).

Os testes ecotoxicológicos têm vindo a ser reconhecidos como uma das formas mais eficazes na avaliação do impacte ambiental de substâncias químicas (Timbrel, 1995). Permitem efectuar uma análise de risco, identificando os efeitos adversos, em resultado da exposição do ecossistema a um ou a mais factores de stress ambiental. Para isso, são utilizados bio-indicadores, isto é, organismos que reagem a alterações ambientais, que são passíveis de serem observadas, avaliadas e medidas. Nestes testes podem ser utilizados organismos aquáticos ou

terrestres, tendo sempre como meta o efeito nefasto que as substâncias químicas podem trazer ao ser humano (Massaro, 2011).

Vários estudos mostraram que as algas possuem uma sensibilidade mais elevada, relativamente aos invertebrados e aos peixes, para vários tipos de efluentes tóxicos, combustíveis, tintas, herbicidas ou detergentes (Geis *et al.*, 2000).

1.2.2. Ensaio de toxicidade crónica e aguda

A acção tóxica de um metal pesado sobre um dado ser vivo é função da concentração do metal e da duração da exposição ao mesmo (Rand e Petrocelli, 1985).

Nos diferentes estudos toxicológicos, os tóxicos podem apresentar efeitos agudos ou crónicos. Os efeitos agudos provocam nos organismos respostas rápidas e bruscas, quando expostos a uma determinada concentração de metal. Os efeitos crónicos provocam efeitos mais lentos que só se verificam ao longo do tempo através de alterações na reprodução, no crescimento ou no comportamento dos seres vivos. Estes efeitos são determinados através dos testes ecotoxicológicos, os quais permitem expor um determinado organismo, ou uma comunidade de organismos, a um agente tóxico, por um intervalo de tempo pré-definido. Normalmente, nos testes de toxicidade aguda, os organismos-teste são expostos a diferentes substâncias tóxicas por períodos de tempo que variam entre 24 e 96 horas, permitindo determinar a concentração do tóxico que, por exemplo, promove a morte de 50 % da população (DL_{50}) (Massaro, 2006).

Os testes de toxicidade crónica favorecem a avaliação dos efeitos de uma determinada substância tóxica, durante uma exposição mais prolongada, incluindo, por vezes, vários ciclos de vida do organismo em estudo. Os efeitos que podem ser analisados nestes testes abrangem mudanças no desenvolvimento, no crescimento, na fisiologia ou no próprio metabolismo (Rand e Petrocelli, 1985).

A monitorização dos ecossistemas aquáticos, o planeamento de políticas ambientais e o controlo das emissões de efluentes industriais só é possível graças ao uso dos testes ecotoxicológicos.

Na realização de testes ecotoxicológicos, um factor importante é a escolha do organismo-teste. A espécie em causa será indicador do efeito tóxico, e a resposta da mesma será usada para representar o nível trófico do ecossistema. Normalmente são usadas algas, bactérias, peixes ou invertebrados, pelo simples facto de serem mais sensíveis os efeitos tóxicos dos metais pesados. A selecção destes organismos tem em conta diversos critérios como a sensibilidade, o ciclo de vida, a facilidade de manutenção num laboratório, a biologia e ecologia do mesmo (Elder, 1989).

No caso dos produtores primários (1º nível trófico), são usadas, habitualmente, as algas verdes unicelulares (*Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlorella vulgaris*). Como representante dos consumidores primários (2º nível trófico), utilizam-se invertebrados como é o caso da *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*. Como consumidores terciários (4º nível trófico) são usados peixes das espécies *Poecilia reticulata* (conhecido como guppy) ou *Cyprinus rerio* (peixe zebra) (Scragg, 2005).

1.2.3. As algas

As algas são seres eucarióticos, unicelulares ou pluricelulares, apresentando algumas semelhanças com as plantas superiores. Exemplos dessas similaridades é a presença de pigmentos fotossintéticos (Figura 1), que tem a capacidade de transformar energia solar em biomassa, de produzir oxigénio e ter uma função activa no ciclo de nutrientes, servindo de alimento para os restantes organismos.



Figura 1 Microalgas utilizadas em ensaios

As algas podem ser móveis ou imóveis, e o tamanho das algas pode variar, uma vez que, existem algas microscópicas com apenas alguns microns de diâmetro, enquanto que algumas podem apresentar mais de um metro de comprimento.

As algas podem ser encontradas em praticamente todas as condições ambientais da Terra, desde solos férteis a desertos. Porém, são os meios aquáticos, quer de água salgada quer de água doce onde se encontra maior prevalência

destes organismos. Nestes meios, as algas desempenham um papel central, uma vez que constituem a base da cadeia alimentar, na qual funcionam como produtores primários, produzindo matéria orgânica e dióxido de carbono, além de servirem como fonte de oxigénio necessários para o metabolismo dos consumidores (Lee, 1989).

1.2.4. A alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente designada de *Selenastrum capricornutum* ou mais recentemente como *Raphidocelis subcapitata*) pertence à Classe das Clorofíceas, uma das classes de algas verdes. Esta alga ocorre em ambientes oligotróficos e eutróficos (Blaise e Vasseur, 2005).

A alga *P. subcapitata* encontra-se geralmente em águas doces, é uma alga verde unicelular, com um único cloroplasto longo e de cor verde brilhante. Esta cor brilhante deve-se essencialmente à presença de clorofila. A alga *P. subcapitata* reproduz-se assexuadamente através de auto-esporos. Outras características que tornam a alga um organismo-teste ideal, são o seu ciclo de vida curto e a facilidade de crescer em condições laboratoriais (Cerejeira *et al.*, 2005).

O cultivo desta alga exige certas condições ambientais de luz, oxigénio, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Meios pobres em oxigénio, e a ausência de luz, limitam o desenvolvimento desta alga. A alga *P. subcapitata* é capaz de viver em meios pobres em nutrientes. O fósforo e o azoto são os principais factores limitantes do seu crescimento. A temperatura óptima para o desenvolvimento desta alga é de 24 °C (Cerejeira *et al.*, 2005).

CAPITULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Capítulo 2. Materiais e métodos

2.1. Microrganismo, meio de cultura e condições culturais

Foi utilizada a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (estirpe 278/4). A estirpe foi originalmente obtida da *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP), Reino Unido. A alga foi mantida a 4 °C, no escuro, no meio de cultura para algas (OECD 1984), descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Composição do meio de cultura para algas.

Soluções Stock	Composto	Concentração da Solução Stock	Concentração final na Solução fina
Solução stock 1	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
Solução stock 2	FeCl ₃ .6H ₂ O	80 mg/l	0,08 mg/l
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mg/l	0,1 mg/l
Solução stock 3	H ₃ BO ₃	185 mg/l	0,185 mg/l
	MnCl ₂ .4H ₂ O	415 mg/l	0,415 mg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 x 10 ⁻³ mg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 x 10 ⁻³ mg/l
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg/l	10 ⁻⁵ mg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7 mg/l	7 x 10 ⁻³ mg/l
Solução stock 4	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l

Na preparação do meio de cultura foram utilizadas 4 soluções stock (Tabela 2). As soluções stock 1,2 e 3 foram esterilizadas por autoclavagem, enquanto a solução stock 4 foi esterilizada por filtração por membrana de 0,45 μm de porosidade. As soluções stock foram armazenadas a 4 °C, no escuro.

