Maria Cristina de Morais Caldas Antão Santos Carvalho

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS DE NÍQUEL PARA O CLADÓCERO *Daphnia magna*

Ensaios *in vivo* e *in vitro*

Mestrado em Controlo de Qualidade
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
2000

Maria Cristina de Morais Caldas Antão Santos Carvalho

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SAIS SOLÚVEIS DE NÍQUEL PARA O CLADÓCERO *Daphnia magna*

Ensaios *in vivo* e *in vitro*

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/04/2004
Reg. 2558
Cota

FFM
CAR
2558

Mestrado em Controlo de Qualidade
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
2000

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção de grau de **Mestre em Controlo de Qualidade** na especialidade " Água e Alimentos".

Orientador:

Professora Doutora Elsa Bronze-da-Rocha

Co-orientadores:

Professora Doutora Maria de Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos

Professora Doutora Lúcia Guilhermino

Professor Doutor Félix Dias Carvalho

Ao meu marido

Às minhas filhas

Aos meus amigos

Obrigada

Bem hajam

Alguns dos resultados desta dissertação foram apresentados sob a forma de painel em três congressos internacionais e um congresso nacional da especialidade:

C. Antão, M. E. Soares, E. Bronze-da-Rocha, F. Carvalho, M. L. Bastos, L. Guilhermino (2000). Toxicity of nickel compounds to a standard species in Ecotoxicology (*Daphnia magna*). 7th FECS Conference on Chemistry and the Environment, Espinho.

C. Antão, M. E. Soares, E. Bronze-da-Rocha, F. Carvalho, M. L. Bastos, L. Guilhermino (2000). Avaliação *in vivo* e *in vitro* da Ecotoxicidade do níquel para o cladócero *Daphnia magna* utilizando a enzima acetilcolinesterase como parâmetro indicativo. 3° Congresso Ibérico de Contaminação e Toxicologia Ambiental, Faro.

C. Antão, P. A. Barros, L. Guilhermino (2000). Comparação da sensibilidade de dois clones de *Daphnia magna* na presença de diferentes formas de níquel existentes no ambiente. 3° Congresso Ibérico de Contaminação e Toxicologia Ambiental, Faro.

C. Antão, M. E. Soares, E. Bronze-da-Rocha, F. Carvalho, M. L. Bastos, L. Guilhermino (1999). Avaliação da toxicidade aguda de compostos de níquel e de efluentes industriais contaminados por metais. 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Lisboa.

Índice Geral

Agradecimentos	***VII***
Resumo	***IX***
Abstract	***XI***
Abreviaturas	***XIII***

CAPÍTULO I ***Introdução***

1.1. Preâmbulo	13
1.2. Objectivos	14
1.3. Avaliação Ecotoxicológica	15
1.4. Daphnia magna	22
1.4.1. Escolha do cladócero *Daphnia magna* como organismo teste	22
1.4.2. O ciclo biológico de *Daphnia magna*	23
1.4.3. Padronização dos sistemas de cultura de *Daphnia magna*	25
1.5. Biomarcadores em Ecotoxicologia	27
1.5.1. Características	27
1.5.2. Acetilcolinesterase	30
1.5.3. Enzimas antioxidantes	31
1.5.3.1. Catalase	32
1.5.3.2. Glutationa redutase	33
1.5.3.3. Glutationa-S-transferase	33
1.5.3.4 .Glutationa peroxidase	34
1.5.3.5. Superóxido dismutase	34
1.5.4. Glutationa reduzida	35
1.5.5. Peroxidação lipídica	36
1.6. Metais pesados: uma ameaça para os sistemas biológicos	38
1.6.1 . Níquel	39
1.6.1.1. Resumo histórico	39
1.6.1.2. Características físico-químicas	40
1.6.1.3. Distribuição do níquel na natureza	40
1.6.1.4. Utilização do níquel para fins industriais	42
1.6.1.5. Contaminação ambiental	42
1.6.1.6. Exposição e toxicidade do níquel no Homem	44

1.6.1.7. Ecotoxicidade do níquel 45
1.6.1.8. Bioacumulação do níquel em organismos aquáticos 47
1.6.1.9. Biomagnificação do níquel em organismos aquáticos 47

CAPÍTULO II ***Material e Métodos***

2.1. Material biológico: crustáceo cladócero *Daphnia magna* 49
2.1.1. Cultura de *Daphnia magna* 49
2.1.2. Chlorella vulgaris como fonte de alimento para *D. magna* 52
2.2. Substâncias e soluções teste utilizadas 54
2.3. Ensaios convencionais para avaliação da toxicidade aguda do níquel para *Daphnia magna* 55
2.4. Testes *in vivo* utilizando a enzima AChE como parâmetro indicativo de toxicidade 56
2.5. Testes *in vitro* utilizando a enzima AChE como parâmetro indicativo de toxicidade 57
2.6. Testes *in vivo* utilizando enzimas antioxidantes como biomarcadores de ecotoxicidade (catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase) 58
2.7. Análise estatística dos dados 61

CAPÍTULO III ***Resultados***

3.1. Determinação das concentrações de níquel, crómio total, cobre, chumbo, cádmio e alumínio nos efluentes industriais 63
3.2. Ensaios agudos convencionais 64
3.3. Ensaios *in vitro* baseados na actividade da AChE 80
3.4. Ensaios *in vivo* baseados na actividade da AChE 82
3.5. Comparação da toxicidade entre as várias substâncias utilizadas 90
3.6. Ensaio *in vivo* de inibição das enzimas antioxidantes 91

CAPÍTULO IV ***Discussão*** 94

CAPÍTULO V ***Referências Bibliográficas*** 102

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Agradecimentos

À Professora Doutora Elsa Bronze-da-Rocha, minha orientadora, desejo expressar os meus agradecimentos de uma forma muito especial, pelo total apoio e disponibilidade que demonstrou ao longo do desenvolvimento deste estudo.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, minha co-orientadora, os meus sinceros agradecimentos pelo apoio científico e crítico, que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho, bem como toda a disponibilidade que sempre demonstrou ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Félix Carvalho, meu co-orientador, são dirigidas as minhas palavras de agradecimento por todo o entusiasmo, confiança e profunda sabedoria com que sempre me incentivou.

À Professora Doutora Lúcia Guilhermino, agradeço por ter tornado possível a minha estadia no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), a qual foi necessária e útil para a realização da parte experimental que envolveu ensaios com organismos vivos, o que não teria sido possível sem a sua colaboração.

Ao Professor Doutor João Coimbra o meu muito obrigada, pelo acolhimento sempre afável no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR).

À Engª Maria Elisa Soares, Dr. Fernando Remião, Drª Márcia de Carvalho, agradeço pelo apoio incondicional e ajuda na quantificação de vários parâmetros, realizado no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À Professora Doutora Eduarda Fernandes e Drª Helena Carmo agradeço o apoio e a sua amizade.

Às técnicas D. Júlia Caramez e D. Graziela Fernandes agradeço a disponibilidade e amabilidade que sempre demonstraram no Laboratório de Toxicologia.

Ao Professor Doutor Paulo Costa, agradeço todo o apoio, disponibilidade e ensinamentos da parte informática.

Ao Dr. Miguel Lacerda agradeço, por todo o apoio dado, bem como pelo facto de ter tratado das culturas de *Daphnia magna* durante os meus períodos de ausência do Laboratório, nomeadamente saídas para congressos.

Ao Dr. Paulo Barros, agradeço pelo seu auxílio, incentivo, sugestões e camaradagem.

Aos meus colegas do CIIMAR, Miguel Lacerda, Paulo Barros, Filipa Azevedo, Olímpia Sobral, Anabela Pereira, Elisabete Fernandes, Susana Moreira, Manuela Frasco, Bruno Castro, Bruno Nunes e Inês Machado agradeço por toda a amizade e pelo excelente ambiente humano que torna aprazível cada dia no Laboratório de Ecotoxicologia.

A todos os outros membros do CIIMAR, nomeadamente Júlian Diaz, Teresa, Marta, Marco e Alfredo, bem como ao Sr. Carlos Rosa, agradeço toda a amizade bem como a forma amável como sempre me trataram.

Aos meus colegas, colaboradores e clientes do Laboratório EQUILIBRIUM, agradeço a paciência e a dedicação com que trabalharam durante os meus períodos de ausência.

Ao meu marido e filhas, Cristina, Leonor e Bárbara, que sempre me acompanharam durante todo o período de estudo, agradeço profundamente, sem a ajuda e compreensão deles a realização deste trabalho teria sido impossível.

Desejo ainda expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de algum modo, incentivaram e contribuíram para a realização do trabalho apresentado nesta tese.

Resumo

Avaliação da Toxicidade de compostos de níquel para o cladócero *Daphnia magna* Ensaios *in vivo* e *in vitro*

No contexto da Ecotoxicologia, o principal objectivo da avaliação dos riscos decorrentes da libertação de um químico no ambiente consiste na probabilidade de este causar danos nos organismos vivos e nos ecossistemas. Nas últimas décadas, tem vindo a dar-se uma importância crescente aos efeitos sub-letais induzidos por compostos químicos e que precedem a morte dos organismos. Estes efeitos podem ser avaliados recorrendo a testes de toxicidade com espécies consideradas representativas de diferentes níveis tróficos do ecossistema.

Neste trabalho investigou-se a toxicidade aguda de um efluente industrial (no qual foram identificados e quantificados seis metais) de uma matriz simuladora (contendo os seis metais nas proporções em que estes foram encontrados no efluente) e de quatro compostos de níquel, para o crustáceo cladócero *Daphnia magna*.

As actividades das enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutationa redutase, glutationa S-transferase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase, foram usadas como biomarcadores, tendo sido realizados testes *in vivo* e/ou *in vitro* baseados nestas enzimas.

Verificou-se que a toxicidade aguda causada pelo efluente e pela matriz simuladora é superior à dos compostos puros de níquel, o que evidencia a importância do estudo das misturas de substâncias presentes nas soluções em paralelo com os ensaios efectuados isoladamente com substâncias puras. Comparando a toxicidade do efluente relativamente à matriz simuladora, verificou-se que o efluente provocou uma maior inibição da actividade da acetilcolinesterase.

Neste estudo mostrou-se também que, à excepção do cloreto de níquel, os tóxicos ensaiados provocaram um decréscimo significativo na actividade da enzima acetilcolinesterase, bem como variações na actividade da enzima catalase. Quanto às restantes enzimas, não se detectou qualquer actividade na espécie utilizada nos estudos.

Os resultados obtidos sugerem que o crustáceo cladócero *Daphnia magna* é uma espécie adequada que pode ser utilizada em testes de ecotoxicidade baseados em biomarcadores de sais solúveis de níquel e que a enzima acetilcolinesterase, pode ser usada como critério de avaliação da toxicidade de metais.

Abstract

Toxicity of nickel compounds to a standard species in ecotoxicology (*Daphnia magna*) *In vivo* and *in vitro* assays

In the context of ecotoxicology, the main objective of the risk assessment about the release of chemicals into the environmental relies on the establishment of the probability to cause damage to live organisms and to ecosystems. Special attention has been given to the sub-lethal effects of chemical compounds as biomarkers of toxicity that frequently precede the death of organisms. For this, it is necessary to estimate various parameters, including toxicity tests with different species of several trophic levels from ecosystem.

In this work, the acute toxicity of an industrial effluent, a standard solution containing a mixture of six metals (simulated matrix) and four compounds of nickel was investigated both "*in vivo*" and "*in vitro*" using the crustaceous cládoceran *Daphnia magna.*

The activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), catalase, glutathione reductase glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase were evaluated.

The results obtained from the study show that, with the exception of nickel chloride, the samples caused a significant decrease in the activity of enzyme acetilconinesterase (AChE), and alterations in catalase activities. In what concerns the remaining enzymes studied (glutathione reductase and superoxide dismutase) no activity was detected in *Daphnia magna*. These results suggest that the biomarkers as effect parameters cladoceran *Daphnia magna*, is a species suitable for ecotoxicity testing using and that the enzyme AChE may be used as criteria for the evaluation of metals toxicity.

The present study shows the importance of the study of mixtures of substances present in solutions (like the effluent and simulated matrix) as well as the analysis of pure substances.

Abreviaturas

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

ANOVA - Análise de variância

ASTM - "American Society for Testing and Materials"

BuChE - Butirilcolinesterase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

EDTA - tetra acetato de etilenodiamina

CE_{50} - Concentração Efectiva a 50%

CEE - Comunidade Económica Europeia

CEN - Comité Europeu de Normalização

CENO - Concentração de Efeito Não Observado

CEO - Concentração de Efeito Observado

ChE - Colinesterase

CI_{50} - Concentração que produz uma inibição de 50%

CL_{50} - Concentração Letal a 50%

CMTA - Concentração máxima de tóxico aceitável

DE_{50} - Dose Efectiva a 50%

DL_{50} - Dose Letal a 50%

DEO - Dose de Efeito Observado

DENO - Dose Sem Efeito Observado

EPA - Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos da América

EPTAR- Estação de Pré Tratamento de Águas Residuais

GPx - Glutiona peroxidase

GR - Glutationa Redutase

GSH - Glutationa reduzida

GSSG - Glutationa oxidada

GST - Glutationa S-tranferase

LDH - Lactato desidrogenase

METIER - "Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance"

MBL - meio de cultura de algas "Woods Wole MBL"

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económicos

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

SOD - Superóxido dismutase

WHO - "World Health Organization"

CAPÍTULO I

Preâmbulo

1.1. Preâmbulo

A qualidade do ambiente aquático é afectada, de uma forma sistemática, por vários poluentes ou contaminantes. Alguns metais pesados, devido às suas características tóxicas, contribuem de uma forma significativa para a modificação qualitativa e quantitativa deste ambiente. Metais como o cobre, zinco e ferro, considerados essenciais na manutenção do metabolismo dos organismos, podem ser tóxicos em concentrações relativamente elevadas (Depledge *et al.* 1990). Outros, como o cádmio, níquel, mercúrio e chumbo que não são considerados essenciais, por não desempenharem uma função biológica conhecida, podem ser tóxicos quando se encontram em locais activos do metabolismo (Rainbow, 1997) mesmo em baixas concentrações (Viarengo, 1985).

Embora a presença de metais no meio aquático possa ser de origem natural, nomeadamente como resultado da actividade vulcânica e erosão das rochas, as concentrações ambientais destes contaminantes tem vindo a aumentar consideravelmente devido a actividades antropogénicas (Rudolfs *et al.,* 2000). Os perigos inerentes à presença destes elementos no ambiente aquático derivam não só da sua persistência e toxicidade, mas também das capacidades de bioacumulação e biomagnificação que podem induzir na cadeia trófica (Raport, D. 1990), e podem aumentar significativamente o risco para o Homem (Rand *et al.,* 1995). Os metais pesados podem ser encontrados no ambiente aquático em três formas distintas: dissolvidos, em suspensão ou sob a forma coloidal (Menzer *et al.*, 1994).

Muitos dos estudos relativos à quantificação de metais pesados no meio ambiente ignoram a sua potencial bioacumulação, toxicidade e interacção com outros poluentes (Connell, 1984). Têm sido descritas interacções entre metais pesados, e os estudos efectuados em fígado de rato demonstraram o efeito antagonista entre o mercúrio e o selénio (Manzer *et al.*, 1994). Em vertebrados marinhos foi avaliado que as concentrações de mercúrio e de selénio apresentam uma correlação positiva em tecidos específicos (Menzer *et al.*, 1994).

Em termos de legislação nacional, a lei existente regulamenta as normas de descarga de águas residuais para o meio receptor, com indicação dos valores máximos permitidos para os vários poluentes, nomeadamente para os metais pesados (Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto). No entanto, atendendo a que os agentes presentes no meio

ambiente podem interagir entre si formando agentes mais tóxicos e que os efeitos induzidos por misturas podem ser superiores aos provocados pelos agentes isolados, é importante conhecer o potencial tóxico de misturas complexas e de efluentes (Biesinger, et al., 1986; Andren *et al.*, 1998), devendo ser avaliado em termos qualitativos e quantitativos (Portaria nº732-A/96).

1.2. Objectivos

O trabalho realizado enquadra-se na Área da Avaliação da Ecotoxicidade Aquática e teve como perspectiva contribuir para um conhecimento mais adequado da realidade ambiental, nomeadamente sobre os efeitos tóxicos do níquel presente em efluentes industriais, mesmo em concentrações permitidas para descarga (Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto).

Neste sentido, o objectivo deste estudo visou a avaliação da toxicidade aguda de vários compostos de níquel, de um efluente proveniente de uma indústria de componentes para automóveis e de uma matriz simuladora, para o crustáceo cladócero *Daphnia magna.* Foram efectuados testes *in vivo* e/ou *in vitro* baseados na avaliação da actividade das enzimas acetilcolinesterase, catalase, glutationa redutase, glutationa-S-transferase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase como critérios indicativos de toxicidade.

Daphnia magna foi escolhida como organismo teste uma vez que é uma espécie padrão em Ecotoxicologia, sendo considerada representativa dos consumidores primários, particularmente importante nas cadeias tróficas de ecossistemas aquáticos.

Todos os ensaios foram realizados com o crustáceo cladócero *Daphnia magna*, especificamente o clone P5 (Barata *et al.*, 1998).

1.3. Avaliação Ecotoxicológica

Sendo uma ciência relativamente recente, a ecotoxicologia relaciona-se com a Toxicologia e a Ecologia. O seu objectivo visa definir o estudo dos efeitos dos poluentes nas populações, na comunidades, e por fim nos ecossistemas (Truhaut, 1977).

O que distingue a Ecotoxicologia da Toxicologia é o facto da interacção dos organismos com o meio que os rodeia ser fundamental em estudos ecotoxicológicos. Até ao aparecimento da Ecotoxicologia o estudo do impacto do químicos no ambiente era direccionado exclusivamente ao efeitos destes no ser humano, passando a ser agora estudado os efeitos desses mesmos compostos químicos no ecossistema (Duvigneaud, P. 1980). Assim, na Ecotoxicologia o composto é preferencialmente introduzido no meio escolhido, o qual sofre transformações nomeadamente em processos de degradação ou de adsorção, sendo de seguida absorvido pelos organismos em estudo. Em Toxicologia, o composto é directamente administrado no próprio organismo. Em Ecotoxicologia o composto inicial que se vai inserir no ecossistema, sobretudo em teste de longa duração poderá não resultar directamente no efeito final, devido à já referidas alterações provocadas pelo ecossistemas (Shaw *et al.*, 1991). Pelo contrário em Toxicologia o composto inicial está directamente relacionado com o efeito final, o qual não sofre qualquer alteração antes de entrar em contacto com o organismo (Walker *et al.*, 2001).