O meio de cultura foi preparado num balão volumétrico de 1 litro, adicionando 10.0 ml da solução stock 1, e 1.0 ml das soluções stock 2, 3 e 4, completando o volume com água desionizada. Após o controlo do pH ($7,5 \pm 0,1$), o meio de cultura foi esterilizado por filtração e transferido para um frasco de vidro estéril.

A pré-cultura de *P. subcapitata* foi preparada inoculando 100 ml de meio de cultura, em frascos Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, com uma concentração inicial de $\sim 5 \times 10^4$ células/ml. As algas foram incubadas durante 3-4 dias, a 25 °C, com uma agitação contínua de 100 rpm e uma iluminação constante de 3500 lux.

As culturas foram preparadas em 100 ou 400 ml de meio de cultura, em frascos Erlenmeyer de 250 ml ou 1 litro de capacidade, respectivamente, com uma concentração inicial de $\sim 5 \times 10^4$ células/ml, obtidas da pré-cultura com 3-4 dias; as algas foram incubadas nas condições descritas acima para a pré-cultura.

A pureza da cultura foi verificada, semanalmente, por observação microscópica de uma amostra.

Todo o material usado na preparação do meio de cultura e crescimento da alga foi lavado com detergente sem fosfatos. Posteriormente, foi descontaminado, colocando-se numa solução de HNO_3 a 10 % (v/v), durante uma noite. Após descontaminação, foi lavado com água desionizada e seco a 45 °C.

2.2. Preparação das suspensões celulares

As células da alga *P. subcapitata*, após 3-4 dias de crescimento, foram recolhidas por centrifugação (2500xg, 15 min). Em seguida as algas foram lavadas, duas vezes, com água desionizada; posteriormente ressuspendeu-se o sedimento em água desionizada, numa concentração de $\sim 4 \times 10^6$ células/ml.

2.3. Contacto das algas com os metais pesados

As algas, obtidas como descrito anteriormente, foram colocadas em 100 ou 400 ml de meio de cultura, em frascos Erlenmeyer de 250 ml ou 1 litro de capacidade, respectivamente. As suspensões celulares, numa concentração final de 5×10^4 células/ml, foram expostas a diferentes concentrações de CdCl_2 (150, 500 ou 700 nmol/l) ou de ZnCl_2 (300, 1800 ou 6000 nmol/l). Como controlo, as algas foram inoculadas no meio de cultura sem adição de cádmio ou zinco. As algas foram incubadas a 25 °C, com uma agitação contínua de 100 rpm e uma iluminação constante de 3500 lux.

2.4. Avaliação da concentração celular

A avaliação da concentração celular foi efectuada por espectrofotometria (UNICAM HELIOS λ) a 750 nm (U.S.-EPA 2002), após uma adequada diluição da amostra em água desionizada, tendo sido previamente construída uma curva de calibração (absorvância *versus* numero de células/ml). Em alternativa, foi determinada a concentração de algas utilizando um contador automático de células (TC10 Bio-Rad).

Na avaliação do crescimento celular, determinou-se a taxa específica de crescimento (μ). Este parâmetro é determinado durante a fase de crescimento exponencial (equação 1).

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{equação 1})$$

Em que: μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1})
 X_0 é a densidade populacional inicial
 X_t é a densidade populacional inicial após t horas,

A aplicação de logaritmos naturais a ambos os membros da equação:

$$\text{Ln}X_t = \text{Ln}X_0 + \mu t \quad (\text{equação 2})$$

Isto é,

$$\mu = \frac{\text{Ln}X_t - \text{Ln}X_0}{t} \quad (\text{equação 3})$$

A taxa específica de crescimento (μ) permite assim avaliar o aumento da densidade populacional, por unidade de tempo (equação 3).

O tempo de duplicação (t_d) de uma comunidade celular está relacionado com a taxa específica de crescimento e pode ser calculada através das equações 4:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{equação 4})$$

O tempo de duplicação (t_d) (também conhecido como tempo de geração) é o tempo necessário para que haja a duplicação da população celular.

2.5. Avaliação da autofluorescência

A avaliação da autofluorescência da alga *P. subcapitata* foi efectuada por análise fluorimétrica usando um leitor de microplacas (PerkinElmer, VICTOR³). Foram usadas placas de 96-poços e um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 680 nm. O valor da fluorescência (unidades relativas de fluorescência - URF) foi corrigido subtraindo o valor da autofluorescência do meio de cultura.

2.6. Avaliação da actividade metabólica

Antes e após 1h, 3h e 6h de contacto com os metais, foram retiradas amostras de 150 ml das culturas. As células foram recolhidas por centrifugação (2500xg, 5 min). Em seguida as algas foram lavadas duas vezes com água desionizada; posteriormente ressuspendeu-se o sedimento em meio de cultura, numa concentração de $\sim 1 \times 10^6$ células/ml.

A actividade metabólica foi avaliada usando diacetato de fluoresceína - DAF (Sigma-Aldrich). A alga (5×10^5 células/ml) foi incubada com 20 $\mu\text{mol/l}$ DAF, durante 40 minutos, a 25 °C, no escuro. A fluorescência foi medida num leitor de

microplacas, usando um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 535 nm. O valor da fluorescência foi corrigido subtraindo o valor da autofluorescência do meio de cultura, das células e do DAF.

2.7. Observação microscópica de *P. subcapitata*

As algas foram observadas usando um microscópio de fluorescência (Leica DLMB), equipado com uma lâmpada de mercúrio HBO-100 e um conjunto de filtros I3 (autofluorescência) e GFP (DAF) da Leica. As imagens foram adquiridas usando uma câmara Leica DC 300F e processadas utilizando o *software* Leica IM 50.

2.8. Reprodutibilidade dos resultados

Todas as experiências foram efectuadas em duplicado e repetidas, pelo menos, duas vezes. A medição da fluorescência foi efectuada em quadruplicado. Os resultados estão apresentados como a média \pm desvio padrão das medições efectuadas.

CAPITULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Capítulo 3. Resultados e discussão

3.1. Efeito do Cd e Zn no crescimento celular

A *Pseudokirchneriella subcapitata* é um organismo-teste, de grande importância para os ensaios ecotoxicológicos por se tratar de um produtor primário, compondo a base da cadeia alimentar. É uma alga representativa de águas doces eutróficas e oligotróficas, tendo sido demonstrada a sua sensibilidade a diversos compostos tóxicos, o que favorece o seu uso como indicador fiável de fitotoxicidade (Blaise and Vasseur 2005). Por esta razão, a EPA (*Environmental Protection Agency*) (U.S.-EPA 2002) e a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) (OECD 1984) preconizam a utilização desta alga na avaliação de toxicidade.

Tal como podemos observar na figura 2, a *P. subcapitata* é uma alga verde, unicelular, apresenta uma estrutura em forma de “C” e não têm tendência para se agregar. É uma alga imóvel e não apresenta polimorfismo, isto é, retêm a mesma forma ao longo do ciclo celular.

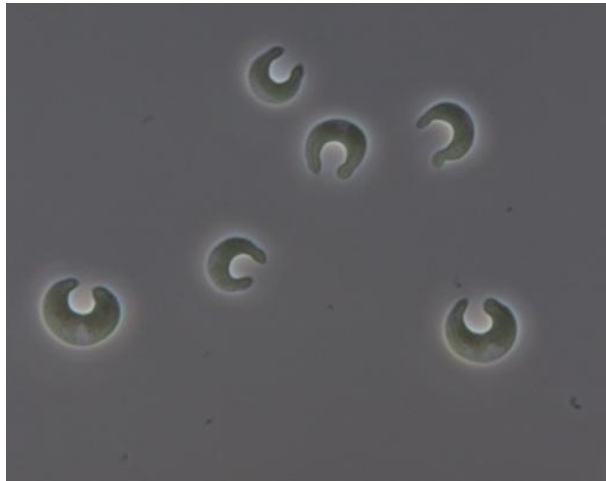


Figura 2. Fotografia de microscopia de contraste de fase da alga *P. subcapitata*.

Os metais pesados têm grande utilidade prática na nossa vida. São usados, por exemplo, no fabrico de utensílios, canos, baterias e pilhas. Contudo, constituem um dos principais agentes tóxicos conhecidos pelos seres humanos.

O impacto dos metais pesados em ambientes aquáticos é vulgarmente determinado através de testes de toxicidade utilizando invertebrados ou peixes. No entanto, tem-se verificado um interesse crescente na aplicação de microrganismos na realização de testes toxicológicos, devido à rapidez e simplicidade com que os testes podem ser executados e, ainda, devido ao seu baixo custo (Bitton 2005).

O presente trabalho teve como objectivo avaliar o impacto do Cd e Zn na alga *P. subcapitata*. Estes metais foram seleccionados uma vez que são poluentes vulgarmente encontrados em efluentes domésticos e, particularmente, em efluentes industriais, como é o caso das indústrias de electrodeposição.

O estudo teve início avaliando-se o efeito de três concentrações de Cd e Zn no crescimento da alga *P. subcapitata*. Para tal, a alga, em fase exponencial de crescimento, foi inoculada no meio de cultura, numa concentração final de 5×10^4 células/ml. Esta concentração celular é um pouco superior à utilizada nos ensaios de toxicidade crónica (1×10^4 células/ml), envolvendo esta alga, de acordo com a EPA (U.S.-EPA 2002) ou com a OCDE (OECD 1984).

Na ausência de metais, a alga *P. subcapitata* cresceu exponencialmente durante cerca de 3 dias, com um tempo de duplicação de ~12 h. A presença de uma baixa concentração de Cd (150 nmol/l, o que corresponde a 17 ppb) não provocou qualquer efeito sobre o crescimento da alga, até 96 h (Figura 3). Para esta concentração de metal, o número de células ao fim de 72 h foi idêntico ao do controlo (na ausência de metal) (Figura 4), uma vez que a alga cresceu com idêntico tempo de duplicação (figura 5). O aumento da concentração de Cd para 500 nmol/l (56 ppb), provocou uma redução de taxa de crescimento da alga e consequentemente um aumento do tempo de duplicação para ~16 h (figura 5), verificando-se uma inibição 63 % do crescimento, ao fim de 72 h (figura 4). A presença de 700 nmol/l de Cd (79 ppb) teve como consequência uma profunda redução do crescimento (83 %), ao fim de 72 h (Figuras 3 e 4), e um aumento do tempo de duplicação para cerca de 20 h (Figura 5).

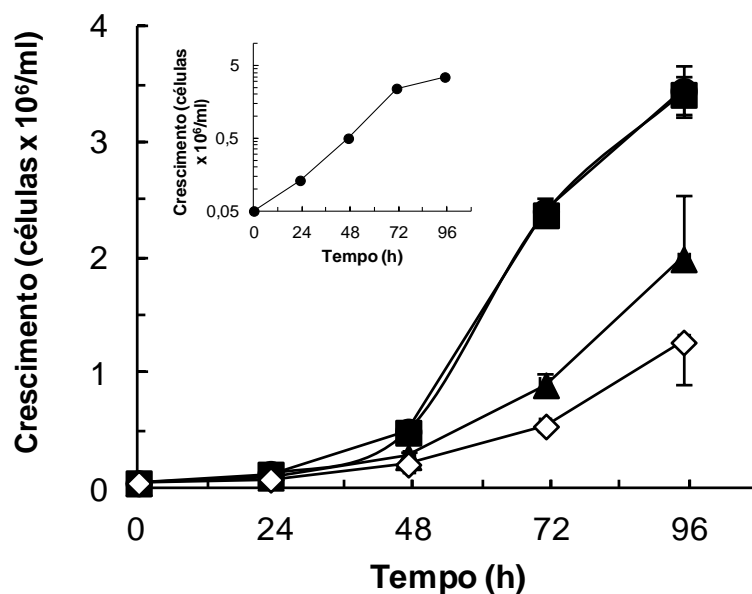


Figura 3. Evolução do crescimento da alga *P. subcapitata* na presença de diferentes concentrações de Cd. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo as seguintes concentrações cádmio: (■) 150, (▲) 500 ou (◇) 700 nmol/l. Células na ausência de Cd (●) – controlo.

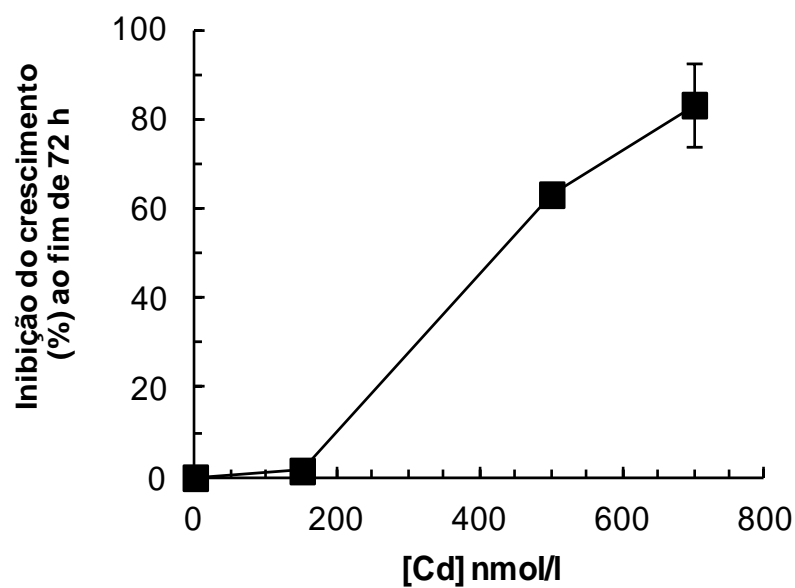


Figura 4. Inibição do crescimento da alga *P. subcapitata* devido à presença de Cd.