O facto de em Ecotoxicologia o composto em estudo chegar ao organismo-teste através do meio, leva-nos no âmbito desta ciência a ter de estudar a relação entre a concentração do composto e o efeito produzido, o que não acontece no âmbito da Toxicologia, que existe uma mera relação dose/efeito (Walker *et al.*, 2001).

A Ecotoxicologia desenvolveu-se sobretudo a partir dos anos 50 e 60, quando se verificou a persistência na água e no solo de alguns pesticidas utilizados na agricultura, e se começou a prestar mais atenção aos efeitos nefastos de agentes químicos poluentes introduzidos no meio ambiente pelo homem (Moriarty, 1983). O impacto ambiental provocado pela presença de concentrações mais elevadas de agentes químicos do que as toleradas biologicamente, é designado por poluição (Widdows, 1995; Slabbert *et al.*, 1999). Definem-se como agentes químicos poluentes todas as substâncias que estão presentes no ambiente como resultado directo, ou pelo menos em parte, das actividades do homem e que causam efeitos perniciosos nos organismos (Walker *et al.*, 2001). Este

impacto pode ser estudado quantitativa e/ou qualitativamente, através da observação dos seus efeitos (Stratton *et al.*, 1990). No entanto, como são produzidos e introduzidos na biosfera cerca de 200-1000 novos agentes químicos por ano, é compreensível a necessidade do desenvolvimento de testes que permitam avaliar e prever os efeitos ecológicos dos mesmos (Walker *et al.*, 2001).

Um dos objectivos desses testes visa estabelecer os efeitos perniciosos derivados do impacto de um ou mais compostos no ambiente. Este impacto ecotoxicológico foi definido por Hueck (*in*: OCDE, 1995) como "*um processo que se desenvolve através da interacção entre um agente prejudicial e um sistema biótico e que leva a uma perturbação no funcionamento harmonioso do sistema a uma extensão tal que as variações normais implícita ao seu funcionamento são excedidas*". Esta definição envolve a cadeia agente-receptor-efeito. Deve ter-se em conta que, em Ecotoxicologia, o termo prejudicial deve ser relacionado com o ecossistema como um todo e/ou com os seus sub-sistemas, em detrimento da visão antropocêntrica que considera o homem como medida final, já que este não pode existir sem o meio ambiente (Streit, B. 1992). As perturbações nos ecossistemas podem envolver parâmetros físicos, químicos ou bióticos (Walker *et al.* 2001).

Um ecossistema é uma unidade composta pelos organismos vivos (componente biótica) e pelo seu ambiente químico e físico (componente abiótica). As perturbações na componente biótica de um ecossistema podem afectar quer a sua estrutura quer a sua função (Ramade, F. 1992). As espécies animais e vegetais, os factores climáticos, as rochas e sedimentos constituem a estrutura do ecossistema e as interacções entre os seus diversos componentes determinam a sua função (Nebel, *et al.* 1996). As relações tróficas, envolvendo transferências de energia (Genoni, G.P. 1997) e de nutrientes (que fazem parte dos ciclos naturais) são de primordial importância no funcionamento dos ecossistemas (Widdows *et al.*, 1988; Widdows *et al.*, 1991). Assim, a distinção entre produtores primários, produtores, consumidores e decompositores é bastante útil pois permite visualizar a importância dos elementos bióticos nestes ciclos naturais (Nebel, *et al.* 1996).

As perturbações ambientais manifestam-se geralmente através de alterações nas frequências relativas e/ou na biomassa dos elementos do sistema. Podemos distinguir entre efeitos biodepressivos (emigração, aumento de mortalidade, redução das taxas de crescimento e de reprodução) e efeitos bioestimuladores (eutrofização, imigração). Ainda que os últimos não constituam efeitos tóxicos para as espécies favorecidas podem

causar perturbações no ecossistema, sendo por isso normalmente considerados como perniciosos (Purves, *et al.* 1995).

Os vários compostos podem ser transportados até ao receptor (o sistema biótico) através do meio aquático, do solo e/ou do ar (figura 1). Considerando que, globalmente, a distinção entre poluição aquática, terrestre ou aérea não é ecotoxicologicamente relevante, a identidade do meio de transporte torna-se secundária (Walker *et al.* 2001). Em termos práticos esta distinção além de útil é importante uma vez que são utilizados diferentes métodos que permitem prever os efeitos dos compostos em cada um dos meios. A estes meios de transporte poderemos ainda adicionar, como uma entidade independente, as redes alimentares (incluindo as suas formas mais simples, as cadeias alimentares), visto que nelas podem ocorrer fenómenos específicos que não se verificam em qualquer dos outros meios (por exemplo, biomagnificação e formação de metabolitos mais ou menos tóxicos) (Walker *et al.* 2001). Torna-se claro que as estreitas inter-relações entre diversos "compartimentos" do ambiente (figura 2) justificam que, para uma correcta avaliação dos efeitos tóxicos, deva ser considerado todo o ecossistema. Por razões de pragmatismo, teremos que nos restringir às análises dos efeitos em cada um dos sub-sistemas (Chapman et al., 1996).

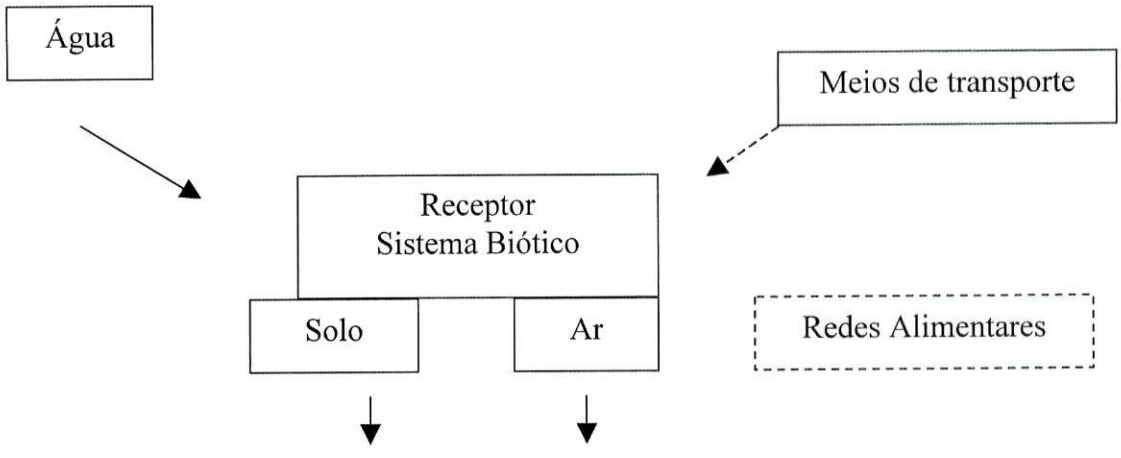


Figura 1 – Representação esquemática do transporte dos compostos químicos no ambiente (adaptado de Soares, 1987).

Uma das principais dificuldades em Ecotoxicologia é a determinação de quando é que uma alteração é ou não ecologicamente significativa. Este problema torna-se ainda mais crítico devido às capacidades de auto-reparação e de adaptação a condições adversas, que caracterizam os sistemas bióticos. As alterações nas biomassas relativas das diferentes espécies podem levar a perturbações na estabilidade de um ecossistema (Walker *et al.* 2001). Por isso, devem ser considerados como factores-chave a ter em conta em qualquer teste em que se pretenda estudar, o impacto de poluentes na biosfera e aqueles que determinam essas biomassas (Maltby *et al.*, 1990). Os efeitos persistentes e/ou irreversíveis terão sempre de ser considerados como não desejáveis, embora por vezes um efeito reversível possa revelar-se tão prejudicial como os primeiros. Então, qualquer efeito que, directa ou indirectamente, possa provocar alterações na biomassa do sistema (tabela 1) deve ser considerado prejudicial (Walker *et al.* 2001).

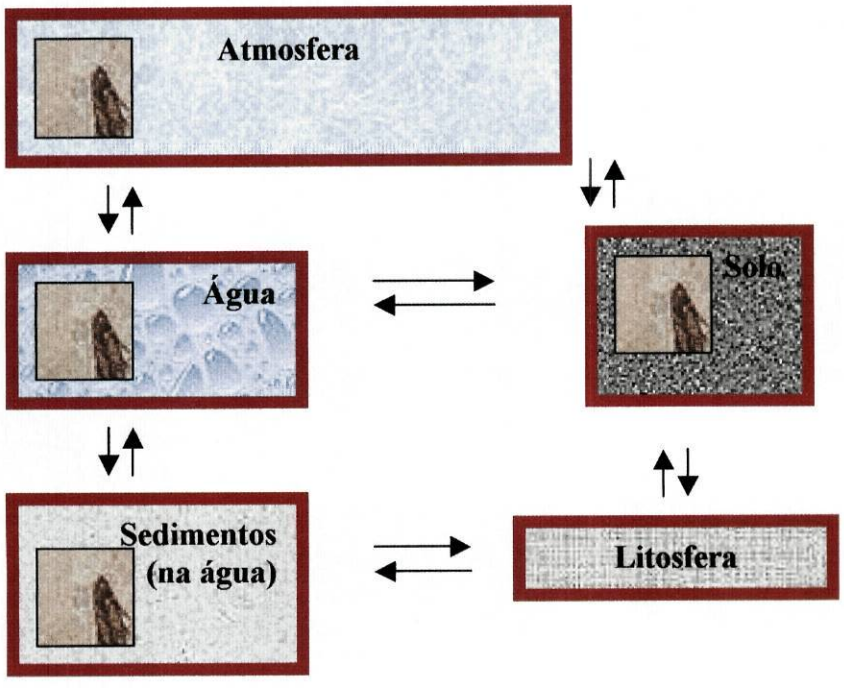


Figura 2.- Representação esquemática das inter-relações entre os vários "compartimentos" do ambiente (adaptado de Walker *et al.* 2001). Os rectângulos a vermelho representam o sistema abiótico e a figura representa o sistema biótico

Tabela 1. – Parâmetros e efeitos considerados importantes em Ecotoxicologia (adaptado de Soares, 1987).

Parâmetros	Efeitos reversíveis	Efeitos irreversíveis
a. Sobrevivência	Diminuição de esperança de vida	Morte
b. Crescimento	Diminuição da taxa de crescimento	Malformações
c. Reprodução	Diminuição da taxa de natalidade	Teratogenia
d. Genéticos	Lesões genéticas reparáveis	Aberrações cromossómicas

Resumindo, em Ecotoxicologia os estudos a nível populacional devem prevalecer sobre os estudos a níveis inferiores de organização, tendo em conta que qualquer modificação no funcionamento de um sistema biótico que conduza a alterações estruturais, especialmente ao nível da comunidade, é considerada indesejável (Trevan, 1992). A Ecotoxicologia tem por função evitar, principalmente através de uma acção preventiva, este tipo de situações (Nebel *et al.*, 1996).

A complexicidade dos testes em Ecotoxicologia está relacionada com a previsão do impacto que concentrações reduzidas de um poluente (Van Hattum *et al.*, 1991), mantidas durante longos períodos de tempo e que afectam comunidades de organismos originando fenómenos inter-específicos e sub-letais (OCDE, 1995). Para a resolução destas questões, o ideal seria a realização de testes multi-específicos, isto é, testes que envolvem várias espécies. Uma vez que estes testes são muito morosos e dispendiosos, tem-se adoptado uma metodologia faseada, iniciando os estudos com testes simples para todos os tóxicos e realizando-os posteriormente com testes mais complexos (multi-específicos e de campo), se for necessário (Janssen *et al.*, 1993). Um exemplo desta metodologia publicado no relatório da Academia das Ciências Naturais dos Estados Unidos (NAS, 1975), considera sequencialmente os vários tipos de testes a realizar (figura 3): preliminares (com a finalidade de encontrar um espectro adequado de concentrações a testar), de curta duração ou agudos, de longa duração ou crónicos, uni e multi-específicos e testes a um nível inferior ao do organismo (por exemplo, utilizando tecidos ou culturas de células). Actualmente, estes podem ser utilizados como testes de rasteio e precedem todos os outros (Grothe *et al.*, 1984).

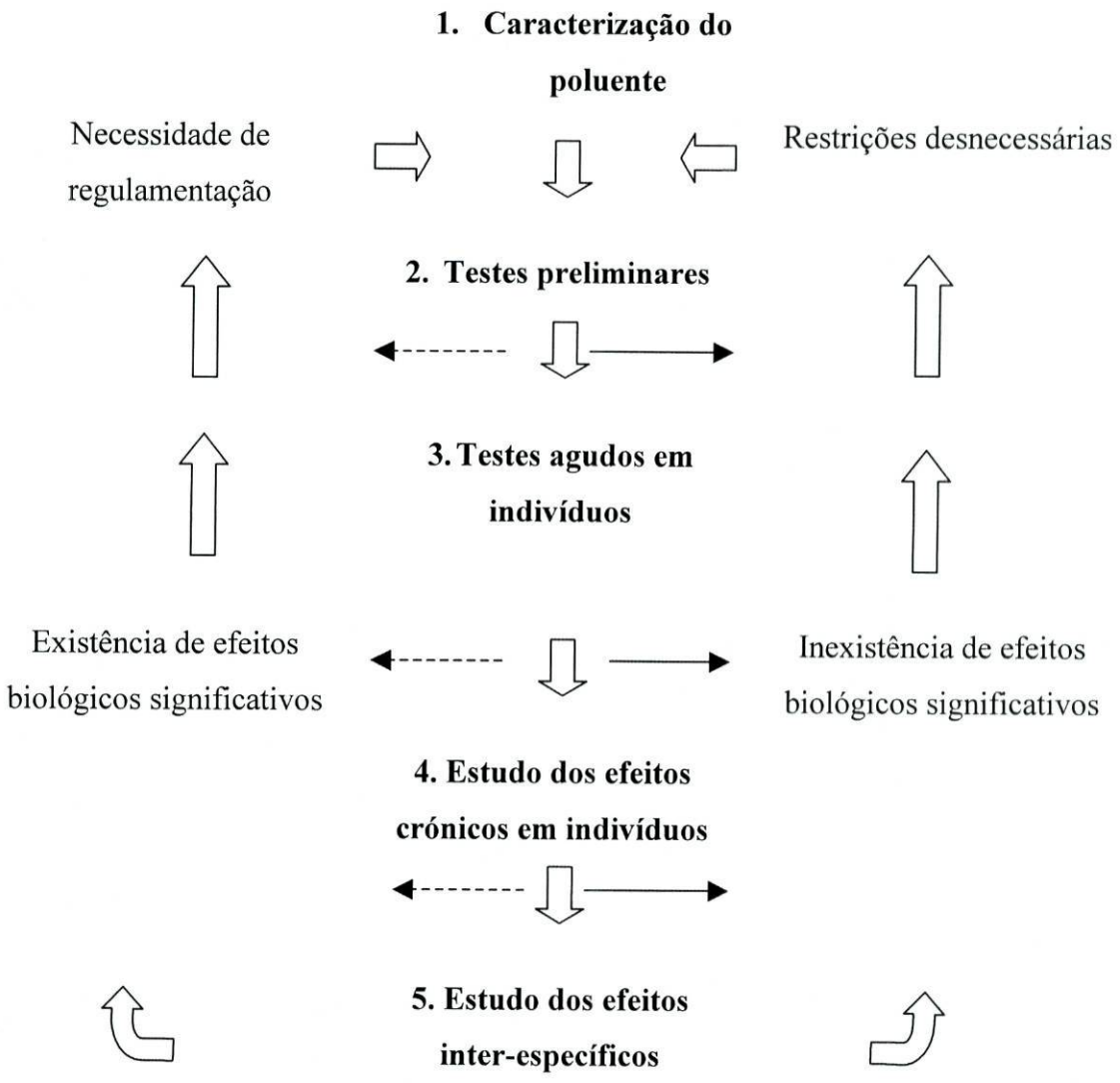


Figura 3. Metodologia utilizada nos estudos laboratoriais para a prevenção dos efeitos tóxicos de um poluente (adaptado de NAS, 1975).

Em Toxicologia Aquática entende-se por testes agudos aqueles em que há um período curto de exposição (e de observação) (Van Leeuwen, 1988) quando comparado com a duração do ciclo biológico do organismo-teste (*e.g.* 24 a 48 horas para *Daphnia magna).* Nos testes agudos os parâmetros medidos são a morte ou a imobilização e os resultados apresentam-se sob a forma de valores da concentração letal 50 (CL_{50}) ou concentração efectiva 50 (CE_{50}), que corresponde à concentração do tóxico que causam efeito em 50% da população testada durante um certo período de tempo, que deve ser especificado (Hoeven, *et al.*, 1991; Hoekstra, *et al.*, 1993; Villegas-Navarro *et al.*,

1997). Durante a realização destes testes os organismos não são, geralmente, alimentados. Referem-se como testes sub-crónicos aqueles em que o período do ensaio abrange pelo menos 10% de uma geração de um organismo-teste com um ciclo de vida de pelo menos um ano (*e.g.* peixes). Nos testes crónicos, os parâmetros indicativos de toxicidade são a inibição da reprodução, a produção de ninhadas alteradas e inibição do crescimento (Sperling, F. 1996). Os testes crónicos são aqueles que abrangem pelo menos uma geração do organismo-teste. Normalmente os testes crónicos e sub-crónicos são englobados unicamente na categoria de testes crónicos (Ratte, H. 1996), considerados como testes de longa duração (*e.g.* em *Daphnia* são considerados testes crónicos aqueles que têm uma duração de 21 dias) (Enserink *et al.*, 1990).