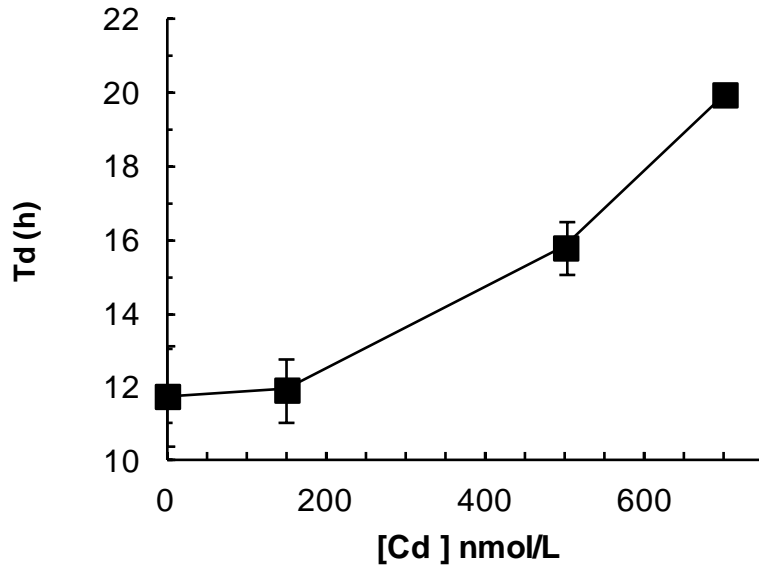


Figura 5. Efeito da presença de Cd no tempo de duplicação (Td) da alga *P. subcapitata*.

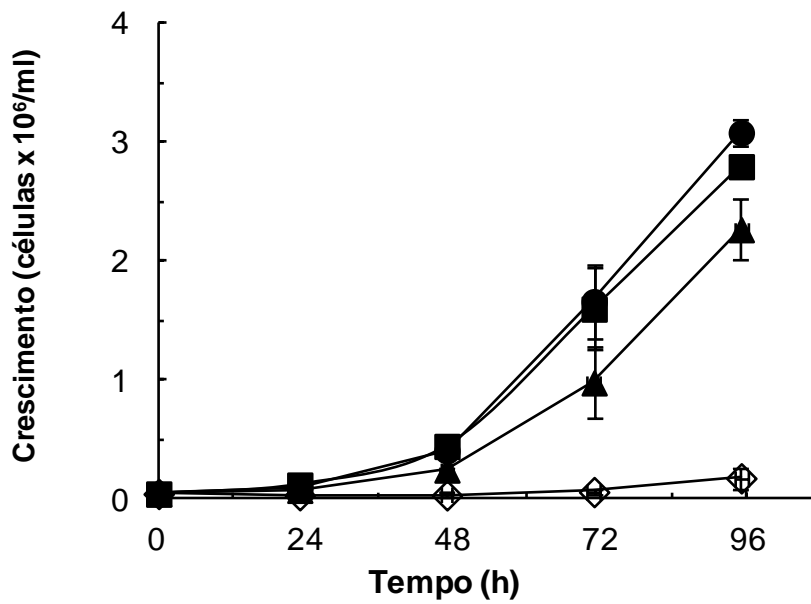


Figura 6. Evolução do crescimento da alga *P. subcapitata* na presença de diferentes concentrações de Zn. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo as seguintes concentrações de Zn: (■) 300, (▲) 1800 ou (◊) 6000 nmol/l. Células na ausência de Zn (●) – controlo.

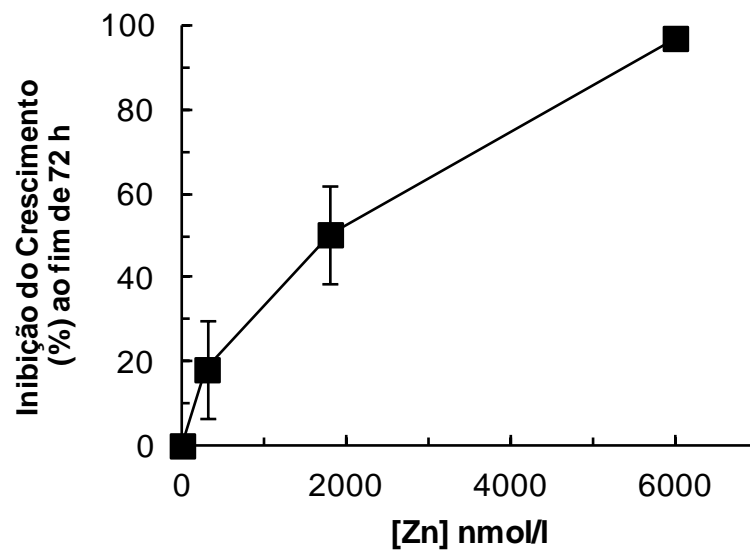


Figura 7 . Inibição do crescimento da alga *P. subcapitata* devido à presença de Zn.

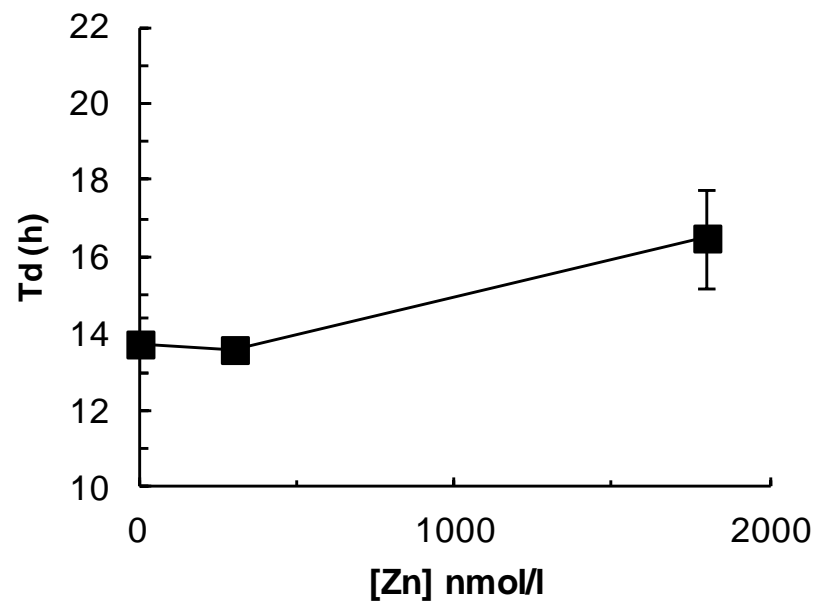


Figura 8 . Efeito da presença de Zn no tempo de duplicação (Td) da alga *P. subcapitata*.

A adição de 300 nmol de Zn (20 ppb) ao meio de cultura não provocou um efeito significativo sobre o crescimento da alga, até 96 h (figura 6). Com esta concentração de metal, o número de células ao fim de 72 h sofreu uma pequena variação em relação ao do controlo (figura 7), mantendo-se similar o tempo de duplicação na presença ou ausência de metal (figura 8).

A adição de 1800 nmol/l de Zn (120 ppb), ao meio de cultura, teve como efeito uma redução de cerca de 50 % do crescimento (figuras 6 e 7) e um aumento do tempo de duplicação para cerca de 17 h (figura 8). A presença de 6000 nmol/l de Zn (392 ppb) inibiu, drasticamente, o crescimento da alga (figura 6). Para esta concentração de metal, observou-se uma redução do crescimento superior a 97 %, ao fim de 72 h (figura 8).

3.2. Efeito do Cd e Zn na autofluorescência

A alga *P. subcapitata* quando exposta a um comprimento de onda de 485nm emite fluorescência (autofluorescência) (figura 9) a 680 nm. A autofluorescência deve-se à presença de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*). A clorofila *a*, presente nos cloroplastos, confere cor verde à alga. Os pigmentos fotossintéticos encontram-se organizados em complexos, designados de fotossistema I e fotossistema II, os quais têm como função transferir os electrões da água para o NADP⁺ (Bitton 2005). A fluorescência devido à clorofila *a* depende do conteúdo do pigmento e da actividade fotoquímica do fotossistema II (Franklin *et al.*, 2001b).

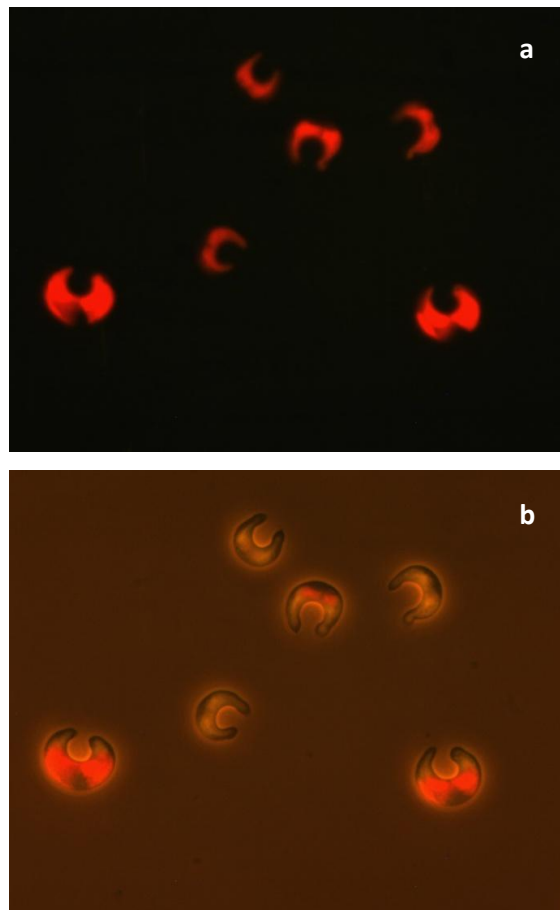


Figura 9 . Autofluorescência da alga da alga *P. subcapitata*. Fotografia de microscopia de fluorescência (a); fluorescência e contraste de fase em simultâneo (b).

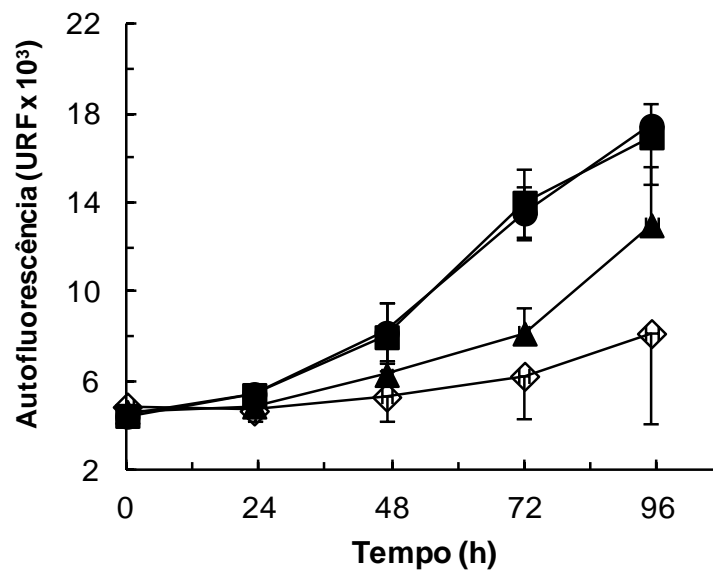


Figura 10 . Evolução da autofluorescência da alga *P. subcapitata* durante o crescimento na presença de diferentes concentrações de Cd. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo (■) 150, (▲) 500 ou (◊) 700 nmol/l de Cd. Células na ausência de Cd (●) – controlo.

Muitos metais produzem alterações estruturais e impedem a fotossíntese. Encontra-se descrito na literatura que o fotossistema II é, provavelmente, o “alvo” mais sensível da acção de metais como é o caso do Cd e Hg na cianobactéria *Anabena flos-aquae* (Singh et al. 1993) e do zinco na cianobactéria *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Chaloub et al. 2005).

No presente trabalho foi estudado o efeito de diferentes concentrações de Cd e Zn na autofluorescência da alga *P. subcapitata*. Para tal, a alga foi inoculada em meio de cultura e exposta a diferentes concentrações de Cd, como descrito na secção 3.1. Posteriormente, em diferentes intervalos de tempo foram retiradas as amostras e analisada a autofluorescência da cultura, usando-se um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 680 nm.

A inibição de autofluorescência das culturas expostas a diferentes concentrações de Cd segue um padrão similar ao do crescimento (figuras 3 e 10). Assim, para a mais baixa concentração de Cd testada (150 nmol/l), não se observou uma alteração da autofluorescência da cultura, comparativamente ao

controlo na ausência de metais pesados (figuras 10 e 11). Tal como referido anteriormente (secção 3.1), para esta concentração de Cd não há alteração do crescimento da alga (figuras 3, 4 e 5). Concentrações crescentes de Cd provocaram uma diminuição da autofluorescência (figuras 10 e 11).

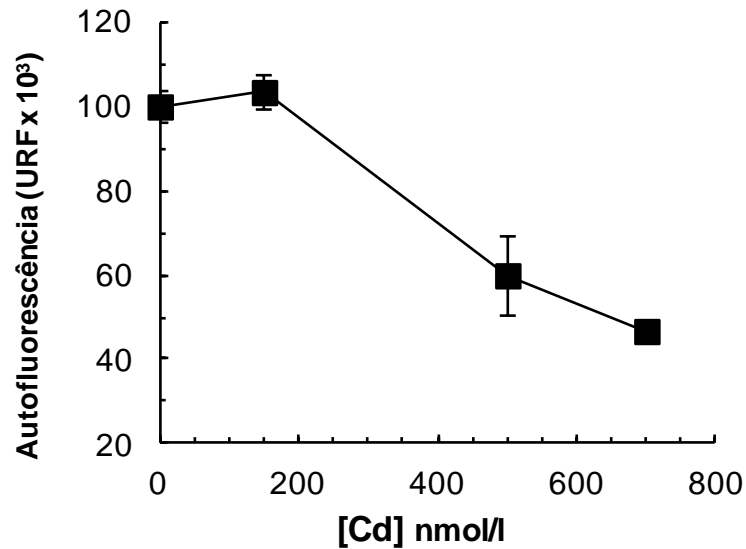


Figura 11 . Efeito da presença de Cd na autofluorescência da alga *P. subcapitata*. Percentagem da autofluorescência, ao fim de 72 h (F), sobre a fluorescência no controlo (F0), para o mesmo tempo.

Usando como referência a autofluorescência do controlo, ao fim de 72 h, verificou-se uma perda da cerca de 40 % e 55% da fluorescência na presença de 500 ou 700 nmol/l de Cd, respectivamente (figura 11). A autofluorescência devido à clorofila *a*, detectada por um ensaio fluorimétrico, parece ser um indicador menos sensível que a inibição do crescimento, à acção tóxica do Cd, uma vez que para 700 nmol/l de Cd ocorre uma inibição de crescimento, ao fim de 72, superior a 80% (figura 4).

Tal como no caso do Cd, a inibição de autofluorescência das culturas expostas a diferentes concentrações de Zn seguiu um padrão similar ao do crescimento (figuras 6 e 12). Tendo como referência a autofluorescência do controlo, ao fim de 72 h, a presença de 1800 nmol/l de Zn, provocou uma perda

muito ligeira da fluorescência. Na presença de 6000 nmol/l de Zn, observou-se uma perda da autofluorescência da alga de 50% (figura 13).