Os testes usados em Ecotoxicologia estão muito limitados ao estudo das relações concentração do composto no meio/efeitos provocados, devendo ser tomados determinados cuidados, especialmente em testes de longa duração, para assegurar que as concentrações no meio se mantenham constantes (Carvalho *et al.*, 1995; Erickson *et al.*, 1995). Para organismos aquáticos podem utilizar-se testes de fluxo contínuo ou intermitentes, testes semi-estáticos ou testes estáticos (Diamantino *et al.*, 1998). Nos primeiros, o meio e o tóxico são continuamente fornecidos, a uma taxa e concentração constantes, ao organismo-teste. Nos semi-estáticos, o tóxico e o meio são substituídos periodicamente. Nos testes estáticos, o tóxico é introduzido no meio no início do teste, não sendo renovado durante o período de duração do mesmo, excepto se houver degradação do tóxico e, neste caso, deve ser renovado (*e.g.* testes de toxicidade aguda com o metilparatião) (Fernandez-Casalderry *et al.* 1995; Guilhermino *et al.*, 1996[a]). A concentração de efeito não observado (CENO, concentração testada mais elevada que não produz efeitos significativamente diferentes dos observados no controlo), a concentração de efeito observado (CEO, concentração testada mais baixa que produz uma resposta significativamente diferente da do controlo), a concentração que provoca 50% de mortalidade (CL_{50}), a concentração que causou uma inibição de 50% na actividade enzimática nos ensaios *in vitro* (CI_{50}) e a concentração que causou uma inibição enzimática de 50% nos ensaios *in vivo* (CE_{50}), são índices toxicológicos ou parâmetros toxicológicos, através dos quais se expressa a toxicidade e não devem ser confundidos como "parâmetros indicativos de toxicidade" que são os critérios de efeito (e.g. morte, actividade enzimática) (Guilhermino *et al*, 1994b; Soares *et al.*, 1994).

A água além de ser o habitat de muitos organismos é também um bom meio de transporte e do destino final de muitos poluentes. Ainda que a diversidade de

organismos seja bastante grande, o estado actual de conhecimento da sua ecologia (Moriarty, F. 1993) permite a escolha de organismos padrão para utilização em Ecotoxicologia (Khangarot et al., 1987; Nebel *et al.,* 1996).

Um dos grupos mais utilizados em Ecotoxicologia é o dos crustáceos, encontrando-se bastante expandidos no meio aquático e desempenhando funções importantes nas redes alimentares, pois podem funcionar como presas ou predadores (Koivisto, S. 1995). Adicionalmente, algumas espécies têm importância económica.

1.4. *Daphnia magna*

1.4.1. Escolha do cladócero *Daphnia magna* como organismo teste

Os testes de Toxicologia aquática são habitualmente realizados com algas, invertebrados e peixes de sistemas de água doce e marinhos. A espécie *Daphnia magna* é um dos mais antigos e mais utilizados organismos teste em Ecotoxicologia (Anderson, 1980; Soares, 1987) e o seu uso sistemático foi iniciado por Naumann, há cerca de seis décadas (Baudo, 1987). Dentro dos organismos zooplanctónicos, o género *Daphnia* (Crustacea, Cladocera) ocupa uma posição central nas cadeias tróficas dos sistemas dulçaquícolas (Soares, 1990). As dáfnias alimentam-se por filtração, principalmente de algas e bactérias, encontram-se entre os principais consumidores de produtores primários (Hebert *et al.,* 1978) e são uma fonte de alimento importante para predadores, tanto invertebrados como vertebrados (Baudo, 1987).

A sensibilidade ao "stress" crónico (Lee *et al.,* 1986; Soares *et al,* 1991), o curto ciclo de vida, a elevada fecundidade e a facilidade de cultura em laboratório laboratório (Adema, 1978), levaram à escolha da *Daphnia* para ensaios ecotoxicológicos. Para além disso, a sua facilidade de manuseamento, o tamanho (suficientemente grande para observações à lupa e bastante pequeno para que se possa manter em laboratório em grande número) e os baixos custos de manutenção são características importantes para tal escolha (Guilermino *et al.*, 2000a).

A reprodução partenogénica de *Daphnia magna*, origina gerações geneticamente idênticas, permitindo o isolamento de populações com um determinado genótipo (clones) e reduzindo a variabilidade dos resultados, dado que cada clone tem uma sensibilidade característica (Baudo, 1987; Soares, 1989; Baird *et al.,* 1991; Barata *et al.,* 1998). Porém, as populações de *Daphnia magna* não têm um padrão rígido de

comportamento anual, apresentando alterações no seu ciclo reprodutivo que reflecte as condições ambientais nos diversos locais (Soares, 1987).

1.4.2. O ciclo biológico de *Daphnia magna*

As espécies do género *Daphnia* encontram-se em habitats que variam desde pequenos charcos de água até grandes lagos (Hebert *et al.,* 1978; Soares, 1987). *Daphnia magna* encontra-se geralmente em pequenos charcos de água caracterizados pela instabilidade, pois apresentam flutuações imprevisíveis, não só do alimento disponível, mas também no seu regime térmico, da água, nos gases dissolvidos e nas interacções bióticas, que podem ser permanentes ou temporários (Soares, 1987).

Daphnia magna em condições padronizadas de temperatura ($20\pm1^{0}C$), luminosidade (16 horas luz/8 horas escuro) e alimento disponível reproduz-se por partenogénese cíclica (Anderson, 1932; Hebert *et al.,* 1978; Zaffagnini, 1987). No seu ciclo de vida tem uma série de mudas sucessivas (Soares, 1989). Após cada muda de carapaça e do endurecimento desta, o indivíduo aumenta de tamanho mantendo-se constante até nova muda (Nogueira, 1992), pelo que o crescimento não é homogéneo (Soares, 1989).

Daphnia magna atinge a idade adulta (*i.e,* após a produção da primeira ninhada) ao fim de 6 a 10 dias, período durante o qual muda de carapaça 5 a 6 vezes. Este cladócero tem um ciclo reprodutivo de 3 em 3 dias, mudando de carapaça aquando da libertação de cada ninhada, produzindo de seguida novo conjunto de ovos que são depositados numa câmara incubadora (espaço entre a parte superior do corpo e a parte dorsal da carapaça) (Figura 4), onde se desenvolvem, e de onde os juvenis são libertados sendo idênticos à progenitora (Soares, 1989). Em 1978, Hebert e colaboradores afirmaram que, dependendo do tamanho do progenitor e do alimento absorvido, o número de juvenis pode variar entre 1 e 300.

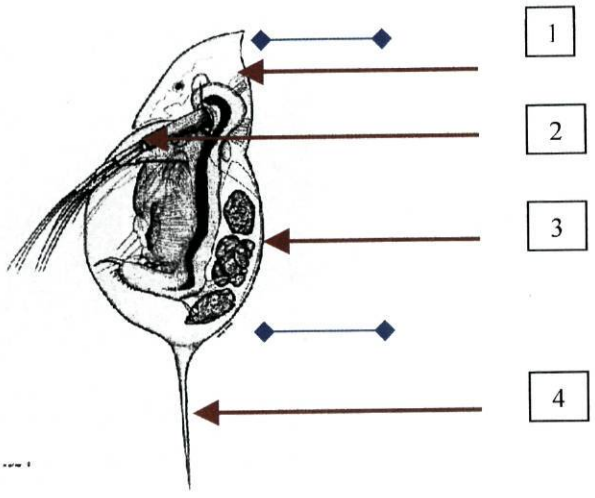


Figura 4 – Representação esquemática do cladócero *Daphnia*. 1. Cabeça; 2. Antena; 3. Câmara incubadora; 4. Espinho caudal. A distância do organismo é medida entre os traços a azul (adaptado de Peters *et al.*, 1987).

A capacidade partenogénica de *Daphnia* e a existência de dois tipos diferentes de ovos foi descrita por Lubbock, em 1857, ao verificar a formação de ovos partenogenéticos e de ovos de dormência *(ephippium)* em *Daphnia magna*, facto que foi confirmado por outros autores (Zaffagnini, 1987). Em 1978, Hebert e Ward demonstraram a ausência de recombinação genética durante a partenogénese, o que permite a propagação de genótipos idênticos. No entanto, quando as fêmeas adultas estão sujeitas a condições adversas podem produzir machos (Banta *et al.* 1939; Hebert *et al.*, 1978; Zaffagnini, 1987). Usualmente, uma ninhada é constituída por organismos de um único sexo. As ninhadas mistas também podem ocorrer e o período crítico que determina a diferenciação sexual dá-se após a deposição dos ovos na câmara incubadora (Banta *et al.*, 1939; Hebert *et al.*, 1978). Depois da formação de machos, algumas fêmeas produzem ovos haplóides que necessitam de ser fertilizados, antes de se desenvolverem. São apenas produzidos dois ovos sexuais de cada vez, envolvidos por várias membranas protectoras conhecidos por *ephippium.* As *ephippia* são resistentes à dissecação, ao congelamento e às enzimas digestivas. A maioria das *ephippia* permanece em diapausa durante um período indefinido de tempo até que o desenvolvimento posterior seja induzido (Hebert *et al.*, 1978; Soares, 1987; Zaffagnini,

1987). Assim, a reprodução sexuada é responsável pela variabilidade genética das populações (Figura 5).

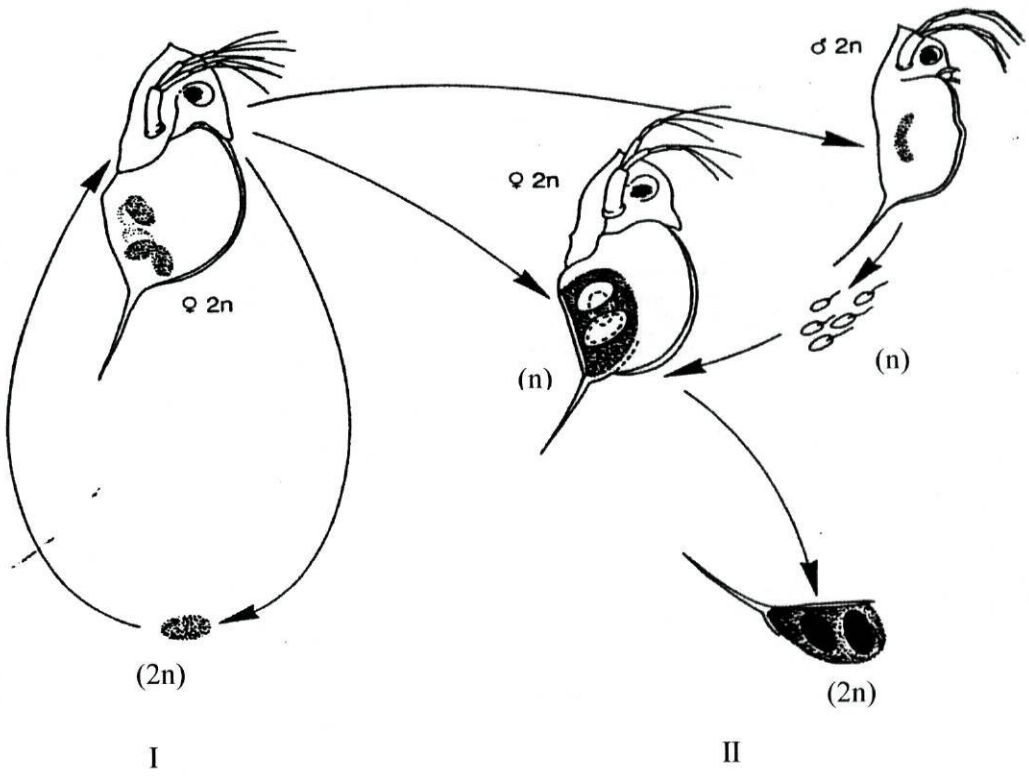


Figura 5 - Ciclo biológico de *Daphnia magna*. Em I está ilustrado o ciclo partenogénico (fase assexual), através da fêmea adulta com ovos (2n), e em II a fase sexual com a fêmea contendo ovos (n) que conjuntamente com os espermatozóides do macho (n) originam ovos (2n) denominados de ovos de repouso ou *ephipias* (adaptado e modificado de Bernardi *et al.*, 1987).

1.4.3. Padronização dos sistemas de cultura de *Daphnia magna*

A padronização dos testes ecotoxicológicos tem sido um dos assuntos de maior relevância para os ecotoxicologistas (Soares *et al.*, 1993). Nos últimos anos tem sido dedicada grande atenção e desenvolvidos esforços de forma a reduzir a variabilidade existente nos testes ecotoxicológicos (Hayes *et al.*, 1996). Em 1986 foi realizado com o apoio da Comunidade Europeia (CE), um ensaio de inter-calibração laboratorial tendo como finalidade aferir a consistência dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos a

nível interlaboratorial. Dos 37 laboratórios participantes, apenas 22 obtiveram critérios válidos, sendo os resultados finais de uma enorme variabilidade (Bradley *et al.* 1993).

Mais tarde, realizaram-se novamente ensaios interlaboratoriais, baseados nos protocolos da OCDE, tendo-se igualmente registado alguma variabilidade de resultados. Estes resultados permitiram concluir que existia uma grande necessidade em padronizar toda a metodologia laboratorial. Em 1995, decorreu novo ensaio interlaboratorial organizado pela OCDE que testaram e tentaram ultrapassar problemas identificados nos testes anteriores, do qual resultou o relatório final do teste de reprodução com *Daphnia magna* (OCDE, 1997). A padronização dos sistemas de cultura de *Daphnia* obedece a uma série de requisitos que devem ser referenciados e descritos pormenorizadamente, para que se possam obter parâmetros de ecotoxicidade dos diversos agentes poluentes comparáveis e fiáveis. Os sistemas de cultura de *Daphnia* em laboratório são planeados de forma a garantir um suprimento de juvenis saudáveis e em número suficiente para levar a cabo os testes de toxicidade aguda e crónica, o que é obtido com a manutenção de um processo contínuo de cultura. Os principais componentes dos sistema de cultura são os meios e a alimentação dos organismos (Baird *et al.*, 1989) (Figura 6). No entanto, a intensidade luminosa e o fotoperíodo são também factores de extrema importância na padronização dos sistemas de cultura (Lee *et al.*, 1986). A variabilidade dos resultados entre os laboratórios poderá ser devida aos vários tipos de meios utilizados, aos diferentes tipos de alimentação (qualitativa e quantitativa) e aos vários genótipos de *Daphnia magna* (Elendt *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 1993).

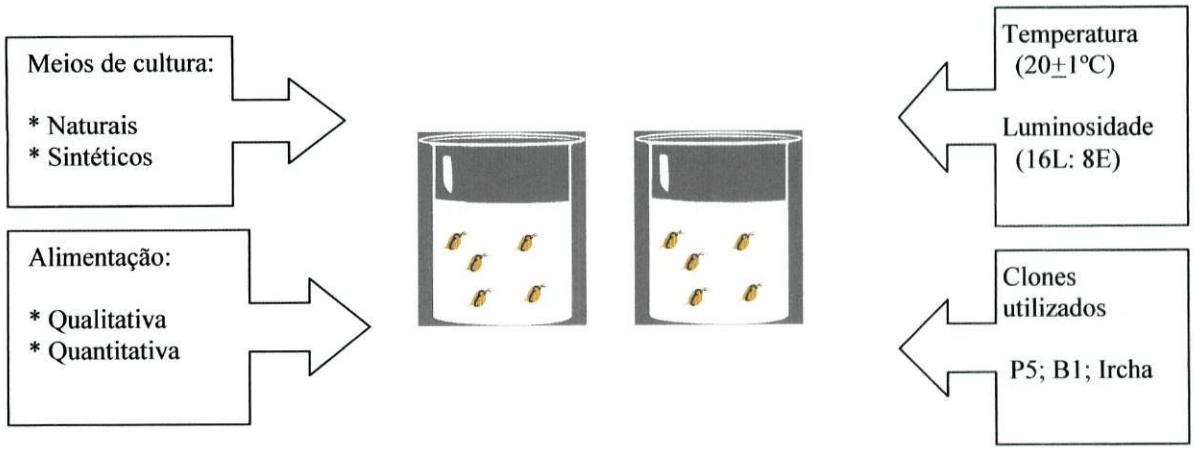


Figura 6 - Representação esquemática dos principais componentes do sistema de cultura de *Daphnia* (adaptado de Baird *et al.*, 1989).

1.5. Biomarcadores em Ecotoxicologia

1.5.1. Características

O uso de biomarcadores para avaliar os efeitos nocivos da poluição tem aumentado nos últimos anos e tem sido usado como um instrumento novo e poderoso para detectar e documentar a exposição e os efeitos da contaminação ambiental (McCarthy *et al.*, 1990; Fossi *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 2001).

Em Ecotoxicologia, o principal objectivo da avaliação dos riscos impostos pela libertação de um químico no ambiente consiste no estabelecimento da probabilidade de este causar danos nos organismos vivos (Walker *et al.*, 2001). Para isso, torna-se necessário estimar vários parâmetros, entre os quais, o efeito da exposição dos organismos ao químico e a toxicidade destes para o ambiente (Timbrell *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 2001). Tem-se procurado avaliar as alterações bioquímicas, histoquímicas e fisiológicas nos organismos expostos e não expostos, de forma a prever o efeito que determinado químico causa nas populações. O termo "biomarcador ecotoxicológico" foi adoptado por vários cientistas para se referirem a estas alterações (Huggett *et al.*, 1992). Um biomarcador ecotoxicológico é definido como uma variação bioquímica, celular, fisiológica ou comportamental que pode ser medida em amostras de tecido, nos fluídos corporais ou no corpo de todo o organismo, fornecendo uma medida de exposição e, por vezes, de efeito tóxico de um ou mais poluentes (Depledge *et al.*, 1993; Fossi *et al.*, 1997; Peakall, 1994).

A classificação mais usada para os biomarcadores é a divisão em biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito. Os biomarcadores de exposição indicam a exposição do organismo aos compostos químicos, mas não fornecem informação sobre o grau de efeitos adversos que esta exposição pode causar. Os biomarcadores de efeito são aqueles que demonstram um efeito adverso quantificável no organismo resultante dum certo grau de exposição (Mayer *et al.*, 1992; Walker *et al.*, 2001).

Os biomarcadores também se podem classificar em específicos e não-específicos. Os biomarcadores indicadores de uma resposta não-específica incluem qualquer parâmetro que seja alterado pela exposição a agentes de origem diversa. Os específicos podem subdividir-se em específicos de um orgão ou específicos do tóxico.

Os biomarcadores específicos de órgãos incluem parâmetros de funcionamento dos órgãos como a determinação das enzimas e izoenzimas características de determinados órgãos. No caso das isoenzimas, estas frequentemente dependem da presença de certas enzimas que caracteristicamente existem em concentrações muito elevadas em alguns órgãos. Estas enzimas aparecem no sangue quando esses órgãos são danificados e são indicadoras da presença e da extensão da lesão. A lactato desidrogenase (LDH) é um exemplo dessas enzimas. Os biomarcadores específicos de determinados tóxicos requerem a quantificação da actividade de certas enzimas ou biomoléculas num tecido e são indicativas do grau de exposição ou dos possíveis efeitos promovidos por um composto ou um grupo de compostos relacionados (Guilhermino *et al.*, 1994c). Como exemplo, pode referir-se a inibição da actividade da acetilcolinesterase (AChE) por compostos organofosforados e carbamatos(Guilhermino *et al.*, 1998b). Os biomarcadores específicos têm permitido avaliar a exposição a que estão sujeitos os organismos terrestres e aquáticos, relativamente aos compostos químicos, e relacionar os resultados obtidos no laboratório e no campo (Mayer *et al.*, 1992).