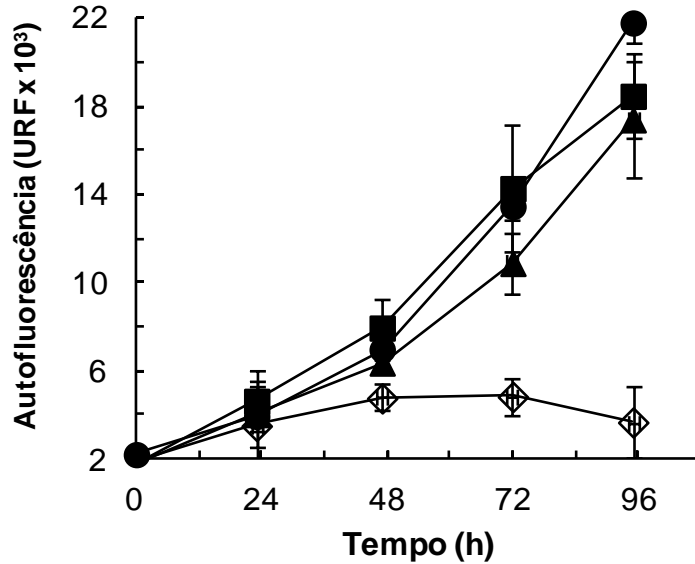


Figura 12. Evolução da autofluorescência da alga *P. subcapitata* durante o crescimento na presença de diferentes concentrações de Zn. A alga em fase exponencial de crescimento foi inoculada em meio de cultura contendo (■) 300, (▲) 1800 ou (◇) 6000 nmol/l de Zn. Células na ausência de Zn (●) – controlo.

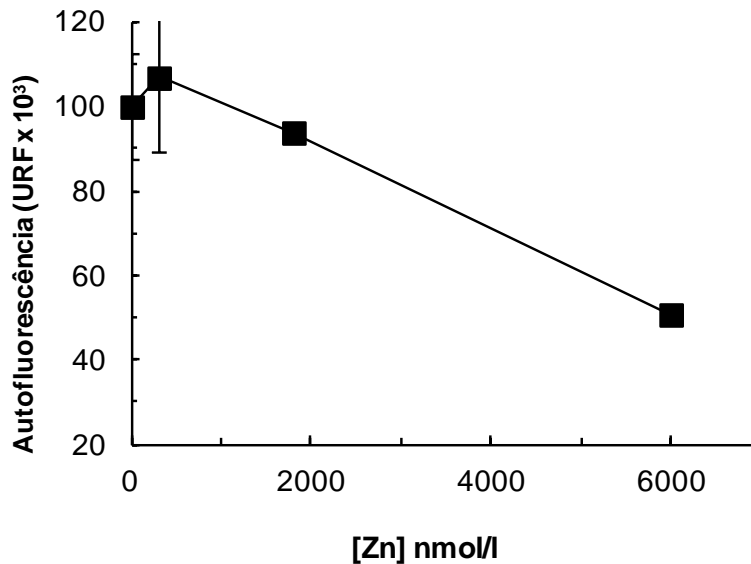


Figura 13. Efeito da presença de Zn na autofluorescência da alga *P. subcapitata*. Percentagem da autofluorescência, ao fim de 72 h (F), sobre a fluorescência no controlo (F0), para o mesmo tempo.

3.3. Efeito do Cd e Zn na actividade metabólica

A inibição da actividade enzimática (como é o caso da β -galactosidase e das esterases) nos microrganismos tem vindo a ser utilizada como um indicador de *stress* ambiental (Bitton, 2005).

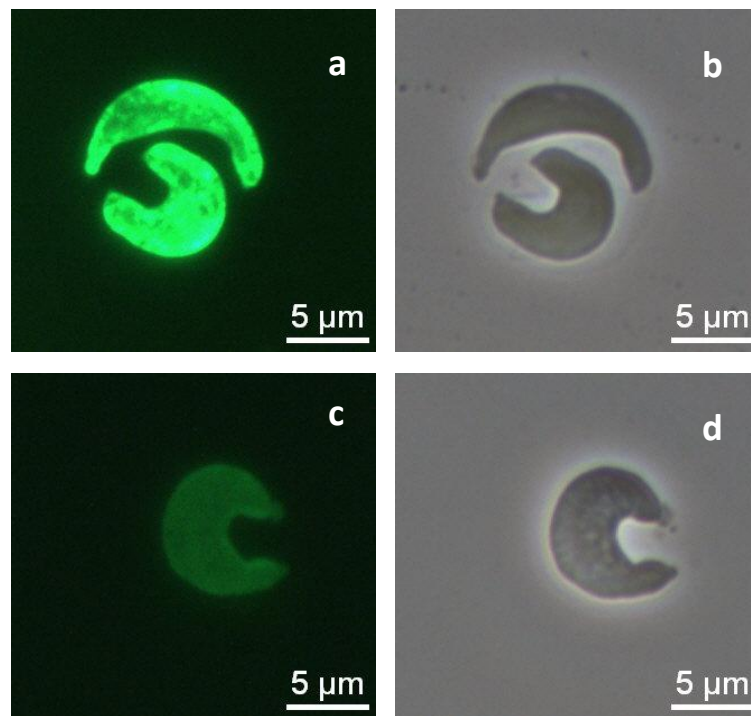


Figura 14 . Avaliação da actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. As algas foram incubadas na presença de diacetato de fluoresceína, como descrito nos materiais e métodos. Fotografia de microscopia de fluorescência de células metabolicamente activas (a); células metabolicamente inactivas (c). Fotografias de contraste de fase das mesmas células (b) e (d).

O efeito do Cd e Zn na actividade metabólica da alga *P. subcapitata* foi avaliado recorrendo à sonda diacetato de fluoresceína (DAF). O DAF não apresenta fluorescência, atravessa livremente a membrana celular e difunde-se no citoplasma. As células metabolicamente activas apresentam esterases as quais hidrolisam o DAF, originando fluoresceína que, quando excitada num comprimento de onda próximo de 490 nm emite fluorescência a ~513 nm (Haugland, 2005). Deste modo, as células metabolicamente activas apresentam uma intensa fluorescência verde,

enquanto que as células inactivas não apresentam fluorescência ou apresentam uma baixa fluorescência (figura 14). Assim, a detecção da actividade esterásica celular pode ser usada como um indicador da resposta da alga à presença de tóxicos (Blaise et al. 2000).

Tal como na avaliação do impacto do Cd e Zn no crescimento celular e na autofluorescência, a alga foi inoculada em meio de cultura numa concentração final de 5×10^4 células/ml e exposta a 700 nmol/l Cd ou a 6000 nmol/l de Zn, durante um curto espaço de tempo (até 6h). Após o contacto com os metais durante 1, 3 ou 6 h, as células foram removidas do meio de cultura, lavadas e incubadas na presença de DAF e a fluorescência determinada num leitor de microplacas.

A exposição das células de *P. subcapitata* a 700 nmol/l de Cd, durante 1h, provocou uma inibição de cerca de cerca de 52 % da actividade esterásica da população celular. Prolongando-se a exposição até 6h, observou-se uma inibição da actividade esterásica de ~ 70 % (figura 15). O decréscimo de fluorescência indica a perda de actividade enzimática devido à acção tóxica do Cd nas células de *P. subcapitata*.