A escolha de um biomarcador apropriado para monitorizar a exposição e os efeitos causados por um determinado tóxico deve ser objecto de criteriosa selecção (Livingstone, 1985; Versteeg *et al.*, 1988). De acordo com os critérios estabelecidos por Mayer e colaboradores em 1992, devem ser tidos em conta os seguintes factores face a um determinado parâmetro:

- deve ser biologicamente significativo, uma vez que só é aceitável o uso de biomarcadores relacionados com processos biológicos importantes;
- deve permitir estabelecer uma relação quantitativa dose/efeito ou tempo/efeito com vista à avaliação da sua magnitude;
- deve ser relativamente fácil de medir, uma vez que o recurso a técnicas dispendiosas e/ou morosas exige pessoal qualificado e materiais sofisticados que inviabilizam a sua utilização rotineira;
- a sua variabilidade em relação a outros factores, como por exemplo factores naturais (estação do ano, temperatura, sexo, etc.) deve ser aceitável dentro de determinados limites;
- deve ser suficientemente sensível, de modo a que seja possível detectar uma variação significativa do parâmetro, sem que seja necessário o uso de doses letais do tóxico testado.

Os biomarcadores têm a vantagem de apenas quantificarem o efeito devido à fracção biologicamente disponível do poluente em estudo. Ao serem avaliados laboratorialmente ou *in situ,* no caso em que existem condições para as análises serem efectuadas no próprio local, os biomarcadores podem integrar os efeitos de vários agentes causadores de *"stress"* e podem elucidar possíveis mecanismos de acção. Apesar de tudo, a utilidade dos biomarcadores em estudos laboratoriais não tem sido aplicada por rotina na avaliação do impacto ambiental de efluentes, fontes de poluição e outros. A relativa facilidade e simplicidade dos métodos químicos analíticos usados na quantificação de contaminantes ambientais, o ênfase excessivo no desenvolvimento de biomarcadores e não na sua aplicação, bem como a dificuldade em estabelecer uma relação entre um determinado efeito num biomarcador e uma alteração ambiental específica parecem ser responsáveis pela pouca utilização dos biomarcadores em estudos laboratoriais (Mayer *et al.*, 1992).

Apesar das dificuldades, os biomarcadores constituem alternativas vantajosas relativamente a outros parâmetros. Os biomarcadores podem monitorizar as consequências de certas condições adversas, naturais ou não, a que o organismo está sujeito, mas não reflectem todas as consequências ao nível do organismo. Nas condições naturais, os organismos estão expostos a uma grande variedade de agentes físicos e químicos causadores de *"stress"* além de estarem sujeitos a flutuações sazonais que podem, elas próprias, induzirem situações de *"stress"*.

As alterações a nível bioquímico oferecem importantes vantagens para a utilização de biomarcadores (Stegeman *et al.*, 1992). Em primeiro lugar, estas alterações são normalmente as primeiras respostas detectáveis e quantificáveis, pelo que constituem um sistema de alerta em relação a possíveis efeitos adversos a nível fisiológico no organismo. Em segundo lugar, a quantificação das alterações bioquímicas servem como indicadores tanto de exposição como de efeito. Como monitores de exposição, apresentam a vantagem de quantificar somente os poluentes que se encontram biologicamente disponíveis para o organismo, pelo que apresentam uma maior relevância ecológica. Como medidas de efeito, os marcadores bioquímicos podem integrar os efeitos de vários agentes causadores de toxicidade e podem elucidar os possíveis mecanismos de acção do(s) tóxico(s). As enzimas acetilcolinesterase (AChE) e glutationa S-transferases (GST) são frequentemente utilizadas como biomarcadores. O

principal objectivo do uso destas enzimas em estudos de biomonitorização da poluição ambiental consiste na detecção de respostas sub-letais, a nível bioquímico, a compostos tóxicos, antes que os efeitos a nível fisiológico e populacional se tornem evidentes. A possibilidade de relacionar os efeitos tóxicos a nível bioquímico com os efeitos a níveis mais elevados de organização, e a ideia de que o tempo de resposta aumenta ao longo da hierarquia biológica, fornece a base conceptual para o desenvolvimento de noção de biomarcador (Peakall *et al.*, 1999).

1.5.2. Acetilcolinesterase

As colinesterases (ChE) pertencem à família de enzimas designada por esterases, sendo divididas geralmente em dois sub-grupos, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE), de acordo com a sua preferência pelos substratos acetiltiocolina e butiriltiocolina. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise da acetiltiocolina (ACh) em colina e ácido acético (O'Brien, 1967; Walker *et al.*, 2001). A butirilcolinesterase, também designada por colinesterase não-específica ou pseudocolinesterase, é uma enzima pouco especializada não sendo ainda conhecida a sua função fisiológica (Eto, 1974). A acetilcolinesterase desempenha um papel em sistemas biológicos que se reveste de uma enorme importância uma vez que promove o mecanismo de inactivação da ACh tanto a nível do sistema nervoso como da placa neuromuscular (Guyton, 1992). De facto, a função da ACh como neurotransmissor na junção neuromuscular está descrita para muitos animais, desde insectos até vertebrados superiores (Walker *et al.*, 2001), sendo reconhecida como o principal desencadeador da contracção muscular. Em condições fisiológicas normais, a acetilcolina é rapidamente hidrolisada por acção da acetilcolinesterase, finalizando deste modo a transmissão sináptica mediada por este neurotransmissor.

O conhecimento das consequências da inibição da enzima AChE foi aumentando à medida que a família de compostos organofosforados e carbamatos foi sendo sintetizada laboratorialmente. Para estes compostos, o mecanismo de inibição da AChE está directamente ligado à reacção que ocorre entre os compostos organofosforados e os grupos hidroxilo (-OH) das cadeias laterais do resíduo de serina

do centro activo desta enzima. A inibição da AChE resulta, frequentemente, na morte por paralisia. Esta inibição tem sido igualmente estudada com outros agentes químicos, como alguns metais pesados (Mayer *et al.*, 1992; Guilhermino *et al.*, 1998) bem como com agentes surfactantes (Guilhermino *et al.*, 2000b). Tendo em conta a relação quantitativa existente entre a sua actividade e a exposição aos compostos referidos, bem como a simplicidade do método colorimétrico desenvolvido por Elman e colaboradores em 1961 para a quantificação da AChE, a determinação desta enzima tem sido aplicada em estudos de laboratório e de campo (Herbert, *et al.*, 1995/1996), com vertebrados e invertebrados, para avaliação dos efeitos de exposição a insecticidas organofosforados e carbamatos (Weiss, 1958; Guilhermino *et al.*, 1996b) e a outros tóxicos como o mercúrio e paratião (Guilhermino *et al.*, 1998c).

1.5.3. Enzimas antioxidantes

Em condições fisiológicas normais verifica-se a formação contínua de espécies reactivas de oxigénio (Halliwell, 1991). No entanto, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes capazes de neutralizar e minimizar os potenciais efeitos citotóxicos das espécies reactivas de oxigénio. Estes mecanismos incluem antioxidantes endógenos (glutationa, vitamina A, C e E, ácido úrico) e enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase (GR) e glutationa S-transferase (GST) (Figura 7) cuja actividade pode ser modificada em situações de *"stress"* oxidativo.

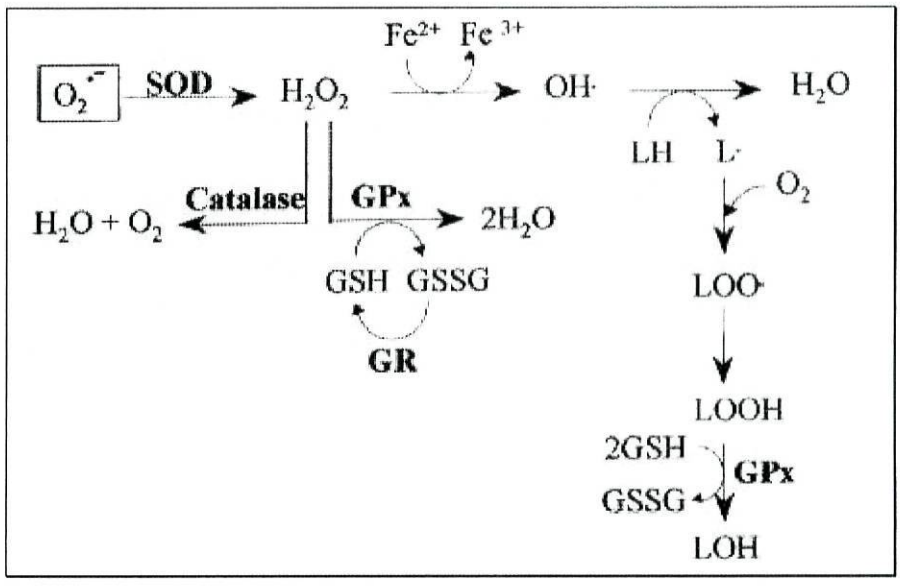


Figura 7 - Enzimas com acção antioxidantes envolvidas na defesa celular contra espécies reactivas de oxigénio (adaptado de Reed, 1998).

1.5.3.1. Catalase

A catalase é uma enzima presente essencialmente nos peroxissomas, mas também no citoplasma, que cataliza a decomposição do H_2O_2 a H_2O. A catalase exerce uma dupla função ao promover uma actividade catalítica que se inicia pela decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (I) e uma actividade peroxídica ao oxidar os dadores de H, como o metanol, ácido fórmico ou fenóis, com o consumo de peróxido (II). A decomposição enzimática do H_2O_2 obedece a uma reacção de 1ª ordem, sendo a sua velocidade sempre proporcional à quantidade de peróxido presente. A actividade da catalase pode ser monitorizada através da decomposição do peróxido de hidrogénio a 240 nm, de acordo com o método descrito por Aebi (1984).

(I) $2\ H_2O_2 \longrightarrow 2H_20 + O_2$

(II) $ROOH + AH_2 \longrightarrow H_20 + ROH + A$

1.5.3.2. Glutationa redutase

A glutationa redutase (GR) é uma enzima essencial na manutenção da relação da glutationa reduzida e da glutationa oxidada, GSH/GSSG, regenerando a glutationa na forma reduzida a partir da sua forma oxidada:

$$GSSG+NADPH+H^{+} \longrightarrow 2GSH + NADP^{+}$$

A actividade da glutationa redutase pode ser monitorizada através da oxidação do NADPH a $NADP^{+}$ a 340 nm, de acordo com o método descrito por Carlberg e colaboradores (1985). Uma unidade de glutationa redutase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto, nas condições do ensaio.

1.5.3.3. Glutationa-S-transferase

A glutationa S-transferase está envolvida no mecanismo de destoxificação de vários xenobióticos. Nos organismos superiores, a glutationa S-transferase (GST) tem um papel importante na destoxificação de um largo número de compostos (Habig *et al.*, 1974; Vermeulen *et al.*, 1996). Nos insectos, a GST apresenta um papel de relevo na biotransformação de vários insecticidas, incluindo a degradação de alguns compostos organofosforados (Lamoreux 1987). Foi descrito em Lynn e colaboradores em 2000 a alteração da actividade da GST em minhocas, quando expostas a solos com pesticidas. A glutationa-S-transferase (GST) encontra-se presente no homogeneizado de *Daphnia magna* sendo o seu valor médio de 584±99 nmoles/min/mg (utilizando como substrato conjugado o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (LeBlanc *et al.*, 1985; Gerhardsson *et al.*,1996). De facto, esta enzima cataliza a conjugação de compostos electrofílicos potencialmente tóxicos com a glutationa, resultando normalmente na formação de tioéteres menos tóxicos e mais hidrossolúveis (Van Der Aar *et al.*, 1998).

1.5.3.4. Glutationa peroxidase

A glutationa peroxidase (GPx) apresenta-se em duas principais formas, na forma independente do selénio e na forma dependente do selénio. Na forma independente de selénio é capaz de reduzir peróxidos orgânicos mas não o peróxido de hidrogénio (Kaul *et al.*, 1993). A glutationa peroxidase na forma dependente de selénio cataliza a redução do H_2O_2 com formação de GSSG e H_20. Nesta reacção, a glutationa serve de substracto da enzima. ($H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O + GSSG$).

Esta enzima encontra-se presente no citoplasma e mitocôndria. Uma vez que a nível mitocondrial não existe catalase, apenas a enzima GPx metaboliza o H_2O_2. Em condições fisiológicas normais, a GPx parece ser mais importante que a catalase na eliminação de H_2O_2 (Michiels *et al.*, 1988).

A GPx tem, ainda, a capacidade de reduzir hidroperóxidos orgânicos (ROOH) com a produção de ROH, H2O e GSSG ($ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH+H_2O+GSSG$) (Flohé *et al.*, 1984a).

1.5.3.5. Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) encontra-se presente em todos os tecidos, sendo a sua actividade particularmente elevada no fígado e rim dos organismos superiores (Frederiks *et al.*, 1997). Esta enzima é responsável pela remoção de radicais superóxido com formação de peróxido de hidrogénio ($2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$).

Pode conter diferentes grupos prostéticos metálicos, sendo os mais comuns o cobre e o zinco, presentes na enzima citoplasmática, e o manganês, que está presente na enzima mitocondrial (Flohé et al., 1984b; Somam *et al.*, 1997).

1.5.4. Glutationa reduzida

A glutationa (γ-glutamilcisteinilglicina) é o tiol não proteico mais importante nos organismos vivos e encontra-se presente em praticamente todas as células de mamíferos, onde a sua concentração intracelular é relativamente alta (entre 0,5 e 10mM), sendo o fígado o orgão mais rico neste tripeptídeo (>7mM) dado que é o local onde ela é sintetizada (Kretzschmar *et al.*, 1990). A conjugação dos tóxicos com a glutationa (GSH) é um processo de biotransformação que resulta normalmente na formação de sub-produtos com uma toxicidade menor. Estas enzimas facilitam o ataque nucleofílico do grupo sulfidrilo da glutationa reduzida (GSH) no centro electrofílico de um largo espectro de compostos. Em 1984, Dierickx demonstrou que todos os macro-invertebrados de água doce que tinham sido objecto de investigação apresentavam actividade da enzima GST. Estudos efectuados no invertebrado *Daphnia magna* demonstraram que o sistema enzimático que tem como substracto a GSH apresentava um papel importante na destoxicação de poluentes aquáticos. Foi igualmente demostrado que a enzima directamente envolvida na reacção de conjugação da GSH é a glutationa- S-transferase (LeBlanc *et al.*, 1987).

A glutationa pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou dimerizada (GSSG: forma oxidada da GSH). Em situações normais, a GSSG representa apenas uma pequena fracção da glutationa total (5%). No entanto, em situações de *"stress"* oxidativo, o quociente GSH/GSSG pode estar diminuído, uma vez que a GSH é consumida com formação de GSSG. Por acção da enzima glutationa redutase a glutationa na forma oxidada pode ser reduzida a GSH.

Em virtude da sua reactividade devida ao grupo SH presente no resíduo de cisteína, a GSH tem um papel importante na homeostase celular e na protecção contra vários agressores celulares (DeLeve *et al.*, 1991). A glutationa pode reagir com espécies reactivas de oxigénio (ROS), que compreendem radicais livres e formas moleculares de oxigénio, de dois modos diferentes. Pode actuar como redutor, originando GSSG, mediante reacção catalisada pela glutationa peroxidase, ou pode reagir directamente com os radicais livres levando à formação do radical glutationa tiilo ($GS^{\cdot}$). Por sua vez, o radical tiilo pode dimerizar e formar GSSG novamente. Através da sua acção antioxidante, a GSH apresenta um papel importante na manutenção do equilíbrio sulfidrilo-dissulfureto proteico e do potencial redox celular:

Proteína-SSG + GSH ⟷ Proteína-SH + GSSG

Este potencial é essencial para a funcionalidade de certas proteínas, nomeadamente certas enzimas, como as ATPases dependentes de Ca^{2+} (vitais para a manutenção dos níveis plasmáticos de cálcio livre). Está igualmente envolvida na regeneração do ácido ascórbico e vitamina E e na inibição da peroxidação lipídica (Sciuto, 1997). Por todas estas acções conclui-se que a GSH tem um papel muito importante na defesa celular e a sua depleção pode resultar na exacerbação da toxicidade provocada pelos xenobióticos. É de grande significado ecotoxicológico a monitorização dos seus níveis celulares nomeadamente nos organismos aquáticos quando se pretende avaliar o impacto ambiental de determinados poluentes.

1.5.5. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica conduz à destruição das membranas lipídicas (alteração da permeabilidade membranar) e à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e outros compostos electrofílicos, como o 4-hidroxinonenal, através de um processo mediado por radicais livres (Buege *et al.*, 1978). Na presença de metais de transição, nomeadamente do ferro e do cobre, pode ocorrer a formação de uma espécie oxidante reactiva (radical hidroxilo-$OH^{\cdot}$) que é resultante de uma situação de "stress" oxidativo, podendo levar à falência dos mecanismos de defesa endógenos (antioxidantes). Estas espécies oxidantes reactivas são capazes de provocar o ataque oxidativo a lípidos membranares.

O processo de peroxidação lipídica inicia-se quando um radical hidroxilo retira um hidrogénio das duplas ligações dos ácidos gordos presentes nas membranas celulares (Figura 8). Este processo é cíclico uma vez que estão constantemente a formar-se radicais lipídicos ($L^{\cdot}$). O processo termina quando há uma condensação de radicais ou a intervenção de sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Comporti, 1998).

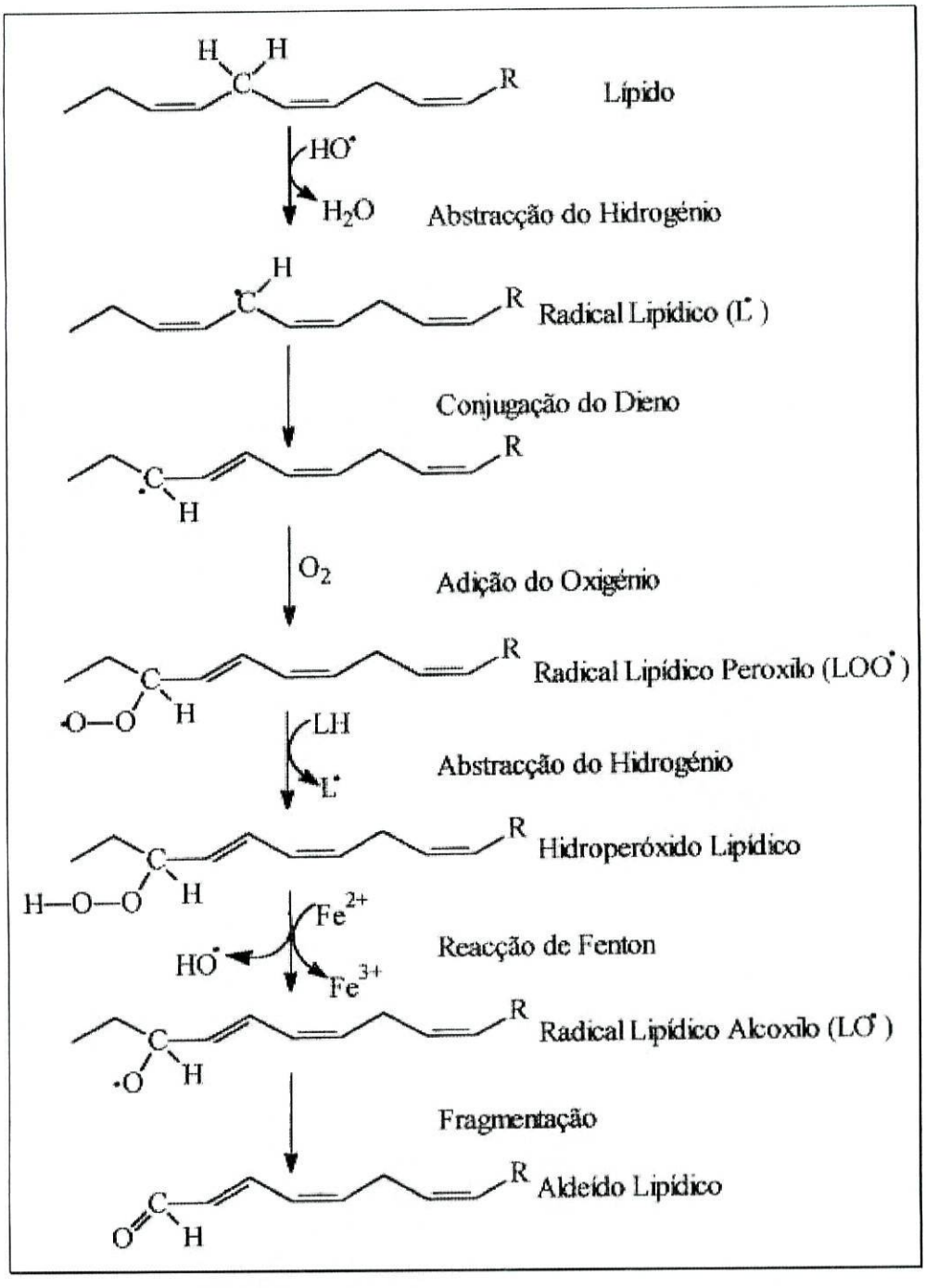


Figura 8. - Peroxidação lipídica. O radical lipídico formado ($L^{\cdot}$) é convertido sucessivamente a radical peroxilo ($LOO^{\cdot}$) pela entrada de O_2, a hiproperóxido (LOOH) e radical alcoxilo ($LOO^{\cdot}$) pela reacção de Fenton. A consequente fragmentação dá origem a hidrocarbonetos como o etanol e a aldeídos como o 4-hidroxinonenal e o malonildialdeído (Comporti, 1998).

1.6. Metais pesados: uma ameaça para os sistemas biológicos

Muitos compostos inorgânicos, especialmente os iões metálicos, desempenham nos sistemas biológicos funções essenciais na manutenção da homeostase iónica e na regulação das actividades enzimáticas e de outras proteínas com actividade biológica (Calow, P., 1993; Buikema *et al.*, 1998). Porém, concentrações elevadas destes iões podem originar efeitos tóxicos (Lee *et al.*, 1973). Este aspecto tem sido objecto de especial atenção, nomeadamente no que concerne aos efeitos tóxicos dos metais pesados, que constituem parte dos produtos e dos intermediários das tecnologias actuais (Fishbein, L. 1979). Os metais são contaminantes não biodegradáveis (Walker *et al.*, 2001).

A implementação da avaliação da toxicidade dos iões metálicos tem sido acompanhada do estudo das suas propriedades (que incluem o raio iónico hidratado e não hidratado, o comportamento do carácter químico, as constantes de estabilidade, a especiação, os produtos de solubilização, os locais preferenciais de ligação, a interdependência competitiva/cooperativa entre iões metálicos, iões não metais e moléculas orgânicas) (Calow *et al.*, 1990) e envolve o aperfeiçoamento de técnicas mais sensíveis, precisas e exactas que permitem a separação e identificação de diferentes complexos ião-ligando em tecidos e fluídos biológicos (Gerhardsson *et al.* 1996). Há uma série de variáveis que afectam a biodisponibilidade dos metais e condicionam o resultado dos ensaios que se destinam a avaliar a sua toxicidade (Ballabtyne *et al.*, 1993). Por isso é difícil prever a especiação e a biodisponibilidade dos metais no meio ambiente. Por exemplo, o Ferro e o Manganês são progressivamente libertados de sedimentos superficiais poluídos à medida que as condições se vão tornando progressivamente redutoras. Pelo contrário, o Cádmio, Cobre, Níquel, Chumbo e Zinco vão sendo libertados em quantidades cada vez maiores à medida que as condições se tornam oxidantes, enquanto que a libertação do Mercúrio e do Crómio não são afectadas pelo potencial redox dos sedimentos (Merian, E. 1984; Forbes *et al*, 1994).

O efeito potencial ou real das fontes poluidoras tem de ser avaliado, considerando os segmentos fundamentais dos meios hídricos, tendo em conta não só as características físico-químicas de efluentes e sistemas receptores mas, também, as características toxicológicas das descargas para os organismos aquáticos e consequentemente nos organismos terrestres (Hopkin, S.P.1990; Hopkins, S.P. 1993).

Muitos rios e ribeiros são contaminados numa larga extensão tanto por efluentes domésticos, como por efluentes industriais. As águas residuais provenientes da indústria de automóveis figuram entre as mais importantes fontes responsáveis pela contaminação de sistemas de água por metais pesados (Holwerda *et al.*, 1991). A toxicidade de metais pesados para os organismos aquáticos foi estudada por vários investigadores e de entre os organismos dulçaquícolas, os crustáceos são os mais sensíveis a este tipo de poluentes. Na zona do grande Porto, existem várias indústrias que se dedicam à galvanoplastia ou que trabalham com componentes de automóveis, apresentando por isso um nível elevado de metais pesados nas suas águas residuais (Hrudey, S.E. 1995). Estes efluentes, após passagem em estações de tratamento de águas residuais, são lançados em ribeiros, enquanto não existe saneamento básico que abranja toda a zona. Estas águas residuais contêm elevados níveis de crómio, cobre, níquel, zinco e alumínio.

1.6.1. Níquel

1.6.1.1. Resumo histórico

O termo níquel, tem origem no nome de um génio anão das minas, dado por desprezo a este metal, pois não tinha correspondido ao que dele esperavam os seus descobridores. É provável que no princípio da Idade do Ferro os antigos se servissem de massas meteóricas encontradas ao acaso que lhes forneciam um metal que podia ser imediatamente forjado. O ferro meteórico contém 3 a 20% de níquel. O níquel também foi utilizado em ligas de metal branco antes da era de Cristo. O "cobre branco" proveniente das minas de Yunnan, no Sul da China, serviu durante séculos para o fabrico de diversos objectos importados para a Europa durante o século XVIII (IPCS, 1991).

Em 1820, Berthier isolou o níquel como metal puro. Foi entre 1863 e 1867 que o engenheiro de minas Garnier descobriu na Nova Caledónia, a existência de depósitos ricos em níquel. Trouxe para a Europa, em 1867, amostras deste mineral. Em 1874, em consequência de um relatório de outro engenheiro de minas, Heurteau, aumentou o interesse por este mineral, tendo sido criada em 1880 uma sociedade denominada "O Níquel", e a Nova Caledónia depressa se tornou a primeira região do mundo exportadora de minerais e fundições niquelíferas. Em 1889 apareceu o níquel do

Canadá, que veio fazer grande concorrência aos minerais da Nova Caledónia, passando a ser o principal país produtor (IPCS, 1991; Lauwerys, 1993).

Embora o carbonilo de níquel tenha sido sempre reconhecido como um composto altamente tóxico (Sunderman, 1989; Zhicheng, 1994), o sulfato de níquel era recomendado como um agente medicinal para o tratamento epilepsia, enxaqueca e nevralgias no início do século XX, tendo sido abandonado nos anos 30. No entanto, estudos dessa época sugeriam que o níquel era um elemento essencial no metabolismo dos animais. A forma do cloreto de níquel tem sido empregue no tratamento de anemias, leucorreia e amenorreia (Barceloux, 1999).

1.6.1.2. Características físico-químicas

Trata-se de um elemento metálico pertencente ao grupo VIIIb da tabela periódica. É um metal de cor branca argêntea a cinzenta, brilhante, de símbolo Ni; número atómico: 28; densidade: 8,57-8,89; ponto de fusão: 1452°C; ponto de ebulição: 2340°C. A forma iónica predominante é a do níquel (II). Resiste bem aos agentes atmosféricos e é dificilmente solúvel no ácido clorídrico ou sulfúrico. O ácido nítrico diluído ataca-o energicamente. É resistente aos alcalis cáusticos (NaOH e KOH), o que justifica o seu emprego em material de laboratório (IPCS, 1991). Os sais de níquel mais importantes são o cloreto ($NiCl_2.6H_2O$), o sulfato ($NiSO_4.7H_2O$) e o nitrato ($NiNO_3.6H_2O$). A maior parte dos sais de níquel são solúveis na água, com excepção do sulfureto (NiS) (baixa solubilidade), fosfato ($NiPO_4$) e do carbonato ($NiCO_3$). Os hidróxidos são dificilmente solúveis. As soluções dos sais de níquel e os próprios sais hidratados são, em geral, verdes. Os sais anidros são geralmente amarelos. O carbonilo de níquel $Ni(CO)_4$ é um líquido incolor e volátil que se decompõe a temperaturas superiores a 50°C, libertando fumos irritantes, monóxido de carbono e níquel. Nos sistemas biológicos, o níquel dissolvido pode formar compostos complexos com diversos ligandos bem como ligar-se a materiais orgânicos (Barceloux, 1999).

1.6.1.3. Distribuição do níquel na natureza

O níquel está largamente distribuído na natureza, constituindo cerca de 8,5% da composição do núcleo terrestre (IPCS, 1991). Os minérios mais abundantes são os

óxidos e os sulfuretos de níquel. O minério de níquel está associado com outros metais, como o cobalto, cobre, ouro, mercúrio e platina.

O níquel aparece no estado nativo nos meteoritos e encontra-se correntemente ligado ao ferro em rochas eruptivas básicas sob a forma de pirite magnética, principalmente em Sudbury (Canadá), que fornece 80 a 90% da produção mundial (Heinrichs, 1980; Barceloux, 1999).

O níquel é o vigésimo quarto elemento mais abundante na crosta terrestre, compreendendo cerca de 3% da composição da terra, numa média de 50 mg Ni/Kg. A concentração de níquel no solo varia de 5 a 500 mg Ni/Kg até 24000 a 53000 mg Ni/Kg em solos situados perto de refinarias de metais. Os solos agrícolas contêm cerca de 3 a 1000 mg Ni/Kg de solo. Em função do tipo de solo (Power *et al.*, 1992), o níquel pode apresentar uma grande mobilidade dentro do perfil edáfico até atingir as águas subterrâneas, e posteriormente os rios e lagos. Os agentes físicos e químicos, por exemplo, a erosão, a precipitação, a pluviosidade, distribuem constantemente níquel pelo solo, pela água e pela atmosfera. Dependendo do tipo de solo e do seu pH o níquel é altamente móvel no solo (pH>6.7) A maior parte do níquel existe sob a forma insolúvel, enquanto que a maioria dos componentes de níquel são relativamente solúveis. Consequentemente, as chuvas ácidas tendem a aumentar a mobilização do níquel no solo, reduzindo o pH do solo (Barceloux, 1999).

As plantas terrestres absorvem-no principalmente através das raízes (Munch, D. 1992). A quantidade absorvida depende de vários parâmetros geoquímicos e físicos, nomeadamente o tipo de solo, o seu pH, teor em humidade, teor em matéria orgânica e a concentração de níquel extraível (Babich, 1982a; Coker 1993). Um caso estudado de acumulação de níquel, em algumas espécies de plantas, denominadas de hiperacumuladoras, mostrou que estas eram capazes de crescer em solos sinuosos, relativamente pouco férteis, e onde se encontraram concentrações de níquel superiores a 1 mg/Kg de peso seco (Crossmann, 1988).

Na água natural, as concentrações variam consoante se trata de água doce (2 e 10µg/L) ou de água de mar (0,2 a 0,7µg/L) (Roesijadi *et al.*, 1989). As concentrações atmosféricas de níquel em zonas remotas são da ordem de 0,1 a 3 ng/m^3(Barceloux, 1999).

A forma divalente de níquel é a predominante no meio hídrico, mas outras formas podem estar presentes dependendo do pH e da ocorrência de matérias orgânicas e inorgânicas. Nos rios, o níquel é transportado principalmente como revestimento de

partículas e ligado a matéria orgânica, sob a forma de precipitado (Phillips, D.J.H. 1993). Nos lagos, o seu transporte é feito na forma iónica ligado à matéria orgânica. As partículas de argila também podem adsorver níquel, passando para o bióta por ingestão ou absorção. Este processo de adsorção pode inverter-se, levando à libertação do níquel do sedimento. Os rios e ribeiros transportam uma parte para o mar. Estima-se que a chegada do níquel ao mar através de águas fluviais seja de cerca de 135x107 Kg/ano (Phillips, D.J.H. 1990; IPCS, 1991).

Nas águas para consumo humano, as concentrações variam entre 3 a 7 μgNi/L podendo chegar aos 35 μg/L. A água aquecida em materiais cuja composição tenha níquel pode conter concentrações de 1 a 1,5 mg/L (Nielsen *et al.*1999).

1.6.1.4. Utilização de níquel para fins industriais

O níquel é o metal mais puro que pode ser obtido industrialmente. Pelo processo de Mond (dissociação do carbonilo de níquel, $Ni(CO)_4$) e por electrólise, obtém-se industrialmente níquel com pureza igual a 99,85 a 99,95% (Mond, 1890; Barceloux, 1999).

A maior parte do níquel obtido destina-se à produção de aço inoxidável e de outras ligas muito resistentes à corrosão e à temperatura. As ligas de níquel e a niquelagem utilizam-se muito na indústria automóvel, maquinaria industrial, armamento, ferramentas, equipamento eléctrico, utensílios domésticos e no fabrico de moedas. Também se utilizam compostos de níquel como catalizadores, nas baterias e como pigmentos. Em 1985, a produção mineira mundial de níquel foi de cerca de 67 milhões de Kg (Barceloux, 1999).

1.6.1.5. Contaminação ambiental

A introdução de níquel no meio ambiente, é feita a partir de fontes naturais e de origem humana (Hughes *et al.,* 1995), circulando pelos vários compartimentos mediante processos físicos, químicos e biológicos (Lauwerys, 1993).

Na atmosfera o níquel existe principalmente na forma de aerossóis, sendo a sua concentração relativamente baixa, na ordem dos 6 a 20 ng Ni/m^3, tornando-se mais

elevada, cerca de 150ng Ni/m^3 aquando de contaminação antropogénica. Exemplos destas fontes incluem as metalurgias de ferro e alumínio, fontes de combustão ou incineração de resíduos, entre outras (Henry *et al.*, 1982; Barceloux, 1999).

A combustão de óleos naturais contribui grandemente para a contaminação do ar, onde a forma predominante é o sulfato de níquel (Krishnan, 1982). O ambiente próximo destas fontes encontra-se contaminado por pequenas quantidades de óxido de níquel e complexos de óxido de ferro assim como níquel metálico e sub-sulfureto de níquel. O carbonilo de níquel é instável no ar e decompõe-se em óxido de níquel (Barceloux, 1999).

O transporte e a distribuição das partículas de níquel aos diferentes compartimentos do meio ambiente ou entre eles depende de certa forma do tamanho das partículas e das condições meteorológicas. A distribuição por tamanhos das partículas depende principalmente das fontes de emissão. De uma forma geral, as partículas provenientes de fontes antropogénicas são mais pequenas relativamente às fontes naturais (Barceloux, 1999).

Por eliminação a partir da atmosfera, o níquel entra na hidrosfera, através das escorrências superficiais, das descargas dos resíduos industriais e municipais, como também por acção da erosão natural dos solos e das rochas (Barceloux, 1999).

A quantidade total de níquel das águas varia consoante as zonas. Um estudo de águas de superfície nos EUA, indicou que a gama de concentrações varia desde 5 μg Ni/L no sul do Nevada até 600 μg Ni/L no rio Ohio Basin (IPCS, 1991).

O níquel proveniente dos diferentes processos industriais e de outras fontes, vai dar origem a águas residuais. Os efluentes resultantes do tratamento prévio das ETAR's, eliminam-se mediante a injecção em poços profundos, drenado para os oceanos, tratamento de solos e incineração (Hrudey, 1985; Crossmann, 1988). Os efluentes das estações de tratamento de águas residuais contêm, segundo os dados disponíveis, cerca de 0,2 mg de níquel/L. Os valores estipulados pelo decreto vigente, Dec-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto, determina para o níquel valores máximos admissíveis de 2,0 mg Ni/L.

As principais fontes de emissão de níquel para a atmosfera são a combustão de carvão e petróleo para a obtenção de calor e energia, a incineração de resíduos e lamas, a extracção mineira e a produção primaria de níquel, o fabrico de aço, a galvanoplastia e outras fontes, como a produção de cimento (Hartenstein, 1981; Hobbs, 1986). No ar contaminado predominam as formas do sulfato, os óxidos (Brien *et al.*, 1996) e os

sulfuretos de níquel, e em menor quantidade o níquel metálico (Kowalczyk, 1982; Hoff, 1986).