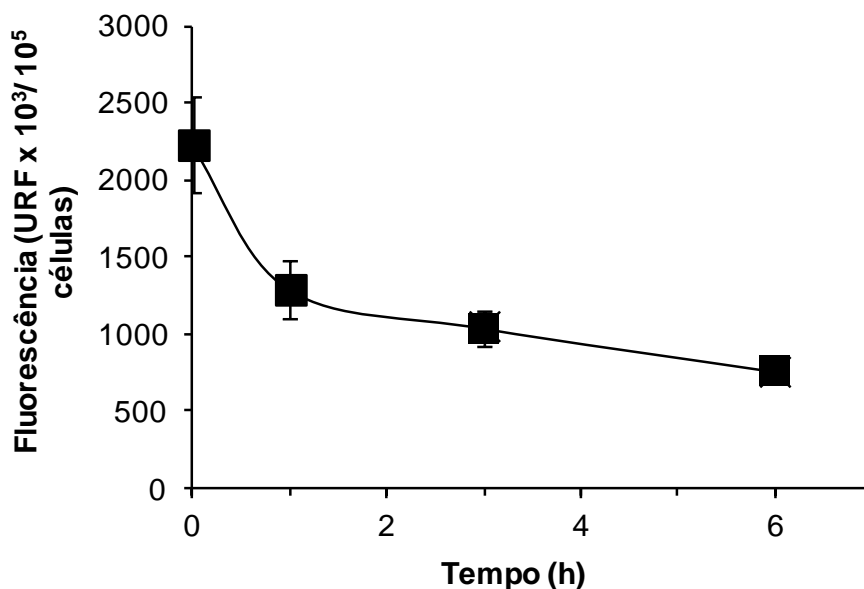


Figura 15. Efeito da presença de Cd na actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. As células em fase exponencial de crescimento foram expostas a 700 nmol/l Cd. Subsequentemente, as algas foram removidas do meio de cultura, lavadas e incubadas na presença de diacetato de fluoresceína, como descrito nos materiais e métodos.

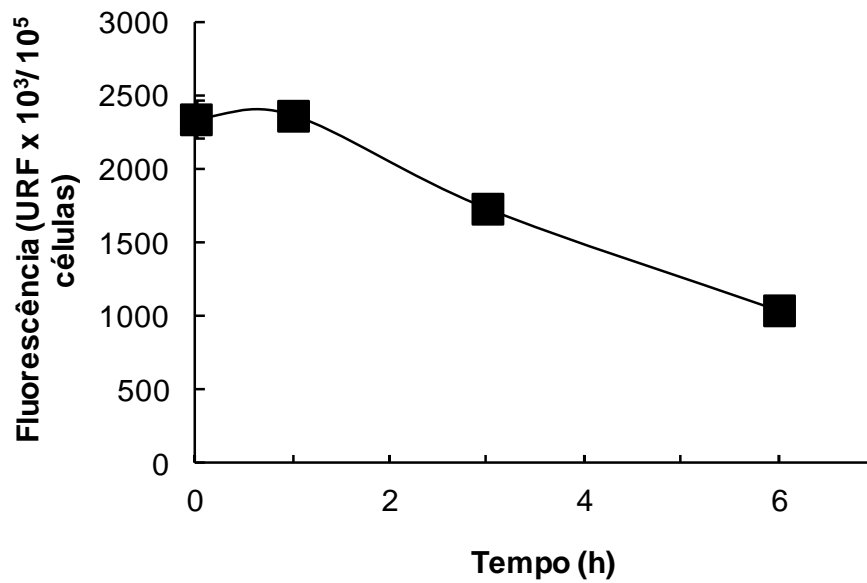


Figura 16 . Efeito da presença de Zn na actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. As células em fase exponencial de crescimento foram expostas a 6000 nmol/l Zn. Subsequentemente, as algas foram removidas do meio de cultura, lavadas e incubadas na presença de diacetato de fluoresceína, como descrito nos materiais e métodos.

No caso da exposição das células a *P. subcapitata* a 6000 nmol/l de Zn, a perda da actividade esterásica foi mais lenta. Após uma hora de contacto com o metal não se observou perda da actividade metabólica. Após 3 e 6 h de contacto com 6000 nmol/l Zn, observou-se uma perda de actividade metabólica de ~30 e 56 %, respectivamente (figura 16).

A avaliação da toxicidade, através da determinação da inibição da actividade esterásica, mostra que o Cd é mais tóxico do que o Zn para as células *P. subcapitata*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos sobre o efeito do Cd e Zn no crescimento da alga (secção 3.1).

A rápida perda (no espaço de 6h) da actividade esterásica devido à presença de elevadas concentrações de Cd e de Zn, sugere que a inibição da actividade metabólica constitui um indicador sensível do efeito tóxico de Cd e de Zn, podendo ser útil na avaliação de toxicidade aguda produzida por estes metais. Encontra-se descrito na literatura um efeito similar devido à presença de Cu.

Células de *P. subcapitata*, expostas a 175 ppb de Cu, durante 1h, perderam cerca de 70 % da actividade esterásica, avaliada por citometria de fluxo (Franklin *et al.* 2001a).

De referir que os resultados apresentados, relativamente ao efeito dos metais na actividade metabólica, são preliminares. Por limitação de tempo, não foi possível repetir convenientemente estes ensaios, nem alarga-los às concentrações usadas na avaliação do impacto sobre o crescimento e autofluorescência da alga.

CAPITULO 4

CONCLUSÃO

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Capítulo 4 – Conclusão

No presente trabalho avaliou-se o impacto de diferentes concentrações de Cd e Zn, no crescimento, na autofluorescência e na actividade metabólica da alga *P. subcapitata*. Dos resultados obtidos foi possível obter várias conclusões, as quais se encontram abaixo sumariadas.

- a) O Cd é mais tóxico que o Zn para a alga *P. subcapitata*. O Cd, numa concentração de 500 nmol/l, provoca uma inibição cerca de 63 % do crescimento, ao fim de 72 h, enquanto que uma concentração de Zn 3,6 vezes superior (1800 nmol/l) provoca uma inibição de 50 % do crescimento. Adicionalmente, o Cd provoca uma perda mais rápida da actividade esterásica do que o Zn.
- b) Não há vantagem em se utilizar a autofluorescência na avaliação da toxicidade, uma vez que a perda da autofluorescência devido ao efeito tóxico do Cd e Zn segue um padrão similar à inibição do crescimento.
- c) A avaliação da actividade esterásica da alga *P. subcapitata* poderá constituir um indicador sensível na avaliação da toxicidade. Enquanto que a avaliação do impacto tóxico dos metais sobre o crescimento da população requer um tempo de 72 h, a perda da actividade esterásica induzida por Cd e Zn ocorre num período de 6 h.

Os resultados obtidos com diacetato de fluoresceína, usando um leitor de microplacas, sugerem que a perda da actividade esterásica da alga poderá constituir um indicador sensível e mais precoce na avaliação da toxicidade. Contudo, deverão ser efectuados estudos mais completos no sentido de se confirmara a sua utilidade na avaliação da toxicidade, usando a alga *P. subcapitata*.