1.6.1.6. Exposição e toxicidade do níquel no Homem

Em situações normais de exposição humana a valores habituais presentes na atmosfera, que oscilam entre 5 e 35 ng/m3 em zonas rurais e urbanas, a inalação deste elemento é de 0,1-0,7 μg/dia (Uthus, 1996b; EPA, 1990).

A sua concentração nos alimentos encontra-se abaixo de 0,5 mg/Kg de peso fresco. A ingestão diária de níquel varia bastante consoante os hábitos alimentares, podendo oscilar entre 100 e 800 μg/dia (Nielsen, 1984). A ingestão média de níquel na dieta é, na maioria dos países, de 100 a 300 μg/dia (Clement, 1980). Os utensílios de cozinha libertam níquel (Kuligowski *et al.*, 1992), contribuindo também para a sua ingestão (Dabeka, 1995). Os fumadores que consomem cerca de 40 cigarros diários podem absorver através dos pulmões 2 a 23 μgNi/dia.

A exposição cutânea no meio ambiente é importante, pois induz e mantém a hipersensibilidade por contacto cutâneo (*e.g.* joalharia, moedas, clips) (Linden, C. 1992; Nielsen, 1993). Pode também existir exposição iatrogénica ao níquel devido a implantes, próteses com materiais que contêm níquel, diálises e a meios de contraste radiográfico (Webster, 1980; Barceloux, 1999). Estima-se que a absorção média de níquel por via intravenosa a partir dos fluídos de diálise é de 100 μg por tratamento (Nielsen, 1993). Existem milhares de trabalhadores que estão constantemente expostos a ambientes com elevadas concentrações de níquel, nomeadamente nas operações de soldadura, niquelagem e polimento, extracção de minério, fundições e outras indústrias metalúrgicas (Barceloux, 1999).

Assim, o homem e os animais podem absorver níquel por inalação, por ingestão ou por via cutânea (Warner, J.S. 1994; Tjalve *et al.*, 1994). A absorção respiratória, seguida de assimilação gastrointestinal secundária de níquel (na forma solúvel e insolúvel), é a principal via de penetração durante a exposição nos locais de trabalho (Lauwerys, 1993). As condições de trabalho deficientes, bem como reduzida higiene pessoal (Cox *et al.*, 1991), podem contribuir para a exposição gastrointestinal. A absorção percutânea é relativamente insignificante, sendo mais importante nas situações de hipersensibilidade por contacto. A absorção está relacionada com a solubilidade do

composto, seguindo a seguinte ordem: carbonilo de níquel>compostos solúveis de níquel>compostos de níquel insolúveis (Barceloux, 1999; Haber, 2000).

Relativamente aos efeitos no ser humano, o carbonilo de níquel é o composto do metal que apresenta uma toxicidade mais acentuada. Entre os efeitos de intoxicação aguda que causa, estão sintomas como cefaleias, náuseas, vómitos, irritabilidade, seguidos de transtornos pulmonares análogos aos produzidos por uma pneumonia vírica. Entre as lesões patológicas pulmonares figuram hemorragias, edema e desorganização celular. Também são afectados o fígado, os rins, as cápsulas suprarenais, o baço e o cérebro. Houve casos de intoxicações em pacientes submetidos a diálise devido a contaminação pelo níquel e em galvanizadores que acidentalmente ingeriram água contaminada por sulfato e cloreto de níquel. Foram descritos casos de efeitos crónicos, como rinites, sinusites, perfuração do septo nasal e asma, entre trabalhadores das industrias de niquelagem (Doll *et al.*, 1977). Foram descritos casos de efeitos nefrotóxicos, como edema renal com hipertermia e degeneração parenquimatosa, em casos de exposição industrial acidental ao carbonilo de níquel (Barceloux, 1999).

O dietilditiocarbamato de sódio é utilizado na clínica para quelatar o níquel após exposição ao carbonilo de níquel (Tjalve, 1984; Sunderman, 1988, Sunderman, 1992). O níquel e compostos de níquel são conhecidos como cancerígenos (Aller, 1997). Contudo, a identidade do composto de níquel ou compostos que aumentam o risco de cancro continua por clarificar. Presentemente, há poucos dados de epidemiologia para indicar que a exposição ao níquel metálico aumenta o risco de cancro ou que a exposição a formas cancerígenas de níquel cause cancro do pulmão e na cavidade nasal (Pang *et.al.*,1993; Barceloux, 1999).

Embora estudos em animais associem a falta de níquel a limitações de crescimento (Uthus *et al.*, 1996b), diminuição da taxa de reprodução e alteração dos níveis de lípidos e glucose séricos, ainda não foi claramente definido um estado de insuficiência no homem (Grandjean, 1988; Dunnick, 1995).

1.6.1.7. Ecotoxicidade do níquel

A toxicidade do níquel para invertebrados aquáticos varia consideravelmente de acordo com as espécies e factores abióticos (Calleja *et al.*, 1992; Cairnes *et al.*, 1998). Os compostos de níquel libertados através de efluentes contaminados podem atingir concentrações na água susceptíveis de provocar efeitos nefastos nos organismos,

podendo promover alterações a nível da cadeia trófica e consequentemente levar a impactos negativos no meio ambiente (Wren *et al.*, 1991).

O efeito do níquel nos seres vivos do meio ambiente, pode ser avaliado sob vários prismas (Jenkins, D.W. 1990b; Wong, C.K. 1993). Nos microorganismos (Codina *et al.*, 1995), nomeadamente nos actinomicetos, fungos, eubactérias marinhas (Florence *et al.*, 1994) e de água doce o crescimento é inibido a concentrações de níquel de 1 a 5 mgNi/L, enquanto que nos fungos filamentosos essa concentração varia de 5 a 1000mgNi/L (Babich *et al.*, 1982a; Babich *et al.*, 1982b). Nas algas, não foi observado crescimento a concentrações de 0,05 a 5 mg Ni/L (Fisher, 1996).

Para espécies do género *Daphnia* foi encontrado uma concentração letal a 50% (CL_{50}) de 0,5mgNi/L às 96 horas, enquanto que no caso de moluscos, o valor de CL_{50} foi de 0,2mgNi/L às 96 horas, em duas espécies de gastrópodes de água doce e de 110mgNi/L em bivalves (Cowgill, 1976; Lazareva, 1985; Phillips, 1985). A toxicidade do níquel para o cladócero *Daphnia magna*, foi também avaliada por Khangarot e colaboradores em (1989) (Biesinger *et al.*, 1972; Kszos *et al.*, 1991).

Em peixes, os valores encontrados para a CL_{50} após uma exposição de 96 horas situaram-se entre 4 e 20mgNi/L, podendo ser mais elevada em certas espécies (Khangarot, *et al.*, 1987). Estudos de toxicidade crónica efectuada em peixes a nível do seu desenvolvimento demonstraram que para a truta arco-íris havia alterações mesmo em concentrações muito baixas, na ordem dos 0,05mgNi/L (Barceloux, 1999).

Níveis de níquel superiores a 50 mg/Kg de peso seco são tóxicos para a maioria das plantas. Observaram-se casos de acumulação e efeitos tóxicos em hortaliças cultivadas em solos tratados com lamas residuais e na proximidade de fontes de emissão deste metal (Tyler, G. 1990). Foi observado que, do ponto de vista de toxicidade, o cobre tem um efeito sinérgico com o níquel, enquanto que o cálcio reduz a sua toxicidade (Hutchinson, 1975; Barceloux, 1999).

Existem poucos dados sobre os efeitos do níquel em animais terrestres (Fargosava, A. 1997). A minhoca parece ser relativamente insensível a este metal. Em meios ricos em microrganismos e matéria orgânica, o níquel fica menos disponível para as minhocas. Foi demonstrado que a exposição por um longo período à inalação do níquel metálico, óxido de níquel ou subsulfureto de níquel provocava lesões nas mucosas e uma reacção inflamatória no tracto respiratório de ratos, ratazanas e cobaias (Stanlg, 1996). Em ratos expostos à inalação de aerossóis de cloreto de níquel ou óxido de níquel observou-se hiperplasia epitelial (Festing, M.F.W. 1994; Uthus, 1996a).

1.6.1.8. Bioacumulação do níquel em organismos aquáticos

Watras e colaboradores em 1985, estudaram a acumulação do níquel em dois níveis de uma cadeia alimentar aquática simples, utilizando as espécies *Scenedesmus obliquos* e *Daphnia magna*. A alga acumulou níquel de 30 a 300 vezes superior à concentração existente no meio ambiente (Watras *et al,* 1985). No caso de *Daphnia*, os valores de concentração foram da ordem de 2 a 12 vezes superiores (Lazareda, 1985; Bodar *et al.,* 1988). Verificou-se haver diferenças em termos de acumulação, dependente do meio de cultura ter apenas níquel e do meio de cultura ser suplementado com algas que tinham sido previamente expostas ao níquel (Jenkins, W.D. 1980a). Isto indica que o fenómeno de acumulação se torna mais evidente quando há ingestão de algas (IPCS, 1991).

Estes resultados confirmam estudos efectuados por Hall em 1982, que descrevia a acumulação do níquel em *Daphnia magna* como resultado do somatório de cinco processos, nomeadamente, adsorção e desadsorção da superfície dos tecidos e do organismo, absorção, retenção ou armazenagem e excreção (Hall, 1982; Hansen, 1983).

Estudos efectuados em peixes permitiram verificar que nestes organismos é diminuta a capacidade de acumulação deste metal (Dallinger, 1985). Verificou-se que a concentração de níquel em peixes de águas não contaminadas oscilam entre 0,02 e 2mg/Kg, podendo apresentar valores dez vezes superiores em organismos procedentes de águas contaminadas.

1.6.1.9. Biomagnificação do níquel em organismos aquáticos

Parece não ocorrer biomagnificação do níquel ao longo da cadeia alimentar, pelo menos em ecossistemas aquáticos. Hutchinson e colaboradores em 1975, aquando dos seus estudos relativos ao elemento níquel em sistemas aquáticos, encontraram um factor de concentração elevado nos produtores e um factor diminuto nos níveis tróficos mais elevados. Numa cadeia alimentar pequena, constituido basicamente por uma alga (*Scenedesmus obliquos*) e por uma espécie de zooplancton (*Daphnia magna*) não houve biomagnificação (Watras *et al.* 1985). Pelo facto da concentração do níquel nos ecossistemas aquáticos diminuir à medida que o nível da cadeia alimentar aumenta, podemos afirmar que não ocorre biomagnificação (Barceloux, 1999).

CAPÍTULO II

Material e Métodos

2.1. Material Biológico: crustáceo cladocero *Daphnia magna*

2.1.1. Cultura de *Daphnia magna*

As culturas de *Daphnia magna* foram mantidas em sala com temperatura e fotoperíodos controlados (20 ± 1ºC; 16h luz: 8h escuro). Os ensaios biológicos foram sempre realizados nestas condições.

O meio de cultura utilizado foi água dura ASTM (ASTM, 1980) (adiante referido apenas como ASTM), enriquecida com o extracto de algas "Marinure 25" (fornecido pela Pann Brittanica Industries, Ltd, Waltham, Abbey, U.K.). Foi utilizado o meio ASTM, porque, quando lhe é adicionado um aditivo orgânico, permite um bom desenvolvimento das culturas, sendo também considerado um bom meio de teste (Guilhermino *et al.*, 1997), tendo sido utilizado por diversos autores (Glazier, 1992; Allen *et al.*, 1995).

O meio ASTM (tabela 2) utilizado no decorrer deste estudo foi preparado a partir de soluções em água destilada (condutividade < 10µS/cm) dos compostos $NaHCO_3$ (19,2g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (12g/L), KCl(0,8g/L) e $CaSO_4.2H_2O$ (0,6g/L). Para cada 20 litros de ASTM foram utilizados 200 mL das soluções de $NaHCO_3$, $MgSO_4.7H_2O$, KCl e quatro litros da solução de $CaSO_4.2H_2O$, sendo o restante volume completado com água destilada. Todos os compostos usados eram de grau de pureza pró análise (p.a.).

Tabela 2 – Composição química, pH e dureza do meio ASTM (adaptado de ASTM, 1980)

Composição	Quantidade /L de solução
$NaHCO_3$	192 mg/L
$MgSO_4.7H_2O$	120 mg/L
KCl	8 mg/L
$CaSO_4.2H_2O$	120 mg/L
pH: 7.5 - 8.1	
Dureza: 160-180 mg/L de $CaCO_3$	

As três primeiras soluções foram preparadas com antecedência e conservadas no frio (4°C), durante um período máximo de 1 mês. A solução de $CaSO_4.2H_2O$ foi preparada imediatamente antes de ser utilizada.

A solução de extracto de algas usada para enriquecer o meio ASTM foi obtida por diluição do extracto de algas em água destilada. A concentração da solução de extracto de algas foi ajustada de modo a que a absorvância, a 400 nm, de uma amostra diluída (proporção de 1:10) se situasse entre 0,6 e 0,64. A solução de extracto foi conservada a +4°C até à sua utilização. Na tabela 3, está indicada a composição do aditivo orgânico "Marinure 25" que é um extracto de alga denominada *Ascophyllum nodosum*.

Tabela 3 - Composição média do aditivo "Marinure 25" pulverizado (retirado de Pann Brittanica Industries, Ltd) (adaptado de Soares, 1989).

Quantidade em percentagem		Quantidade por L de solução	
Matéria seca	92-95 %	Alumínio	5.0 mg/L
Matéria orgânica	50-55 %	Boro	82 mg/L
Matéria inorgânica	40-45 %	Cobalto	1.6 mg/L
Azoto	1.40 %	Cobre	5.0 mg/L
Fósforo	0.05 %	Ferro	3000 mg/L
Potássio	2.5 %	Iodo	1800 mg/L
Cálcio	1.2 %	Manganésio	12.0 mg/L
Magnésio	0.8 %	Níquel	5.0 mg/L
Enxofre	3.7 %	Vanádio	0.7 mg/L
Cloro	4.0 %	Zinco	100.0 mg/L
		Citoquininas e outras hormonas de crescimento	160-260 mg/L

As culturas de *Daphnia magna,* foram mantidas ao longo do ano, durante o período de estudo, em recipientes de vidro, semi-tapados de modo a permitir a circulação de ar, em 800 mL de meio ASTM suplementado com vitaminas e 6 mL/L de extracto de algas. Foi adicionado diariamente uma suspensão de *Chlorella vulgaris,* de

concentração conhecida de modo a fornecer uma ração de alimento constante ($3x10^5$ células /mL/dafnia). O meio foi renovado 3 vezes por semana, em dias alternados. Em cada recipiente foi mantido um número máximo de 10 fêmeas em reprodução ou 10 a 12 juvenis (inicialmente foram colocadas 20 juvenis nos recipientes de 800 mL e após se observarem os primeiros ovos no marsúpio, aproximadamente ao fim de 5 dias, o grupo foi reduzido para 10 animais, a fim de diminuir a competição entre os organismos pelos recursos disponíveis). As fêmeas foram mantidas até à produção da terceira e quinta ninhada, altura em que foi iniciada uma nova cultura. Os juvenis provenientes da terceira até à quinta ninhada, com menos de 24 horas, foram utilizados nos testes de toxicidade. Deste modo, foram sempre mantidas duas culturas em simultâneo, uma de juvenis em crescimento e outra de fêmeas em reprodução. No caso de ocorrer a produção de machos ou de ovos de repouso, a cultura era interrompida, sendo substituída logo que possível. A alimentação foi constituída por uma ração de *C. vulgaris* ($3x10^5$ células /mL/dafnia equivalente a 0.885-1.5 µg C/mL/dafnia) fornecida a intervalos de 48 horas. Na figura 9 seguinte está representado esquematicamente o procedimento seguido.

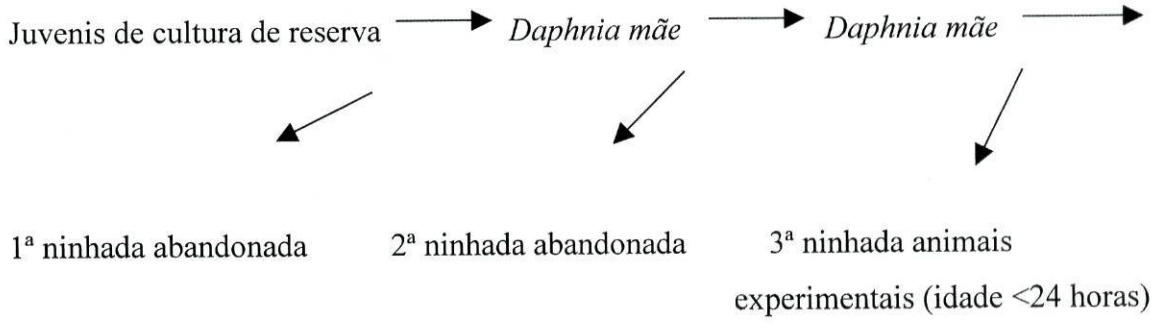


Figura 9 – Esquema utilizado de renovação de culturas de *D. magna*.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

2.1.2. *Chlorella vulgaris* como fonte de alimento para *Daphnia magna*

Como já foi referido, as culturas de *Daphnia magna* foram alimentadas com *Clorella vulgaris* cultivada em laboratório. Esta alga verde, por permitir um bom desenvolvimento de *Daphnia magna* e ser de cultivo relativamente simples em laboratório, tem sido uma das fontes de alimento mais utilizadas na Europa sendo uma das espécies recomendadas nas normas da OCDE (OCDE, 1997). A cultura desta alga é realizada em condições assépticas. O meio de cultura utilizado foi o "Woods Hole MBL" (referido adiante apenas como MBL) (Stein, 1973) (tabela 4). Após a preparação do meio de cultura, este foi submetido a um processo de esterilização por calor húmido antes da adição de vitaminas. Estas foram adicionadas em condições assépticas. As soluções foram preparadas com antecedência, sendo conservadas a +4°C por um período inferior a 1 mês, com excepção da solução de vitaminas que após divididas em alíquotas de 1mL foram congeladas a -25°C. Este meio foi preparado pela adição sucessiva das soluções de macronutrientes, de micronutrientes, de vitaminas e do tampão Tris ao volume pretendido de água ultrapura. Todas as diluições foram efectuadas com água ultrapura de condutividade igual ou inferior a 10 µS/cm sendo os reagentes utilizados de grau analítico. Para evitar contaminações, quer no material quer no meio de cultura (antes da adição das vitaminas), estes foram autoclavados a 120°C, durante 1 hora, antes da sua utilização. As culturas foram manuseadas em condições assépticas.