CAPITULO 5

TRABALHO FUTURO

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Capítulo 5- Trabalho Futuro

Com o objectivo de complementar e aprofundar o trabalho desenvolvido na presente dissertação sugere-se, como trabalho futuro, a avaliação do efeito de 150 e 500 nmol/l de Cd e de 300 e 1800 nmol/l de Zn na perda da actividade metabólica da alga *P. subcapitata*.

CAPITULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EFEITO TÓXICO DE METAIS PESADOS NA ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

Capítulo 6 – Referencias Bibliograficas

Angerer, J., Schaller, K. H. 1988. Analysis of hazardous substances in biological materials. Weinheim Vol. 2. VCH. pg: 85-96.

ATSDR (1996) Toxicological profile for nickel. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. United States Public Health Service. Disponível em: <http://www.eco-usa.net/toxics/chemicals/nickel.shtml>.

ATSDR (2006) Toxicological profile for zinc. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. United States Public Health Service. Disponível em: <http://www.eco-usa.net/toxics/quimicos-p/zinco.shtml>.

Ávila – Campos, M.J. (2008). Metais Pesados e seus efeitos. Disponível em: www.mundodoquimico.hpg.com.

Bitton, G. (2005) Wastewater microbiology. John Wiley & Sons, Inc., Florida.

Blaise, C., Gagn, F., Bombardier, M. (2000) Recent developments in microbiotesting and early millennium prospects. *Water, Air & Soil Pollution*. 123:11-23.

Blaise, C., Vasseur, P. (2005) Algal microplate toxicity test. In: Blaise C, Férard J-F (eds). *Small-scale freshwater toxicity investigations*. Vol 1. Springer, pg: 137-179.

Castro, A.M., Castilhos, Z.C., Ramos, A.S., Lima, C.S., Rodrigues, P.C. (2005) Avaliação do risco à Saúde Humana: Conceitos e Metodologia. Serie de Estudos e documentos n.º 65. Peiter, C.S. ed. Centro de Tecnologia Mineral, Ministério da Ciência de Tecnologia.

Cerejeira, M. J., Pereira, T., Fernandes, A.M.S., Brito, F., Morbey, M.A., Mendonça, E., Picado, A., Silva, L., Cruz, M.E., Caetano, L. (2005). "Projecto Agro24. Ensaio biológicos para avaliação da toxicidade das amostras de água. Disponível em: <http://www.isa.utl.pt/dppf/agro24>.

- Chaloub, R.M., de Magalhaes, C.C.P., dos Santos, C.P. (2005) Early toxic effects of zinc on PSII of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology*. 41:1162-1168.
- Connell, D., Lam, P., Richardson, B., Wu, R. (1999) *Introduction to ecotoxicology*, Blackwell Science.
- Cunha, M.L.M., Laboratório de Oceanografia da Universidade Livre de Bruxelas. 1987. Análise de metais pesados numa "carotte" de sedimentos colhidos no limite inferior da zona entre marés no Esteiro da Comporta, situado no estuário do Sado, Portugal. Lisboa: Serviço de Estudos do Ambiente.
- Elder, J. F. (1989). Applicability of ambient toxicity to national or regional water-quality assessment. U.S. Geological Survey Circular 1049.
- Fellenberg, G. (1980), *Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental*. Cap.II. EPU Editora; pg.187-195.
- Ferreira, S.L.C., Andrade, J.B., Korn, M.G.A., Pereira, M.G., Lemos, V.A., Santos, W.N.L., Rodrigues, F.M., Souza, A.S., Ferreira, H.S., Silva, E.G.P., (2007) Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques. *Journal of Hazardous Materials* 145: 358–367.
- Franklin, N. M., Adams, M.S., Stauber, J.L., Lim, R.P. (2001a) Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40:469-480
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P. (2001b) Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20:160-170
- Geis, S.W., Fleming, K.L., Korthals, E.T., Searl, G., Reynolds, L., Karner, D.A. (2008) Modification to the algal growth inhibition test for use as regulatory assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 36-41.

- Haugland RP (2005) The Handbook – A guide to fluorescent probes and labeling technologies, 10^a edição. Invitrogen Corp, Eugene, OR, USA
- ICHME - INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT (1981) Heavy metals in the environment - proceedings. Third International Conference on the Heavy Metals in the Environment, Amsterdam.
- Lee, R. E. (1989) Phycology. 2^a edição. Cambridge University Press, Cambridge, pg. 645.
- Lobo, F. (2011) Metais tóxicos e suas consequências para a saúde humana. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/2011/08/01/metais-toxicos-e-suas-consequencias-para-a-saude-humana-artigo-de-frederico-lobo/>.
- Massaro, F.C. (2011) Estudos ecológicos e ecotoxicológicos de espécies nativas de *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo.
- OECD (1984) Alga, growth inhibition test (201). OECD Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, France.
- Oliveira, C.P.F. (2003) Efeito de cobre e chumbo, metais pesados presentes na água de formação derivada da extração do petróleo da província petrolífera do Urucu – Am, sobre o tambaqui, *Collossoma macropomum* (Curvier, 1818). Tese de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas.
- Oliveira, M.R. (2007) Investigação da contaminação por metais pesados da água e do sedimento de corrente nas margens do rio São Francisco e tributários, a jusante da represa da Cemig, no Município de Três Marias, Minas Gerais. Tese de Doutorado. Instituto de Geociências. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Pietrobeli, J.M.T.A (2007) Avaliação do potencial de bio-sorção dos íons Cd (II), Cu (II) e Zn (II) pela macrófita *Egeria densa*. Tese de Mestrado. Centro de Engenharia e Ciências Exatas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

- Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (1985) Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application. Washington USA, Hemisphere Publishing. pg:666.
- Rúbio, P.S., Corazzine, R., Covre, M. (1990) Os Impactos da poluição. Editora do Brasil.
- U.S.-EPA (2002) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 4Th Edition. EPA-821-R-02-013. p: 1-350. Environmental Protection Agency, Washington, Dc.
- Sanches, S. (2008) Estudo comparativo da absorção de sais inorgânicos de Cádmio e interações da vitamina C em ratos. Tese de Doutorado. Centro de Ciências Exactas. Universidade Estadual de Maringá.
- Santos, L.C. (2006) Efeito do cobre na população de bactérias e fungos do solo, associação ectomicorrízica e no desenvolvimentos de mudas de eucalipto e canafístula. Tese de Mestrado. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria.
- Scragg, A. (2005) Environmental biotechnology. 2ª edição. Oxford University Press.
- Singh, D.P., Sharma, S.K., Bisen, P.S. (1993) Differential action of Hg²⁺ and Cd²⁺ on the phycobilisomes and chlorophyll-a fluorescence, and photosystem-II dependent electron-transport in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. Biometals. 6:125-132.
- Soares, E.V., Machado, M.D., Soares, H.M.V.M. 2011. Relevance of using *Saccharomyces cerevisiae* biomass in the bioremediation of heavy metals. In: Satinder, K.B. (ed). Hazardous Materials:Types, risks and control. Nova Science Publishers, Inc, New York, Cap.8. (no prelo).
- Timbrell, J.A. (1995) Introduction to Toxicology. 2ª edição. Taylor & Francis. London.
- Tenório, J.A.S., Espinosa, D.C.R. (2008). Reciclagem de Pilhas e baterias. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Volesky, B. (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. Hydrometallurgy. 59: 203-216.