As culturas foram inoculadas com 20 mL de uma cultura de algas pré-existente em 3 litros de MBL, tendo sido submetidas a arejamento contínuo fazendo borbulhar ar previamente filtrado (filtro de 0,2 µm) no seu interior por intermédio de um borbulhador de ar inserido no meio de cultura, ligado a uma bomba de ar. Foram mantidas a 25±2°C, com um fotoperíodo de 24 horas de luz e uma intensidade luminosa de aproximadamente 2000 lux.

Tabela 4 - Composição do meio de cultura de *Chlorella vulgaris* MBL (pH=7,2) (adaptado de Soares, 1989)

Quantidade / 1000 mL de solução			
MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES	
$CaCl_2.2H_2O$	36,76 g/L	Na2 EDTA	4,86 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	36,97 g/L	$FeCl_3.6H_2O$	3,15 g/L
$NaHCO_3$	12,60 g/L	$CuSO_4.5H_2O$	0,01 g/L
K_2HPO_4	8,71 g/L	$ZnSO_4.7H_2O$	0,022 g/L
$NaNO_3$	85,01 g/L	$CoCl_2.6H_2O$	0,01 g/L
$Na\ SiO_3.9H_2O$	28,42 g/L	$MnCl_2.4H_2O$	0,18g/L
		$Na\ MoO\ 2H_2O$	0,006 g/L
VITAMINAS		TRIS	
Tiamina. HCI	0,1 mg/L	Hidroximetil-aminometano	250g/L
Biotina	0,5 ug/L		
Cianocobalamina	0,5ug/L	***Nota:*** ***Ajustar o pH da solução Tris a 7,2, adicionando HCl.***	

Ao fim de dois a três dias aproximadamente, após se atingir a fase de crescimento exponencial das culturas, retiraram-se do recipiente a suspensão de algas, preparando o alimento para *Daphnia magna*. As algas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3500 rpm (2041 g). O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento de algas foi ressuspenso em meio ASTM. A absorvância da solução de algas foi lida, a um comprimento de onda de 440 nm (Espectofotómetro Jenway 6100), a partir de uma diluição de 0.5 mL do concentrado de algas para 4.5 mL de meio ASTM (*i.e.*, diluição de 1:10). As soluções de algas com uma absorvância entre 0,3 e 0,8, foram armazenadas a 4^0C por um período não superior a 8 dias. A quantidade de alimento administrado aos organismos foi de volume variável, consoante a absorvância registada, de modo a manter constante o número de células disponível (previamente estabelecido em $3x10^5$ células /mL/dafnia) e a ração diária de carbono. O alimento foi conservado a 4°C e utilizado durante um período máximo de três dias. O alimento preparado em excesso foi congelado a –25°C. Sempre que possível foi utilizado alimento fresco. No entanto, quando as culturas de *C. vulgaris* não se encontravam em boas condições, era fornecido alimento congelado, aceite como um bom substituto do alimento fresco (Cox *et al.*, 1992).

2.2. Substâncias e soluções teste utilizadas

No estudo de ecotoxicidade foram utilizadas amostras de efluente, de uma matriz simuladora e de sais solúveis de níquel, conforme se descreve de seguida.

O efluente de uma indústria de componentes de automóveis, foi recolhido antes e após a Estação de Pré-Tratamento de Águas Residuais Industriais (EPTARI) sendo posteriormente descarregado no meio receptor (ribeiro) na zona industrial de Oliveira de Azeméis. As recolhas foram efectuadas em Janeiro de 1999 e Outubro de 1999. Os procedimentos de recolha das amostras seguiu as normas ISO 5667/3, tendo sido efectuada uma recolha do efluente por amostragem composta durante 24 horas (APHA, 1996). Foi utilizado como solução de reserva a partir do qual foram preparadas, por diluição em ASTM, cinco soluções-teste (6.25, 12.5, 25, 50 e 100% de efluente). As amostras do efluente foram guardadas em frascos de polietileno previamente passados por ácido nítrico a 5% e imediatamente congeladas (-20°C) até análise físico-química. Os testes para avaliação da toxicidade do efluente para *Daphnia magna* foram efectuados de imediato.

Foi efectuada a caracterização do efluente nas várias amostragens relativamente aos metais, níquel, crómio total, cobre, chumbo, cádmio e alumínio, utilizando a técnica de Espectofotometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica. Após determinação das concentrações dos metais, preparou-se uma solução padrão com as concentrações médias dos metais já referidos. Esta solução padrão, contendo a mistura dos vários metais, passou a denominar-se matriz simuladora.

Foram utilizados quatro sais de níquel como substâncias teste que incluiram o cloreto de níquel, o nitrato de níquel, o sulfureto de níquel e o sub-sulfureto de níquel. Para cada sal, foram preparadas soluções de reserva. A partir de cada solução de reserva e, para cada teste, foram efectuadas diluições sucessivas com meio de ASTM, sem vitaminas e sem aditivo. Estas diluições foram usadas como soluções de teste.

O níquel, na forma de $NiCl_2$ (com uma pureza de 99.95%), apresenta um peso molecular de 129,62 na forma de $Ni(NO_3)_2.6H_2O$ (com uma pureza de 99.999%), apresenta um peso molecular de 290.81, na forma de NiS_2 (com uma pureza de 99.98%), apresenta um peso molecular de 122.84 e na forma de Ni_3S_2 (com uma pureza de 99.7%), apresenta um peso molecular de 240.25. O nitrato e cloreto de níquel foram fornecidos pela empresa de reagentes químicos Aldrich (USA) e as formas do sulfureto e subsulfureto de níquel pela empresa Alfa Aesar (Alemanha).

Para avaliar a toxicidade aguda utilizada nos testes convencionais e realizar os testes *in vitro* com o efluente e com a matriz simuladora utilizaram-se seis diluições (6.25, 12.5, 25, 50 e 100% de efluente e da matriz simuladora) e os controlos respectivos utilizando ASTM.

Para a realização dos testes *in vivo*, ou seja, para a avaliação da toxicidade sub-letal, utilizaram-se cinco concentrações (sendo a concentração mais elevada a concentração próxima da que provocou a morte a 50% dos animais teste no teste agudo convencional-LC_{50}), utilizando um factor de 1.3 ou 1.5 para o cálculo das concentrações inferiores.

No caso dos testes agudos convencionais e dos ensaios *in vitro* com sais solúveis de níquel, nomeadamente cloreto de níquel, nitrato de níquel, sulfureto de níquel e sub-sulfureto de níquel, as concentrações utilizadas foram as seguintes: 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 mg/L relativamente ao ião Ni^{2+}. Foi utilizada água ultra-pura para a preparação da solução de reserva, tendo sido efectuadas as diluições seguintes com ASTM. Para os ensaios *in vivo*, ou seja para a avaliação da toxicidade sub-letal, utilizaram-se cinco concentrações e os controlos respectivos foram efectuados com ASTM. A série de concentrações utilizadas foi estabelecida com base na concentração letal a 50% (LC_{50}) encontrada nos testes agudos convencionais para cada tóxico, utilizando um factor de 1.3 ou 1.5 para determinar as concentrações abaixo deste valor.

2.3. Ensaios convencionais para avaliação da toxicidade aguda do níquel para *Daphnia magna*

Para os ensaios de toxicidade aguda do níquel com *Daphnia magna* utilizaram-se como modelo juvenis de *Daphnia magna*, da terceira à quinta ninhada, isolados com idades inferiores a 24 horas e provenientes de culturas laboratoriais. Os testes foram realizados, seguindo o protocolo da OCDE (OCDE, 1997), mas utilizando o meio ASTM, conforme já referido, durante 48 horas, sem alimento e sem renovação de meio. Os juvenis isolados (20 animais por tratamento) foram expostos em grupos de 5 por 100 mL de solução-teste (quatro recipientes). Os grupos controlo foram mantidos em ASTM. No início do teste, os juvenis foram distribuídos aleatoriamente pela solução controlo e pelas diferentes concentrações do efluente, da matriz simuladora ou dos sais. As exposições às diferentes substâncias teste decorreram em copos de vidro de 175 mL

com tampa de plástico apenas colocadas em cima, para permitirem a circulação de ar e contendo 100 mL da concentração. Após a transferência de 5 dáfnias por cada copo foi determinado o valor de pH e de oxigénio dissolvido. Os valores de pH e as concentrações de oxigénio dissolvido foram medidos diariamente, em todos os recipientes, utilizando um potenciómetro WTW 340 e um oxímetro WTW 320. Para cada condição de exposição e respectivos controlos foram efectuadas 3 réplicas. O parâmetro indicativo de toxicidade foi a morte, reconhecida pela imobilização durante 15 segundos sob a acção de um estímulo luminoso. A partir destes resultados foram calculados os valores da CL_{50}, utilizando a análise Probit (Finney, 1971).

Os critérios de validação dos testes foram, i) mortalidade inferior ou igual a 10% no grupo controlo, ii) variação dos valores de pH dos meios inferior ou igual a 1,5 unidades de pH, iii) concentração de oxigénio dissolvido superior a 3 mg/L.

2.4. Testes *in vivo* utilizando a enzima AchE como parâmetro indicativo de toxicidade

Os testes *in vivo* foram efectuados incubando durante 48 horas juvenis, da terceira à quinta ninhada, isolados com idades compreendidas entre as 6 e as 24 horas de idade, na ausência e em presença de várias concentrações de cada uma das substâncias teste. Os ensaios foram realizados durante 48 horas, em condições estáticas e sem alimento. Os juvenis isolados foram submetidos a várias concentrações da substância teste, registando-se a mortalidade obtida após 48 horas tendo sido posteriormente efectuada a determinação da actividade enzima acetilcolinesterase nos animais sobreviventes.

No início do teste, os juvenis foram distribuídos aleatoriamente pelo controlo e pelos diferentes tratamentos. As exposições aos diferentes agentes decorreram em copos de vidro de 1000 mL com tampa de vidro não completamente tapados de modo a permitir o arejamento, contendo 800 mL da solução-teste. Após a transferência de 20 dáfnias por cada copo, foi determinado o valor de pH e de oxigénio dissolvido (às 0h, 24h e 48 horas). Foram efectuadas 3 réplicas por tratamento.

No final do teste, a partir dos animais expostos a cada concentração, foram preparados homogeneizados (35 juvenis por mL de tampão fosfato 0,1M, pH=7.2) nos quais foi determinada, em quadriplicado, a actividade da enzima AChE de acordo com a

técnica de Ellman e colaboradores (1961) adaptada a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996). O tampão foi feito a partir de duas soluções previamente preparadas: i) uma solução 0,1M de diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) em água destilada (condutividade < 10μ S/cm) e ii) uma solução 0,1M de hidrogenofosfato dipotássico (K_2HPO_4) em água destilada. As soluções foram misturadas de modo a obter um valor de pH igual a 7,2. Os homogeneizados foram preparados utilizando um homogeneizador da marca Ystral e mantidos em gelo durante a homogeneização. Os homogeneizados foram congelados a –25°C, nunca ultrapassando duas semanas de congelamento. A partir dos resultados, foram calculados os valores de CE_{50} utilizando a análise Probit (Finney, 1971).

Os valores de pH e as concentrações de oxigénio dissolvido foram medidos diariamente, em todos os recipientes, utilizando um potenciómetro WTW 340 e um oxímetro WTW 320.

2.5. Testes *in vitro* utilizando a enzima AChE como parâmetro indicativo de toxicidade

Para os testes *in vitro,* foram isolados juvenis (da terceira à quinta ninhada) com uma idade inferior a 24 horas e mantidos durante 48 horas em meio ASTM sem alimento e sem aditivo orgânico. As restantes condições experimentais foram semelhantes às descritas para os testes *in vivo* com AChE. Após 48 horas, os organismos foram utilizados para preparar homogeneizados (35 dáfnias em 1mL de tampão fosfato) os quais foram mantidos em gelo durante a homogeneização. Os homogeneizados foram congelados a –25°C, nunca ultrapassando duas semanas de congelação. Os homogeneizados foram incubados com a substância-teste ou o efluente em diferentes concentrações, utilizando 0,005 mL da solução-teste (ou efluente), por 0,495 mL de homogeneizado. Aos controlos foram adicionados 0,005 mL de água ultrapura. Foram utilizadas três réplicas por tratamento. A actividade da AChE foi determinada em quadriplicado após estes serem incubados durante 45 minutos à temperatura ambiente, de acordo com a técnica de Ellman e colaboradores (1961) adaptada a microplaca (Guilhermino *et al.*, 1996b).

A actividade da AChE foi expressa em U/mg de proteína, correspondendo uma unidade (U) a 1 nmol de substrato hidrolisado por minuto por mL. A concentração de

proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) adaptado a microplaca. Os resultados foram posteriormente submetidos a tratamento estatístico, utilizando a análise de variância (Finney, 1971), sendo os valores de CI_{50} determinados pelo método Probit (Finney, 1971).

A actividade da enzima AChE foi determinada pelo método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), adaptado a microplaca (Guilhermino *et al.*,1996). Resumidamente, adicionaram-se 0,250 ml da solução de reacção, constituída por 30 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH = 7,2), 1 mL do reagente ditiobisnitrobenzoato (DTNB) 10 mM (19,8 mg de ácido ditiobisnitrobenzoato e 7,5 mg de hidrogenocarbonato de sódio em 10 ml de tampão fosfato) e 0,2 ml de uma solução de iodeto de acetilcolina 0,075 M, a 0,1 mL de homogeneizado de *Daphnia magna.* A actividade enzimática dos homogeneizados foi medida, em quadruplicado, num leitor de microplacas (Labsystems Multiskan EX), a 405 nm, durante cinco minutos, após um período de incubação de 10 minutos. A solução de reacção (tampão, DTNB e substrato) foi usada como branco. A actividade da enzima foi expressa em Unidades (U)/mg de proteína, correspondendo uma unidade a um nanomole de substrato hidrolisado por minuto por mL. A actividade da AChE foi expressa em U/mg de proteína, correspondendo uma unidade (U) a 1 nmol de substrato hidrolisado por minuto por mL. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) adaptado a microplaca. Os resultados foram posteriormente submetidos a tratamento estatístico, utilizando a análise de variância (Finney, 1971), sendo os valores de CI_{50} determinados pelo método Probit (Finney, 1971).

2.6. Testes *in vivo* utilizando enzimas antioxidantes como biomarcadores de ecotoxicidade, nomeadamente a enzima catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase

Foram preparados homogeneizados (35 juvenis por mL de tampão fosfato (50mM, pH=7.4 + Triton.X-100) nos quais foram determinadas as actividades das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase. Os homogeneizados foram preparados e mantidos em gelo durante a homogeneização. Os homogeneizados foram separados em alíquotas para a determinação de cada enzima segundo o seguinte esquema (Figura 10).

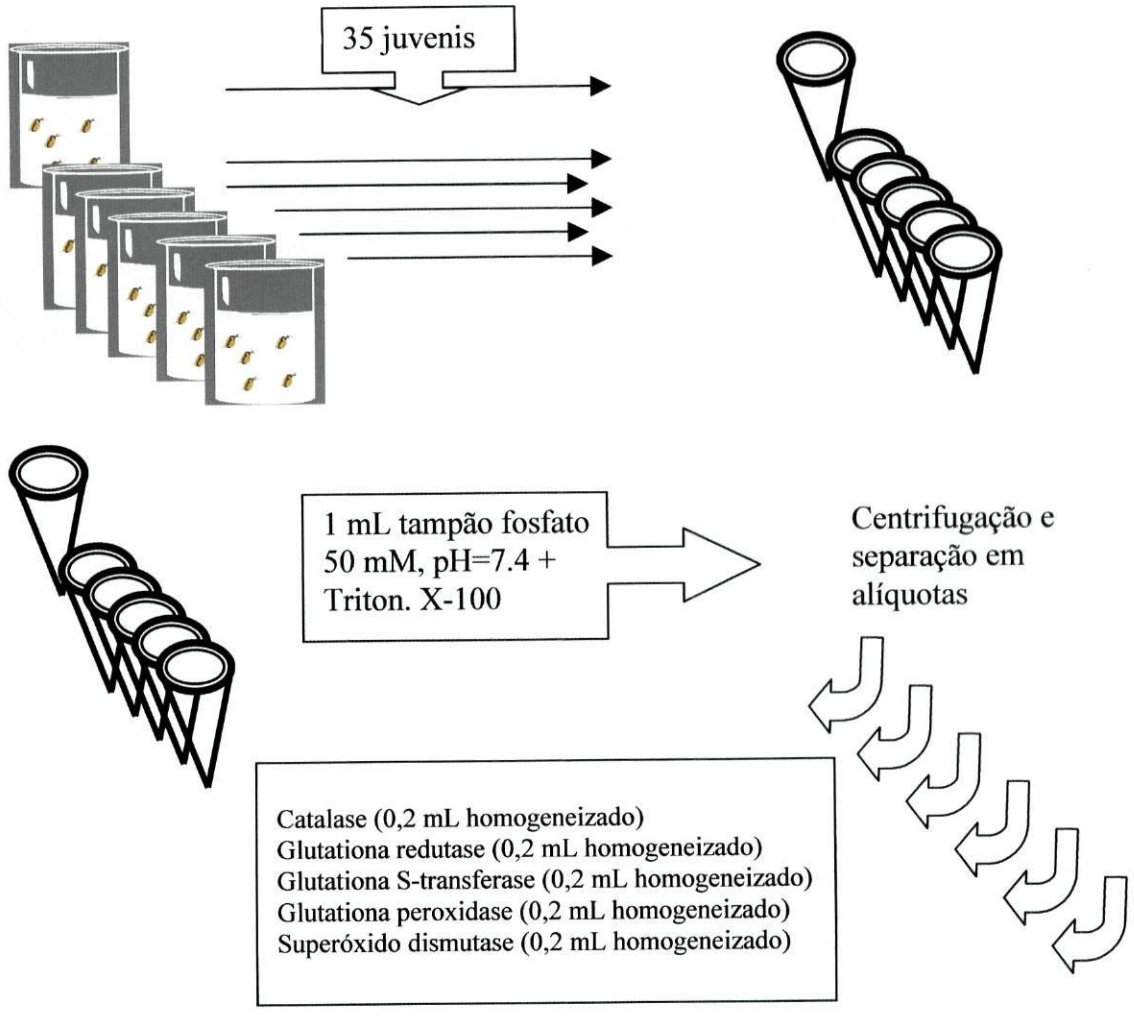


Figura 10 – Esquema utilizado para a preparação das alíquotas dos homogeneizados para consequente determinação das enzimas antioxidantes.

Para a determinação da actividade da catalase, realizou-se a análise cinética, num espectofotómetro de feixe duplo, juntando-se H_2O_2 10mM à amostra diluída em tampão fosfato (KH_2PO_4 62,5 mM, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 50mM, na proporção de 1:1,5(v/v); pH 7,0). Registou-se a diminuição da absorvância a 240nm, durante 30 segundos com leituras de 5 em 5 segundos. Os resultados foram calculados usando um coeficiente de extinção de 0,00394 $\pm$ 0,0002 mM-1mm-1 e apresentados em unidades (U) por mg de proteína, sendo uma unidade de catalase definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar uma µmol de H_2O_2 por minuto, nas condições do ensaio.

Para a determinação da actividade da glutationa redutase, realizou-se a análise cinética num leitor de placas (Ceres 9000). As amostras e o branco foram colocados em

triplicado em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se tampão fosfato EDTA (KH_2PO_4 67mM, EDTA 0,7mM; pH 7,0), solução de GSSG 1mM, 50µL de amostra (ou tampão fosfato EDTA para o branco) e por fim, solução de NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 10mM; pH 7,0). O volume final foi de 300µL. Registou-se a diminuição da absorvância a 340nm durante 5 minutos com leituras de 5 em 5 segundos, à temperatura de 30°C.

Para a determinação da actividade da glutationa-S-transferase, realizou-se a análise cinética num leitor de placas (Ceres 9000). As amostras e o branco foram colocados em triplicado em placas para leitura no leitor de placas. Estas foram pré-incubadas, durante alguns minutos, no leitor de placas, à temperatura de 30°C. Em cada poço adicionou-se tampão fosfato EDTA ($NaHPO_4.2H_2O$ 83 mM, EDTA 0,8mM; pH 6,5) colocando préviamente em banho à temperatura de 30°C, 20µL de amostra (ou tampão fosfato EDTA para o branco), solução de GSH 1mM e por fim, solução de CDNB 1 mM. Registou-se a aumento da absorvância a 340nm durante 5 minutos com leituras de 10 em 10 segundos, à temperatura de 30°C. Os resultados foram calculados usando um coeficiente de extinção de 6,22 $mM^{-1}cm^{-1}$ e apresentados em nanomoles de NAPH por minuto por miligrama de proteína.

Para a determinação da actividade da glutationa peroxidase, realizou-se a análise cinética num leitor de placas (Ceres 9000). As amostras e o branco foram colocados em triplicado em placas para leitura no leitor de placas. Estas foram pré-incubadas, durante alguns minutos, no leitor de placas, à temperatura de 30°C. Em cada poço adicionou-se tampão fosfato EDTA ($NaHPO_4.2H_2O$ 83 mM, EDTA 0,8mM; pH 6,5) colocando préviamente em banho à temperatura de 30°C, 20µL de amostra (ou tampão fosfato EDTA para o branco), solução de GSH 1mM e por fim, solução de CDNB 1 mM. Registou-se a diminuição da absorvância a 340nm durante 5 minutos com leituras de 10 em 10 segundos, à temperatura de 25°C.

Para a determinação da actividade da superóxido dismutase (SOD total), realizou-se a análise cinética num leitor de placas (Ceres 9000). As amostras e o branco foram colocados em triplicado em placas para leitura no leitor de placas. Em cada poço adicionou-se solução A (xantina 29µM em NaOH 0,001 N e 12 mg de citocromo c em tampão de fosfatos-EDTA ($NaHPO_4.2H_2O$ 33 mM, EDTA 0,07mM; pH 7,8) colocando previamente em banho à temperatura de 25°C, 50µL de amostra, solução B (solução extemporânea de xantina oxidase 0,05 U/mL em DTA 0,017 mM; mantida em gelo)

Registou-se o aumento da absorvância a 550nm durante 2 minutos com leituras de 10 em 10 segundos, à temperatura de 25°C.

A concentração de proteína nos homogeneizados de *Daphnia magna* foi determinada em triplicado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), adaptado a microplaca, e utilizando como solução padrão γ -globulinas de bovino. Resumidamente, adicionaram-se a 0,250 ml do reagente de Bradford diluído em água ultrapura (6:24) a 0,010 mL de amostra. Foram efectuados três padrões com diferentes concentrações da solução-padrão de γ-globulinas de bovino em água ultrapura. A absorvância foi lida num leitor de placas, a 595 nm, após um período de 15 minutos.

2.7. Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram expressos como a média ± erro padrão da média de três ou mais ensaios independentes.

Os dados foram tratados utilizando a análise de variância (ANOVA) unifactorial e o teste de comparações múltipla de Tukey.

Os dados referentes ao efeito inibitório das substâncias utilizadas, nas enzimas foram analisados utilizando a "nested" ANOVA, sendo os valores de efeito não observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO) determinados recorrendo ao teste de comparações múltiplas de Tukey (Zar, 1996; Zparks, T. 2000). As variâncias das amostras foram comparadas duas a duas, confrontando o seu quociente com o valor da distribuição F para uma probabilidade igual a 0,05 e para um número de graus de liberdade no numerador e no denominador igual ao número de observações menos uma unidade (n-1).

Os valores de CL_{50}, CE_{50} , e CI_{50}, foram calculados utilizando o modelo da análise "probit" (Finney, 1971).

CAPÍTULO III

Resultados

3.1. Determinação das concentrações de níquel, crómio total, cobre, chumbo, cádmio e alumínio nos efluentes industriais

A determinação do níquel, crómio total, cobre, chumbo, cádmio e alumínio foi feita no efluente, recolhido antes e após a EPTARI.

Os resultados mostram que, tanto à entrada como à saída da EPTARI, as concentrações dos diferentes metais estão dentro daqueles permitidos pela legislação actual. Verificou-se que houve variações nas concentrações dos metais nas várias recolhas como na passagem do efluente pela EPTARI. Na recolha de 28/01/99, só houve uma diminuição da concentração do cádmio e chumbo. Na recolha de 21/10/99, apenas os valores de cobre e chumbo diminuíram. Na recolha de 22/10/99 houve diminuição dos valores do níquel, cobre e chumbo. Relativamente à composição da matriz simuladora esta foi preparada a partir das concentrações dos metais avaliados na última amostragem de 22 de Outubro de 1999, à saída da EPTARI como referenciado na tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações de níquel, crómio total, cobre, chumbo, cádmio e alumínio no efluente à entrada e saída da EPTARI e na matriz simuladora.

Análise Química do Efluente						
Metais	Níquel (µg/L)	Cr Total (µg/L)	Cobre (µg/L)	Chumbo (µg/L)	Cádmio (µg/L)	Alumínio (µg/L)
Entrada 28/01/99	6,3	10,26	91,0	72,35	1,55	680
Saída 28/01/99	6,6	25,70	111,0	60,29	0,21	1580
Entrada 21/10/99	3,50	13,77	163,0	65,56	0,78	700
Saída 21/10/99	4,00	22,10	14,0	14,42	1,14	1180
Entrada 22/10/99	3,50	15,79	108,0	83,82	0,50	1220
Saída 22/10/99	2,80	16,23	15,2	15,29	1,40	1490
Matriz simuladora por 5L	14 (µg/5L)	81,2 (µg/5L)	76 (µg/5L)	76,5 (µg/5L)	7,0 (µg/5L)	7450 (µg/5L)
Dec-Lei nº236/98*	200,0 (µg/L)	200,0 (µg/L)	100,0 (µg/L)	100,0 (µg/L)	20,0 (µg/L)	10000 (µg/L)

* Decreto –Lei nº 236/98 de 1 de Agosto, regulamenta os valores máximos admissíveis para descarga de águas residuais no meio hídrico.

3.2. Ensaios Agudos Convencionais

Os ensaios agudos convencionais foram realizados com o efluente, com a matriz simuladora, com o cloreto de níquel, com o nitrato de níquel, com o sulfureto de níquel e com o sub-sulfureto de níquel. Efectuaram-se em todos os testes as medições de pH, a determinação da concentração de oxigénio dissolvido e a mortalidade das dáfnias relativamente ao controlo.

3.2.1. Teste agudo com o efluente

No ensaio agudo realizado com o efluente, verificou-se que a variação de pH nos recipientes não excedeu 1,3 unidades de pH, oscilando entre um mínimo de 6,6 e um máximo de 7,9 (Tabela 6).

A concentração de oxigénio dissolvido medida nos recipientes de teste ao longo do ensaio com o efluente foi sempre igual ou superior a 7,6 mg/L (tabela 7).

A mortalidade das dáfnias expostas a diferentes diluições do efluente foi determinada e os resultados obtidos mostram que diluições do efluente da ordem dos 3.125% são responsáveis pela diminuição do número de juvenis viáveis, tanto às 24 horas como às 48 horas. Não foram encontrados juvenis viáveis para diluições de efluente superiores a 25% (tabela 8). A mortalidade nos controlos nunca excedeu os 10% permitidos para estes testes (OCDE, 1995; OCDE, 2000).

Tabela 6 - Valores de pH medidos em várias concentrações do efluente às 0h, 24h e 48h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Efluente	Tempo de Teste		
%	O horas	24 horas	48 horas
0	7,9±0,01	7,9±0,01	7,9±0,01
3,13	7,7±0,01	7,7±0,01	7,7±0,01
6,25	7,3±0,01	7,1±0,03	7,1±0,01
12,5	7,0±0,01	7,0±0,01	7,0±0,02
25	6,7±0,05	6,7±0,01	6,6±0,04
50	6,7±0,02	6,7±0,03	7,9±0,01
100	6,7±0,01	6,6±0,03	6,6±0,05

Tabela 7 - Valores da concentração de oxigénio dissolvido medidos no meio teste (mg/L) às 0h, 24h e 48 h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Efluente	Tempo de Teste		
%	O horas	24 horas	48 horas
0	8,2±0,02	8,2±0,01	7,9±0,01
3,125	8,2±0,01	8,0±0,01	7,9±0,04
6,25	8,2±0,03	8,0±0,01	7,9±0,01
12,5	8,2±0,01	7,8±0,01	7,8±0,03
25	8,0±0,01	7,8±0,03	7,7±0,01
50	7,9±0,02	7,7±0,04	7,9±0,02
100	7,9±0,02	7,6±0,05	7,6±0,01

Tabela 8 – Número de juvenis viáveis ao fim das 24 e 48 horas após a exposição às diversas concentrações do efluente.

Efluente (%)	Tempo de teste (número de juvenis viáveis)		
	0 horas	24 horas	48 horas
0	20	20	20
1,56	20	20	20
3,125	20	17	11
6,25	20	9	2
12,5	20	4	1
25	20	0	0
50	20	0	0
100	20	0	0

As CL_{50} às 24h e 48h, calculadas utilizando a análise "probit", estão indicados na tabela 9. Os limites de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Tabela 9 - CL_{50} calculado a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais. Os limites de confiança a 95% são apresentados entre parênteses.

Amostra	CL_{50}	
	24 horas	48 horas
Efluente (%)	6,26 % (6,20-6,33)	3,47 % (3,43-3,51)
Efluente (em relação ao elemento Ni^{2+})	0,223 µg/L Ni^{2+} (0,221-0,225)	0,123 µg/L Ni^{2+} (0,122-0,125)

3.2.2. Teste agudo com a matriz simuladora

No ensaio agudo realizado com a matriz simuladora, verificou-se que a variação de pH nos recipientes não excedeu 0,8 unidades de pH, oscilando entre um mínimo de 7,0 e um máximo de 7,8 (tabela10).

A concentração de oxigénio dissolvido nos recipientes de teste ao longo do ensaio com o efluente foi sempre igual ou superior a 7.2 mg/L (tabela 11).

A mortalidade das dáfnias expostas a diferentes diluições da matriz simuladora foi determinada e os resultados obtidos mostram que diluições da matriz simuladora da ordem dos 6.25% são responsáveis pela diminuição do número de juvenis viáveis, tanto às 24 horas como às 48 horas. Não foram encontrados juvenis viáveis na matriz simuladora sem diluições, ou seja correspondente a 100% (tabela 12).

A mortalidade nos controlos nunca excedeu os 10% permitidos para estes testes (OCDE, 1995; OCDE, 2000).

Tabela 10 - Valores de pH medidos às 0h, 24h e 48 h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Matriz simuladora	Tempo de Teste		
%	O horas	24 horas	48 horas
0	7,7±0,02	7,7±0,01	7,8±0,01
3,125	7,7±0,02	7,7±0,02	7,5±0,03
6,25	7,6±0,01	7,5±0,03	7,1±0,01
12,5	7,3±0,01	7,3±0,01	7,0±0,02
25	7,3±0,03	7,3±0,01	7,0±0,01
50	7,3±0,02	7,1±0,02	7,3±0,01
100	7,3±0,01	7,1±0,02	7,1±0,02

Tabela 11 - Valores da concentração de oxigénio dissolvido medidos na matriz simuladora às 0h, 24h e 48h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Matriz simuladora	Tempo de Teste		
%	O horas	24 horas	48 horas
0	8,3±0,01	8,3±0,02	8,0±0,01
3,125	8,2±0,01	8,0±0,01	7,9±0,01
6,25	8,3±0,02	8,0±0,01	7,9±0,01
12,5	7,6±0,01	7,4±0,01	7,4±0,02
25	7,3±0,02	7,4±0,02	7,3±0,01
50	7,2±0,01	7,5±0,02	7,4±0,02
100	7,2±0,02	7,2±0,05	7,2±0,01

Tabela 12 – Número de juvenis viáveis ao fim das 24 e 48 horas, mediante a exposição às diversas concentrações da matriz simuladora.

Matriz simuladora	Tempo de teste (número de juvenis viáveis)		
(%)	0 horas	24 horas	48 horas
0	20	20	20
3,125	20	20	20
6,25	20	17	16
12,5	20	14	13
25	20	11	8
50	20	5	1
100	20	0	0

Na tabela 13 estão indicados os valores de CL_{50} obtidos após 24 e 48 horas de exposição com a matriz simuladora. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Tabela 13 - CL_{50} calculado a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais com a matriz simuladora. Os limites de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Amostra	CL_{50}	
	24 horas	48 horas
Matriz simuladora (%)	22,37 % (22,01-22,73)	15,79 % (15,58-16,01)
Matriz simuladora (em relação ao elemento Ni^{2+})	0,779 µg/L Ni^{2+} (0,767-0,792)	0,550 µg/L Ni^{2+} (0,543-0,558)

3.2.3. Teste agudo com cloreto de níquel

No ensaio agudo realizado com o cloreto de níquel, verificou-se que a variação de pH nos recipientes não excedeu 0,1 unidades de pH, oscilando entre um mínimo de 8,1 e um máximo de 8,2 (Tabela 14).

A concentração de oxigénio dissolvido medida nos recipientes de teste ao longo do ensaio com o cloreto de níquel foi sempre igual ou superior a 8.0 mg/L (tabela15).

A mortalidade das dáfnias expostas a diferentes concentrações do cloreto de níquel foi determinada e os resultados obtidos mostram que concentrações do cloreto de níquel da ordem dos 2.0 mgNi/L às 24 h e concentrações da ordem dos 1.74 mgNi/L, às 48 h são responsáveis pela diminuição do número de juvenis viáveis (tabela 16).

A mortalidade nos controlos nunca excedeu os 10% permitidos para estes testes (OCDE, 1995; OCDE, 2000).

Tabela 14 - Valores de pH medidos nas soluções de cloreto de níquel às 0h, 24h das 24 e 48h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+} (mg/L)	Tempo de Teste		
	O horas	24 horas	48 horas
0	8,1±0,01	8,1±0,01	8,1±0,01
1,74	8,1±0,02	8,2±0,02	8,1±0,02
2,0	8,1±0,01	8,2±0,02	8,1±0,01
2,3	8,1±0,01	8,1±0,01	8,1±0,02
2,65	8,1±0,02	8,2±0,02	8,1±0,02
3,04	8,1±0,02	8,2±0,01	8,1±0,01
3,5	8,2±0,03	8,2±0,02	8,1±0,03

Tabela 15 - Valores da concentração de oxigénio dissolvido medidos nos vários tratamentos, às 0h, 24h e 48h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de Teste		
	O horas	24 horas	48 horas
0	8,1±0,02	8,2±0,02	8,2±0,02
1,74	8,1±0,01	8,2±0,01	8,2±0,01
2,0	8,1±0,03	8,3±0,02	8,2±0,02
2,3	8,1±0,01	8,2±0,01	8,1±0,02
2,65	8,2±0,01	8,1±0,02	8,0±0,01
3,04	8,2±0,04	8,2±0,03	8,2±0,02
3,5	8,1±0,02	8,3±0,03	8,0±0,01

Tabela 16 – Número de juvenis viáveis no início, e após 24 e 48 horas, de exposição às diversas concentrações do cloreto de níquel.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de teste (número de juvenis viáveis)		
	0 horas	24 horas	48 horas
0	20	20	20
1,74	20	20	18
2,0	20	19	17
2,3	20	18	15
2,65	20	18	10
3,04	20	16	8
3,5	20	13	4

Na tabela 17 estão indicados os valores de CL_{50} obtidos após as 24 e 48 horas de exposição ao cloreto de níquel. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Tabela 17 - CL_{50} calculado a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais com cloreto de níquel. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada	CL_{50}	
	24 horas	48 horas
Cloreto de níquel (em relação ao elemento Ni^{2+})	3,78 mg/L Ni^{2+} (3,73-3,83)	2,74 mg/L Ni^{2+} (2,73-2,74)

3.2.4. Teste agudo com nitrato de níquel

No ensaio agudo realizado com o nitrato de níquel verificou-se que a variação de pH nos recipientes não excedeu 0,3 unidades de pH, oscilando entre um mínimo de 7,8 e um máximo de 8,1 (tabela 18).

A concentração de oxigénio dissolvido medida nos recipientes de teste ao longo do ensaio com o nitrato de níquel foi sempre igual ou superior 8,1 mg/L (tabela 19).

A mortalidade das dáfnias expostas a concentrações do nitrato de níquel foi determinada e os resultados obtidos mostram que concentrações do nitrato de níquel da ordem dos 2.5 mgNi/L são responsáveis pela diminuição do número de juvenis viáveis, tanto às 24 horas como às 48 horas. Não foram encontrados juvenis viáveis para concentrações da ordem dos 20 mgNi/L às 48h (tabela 20). A mortalidade nos controlos nunca excedeu os 10% permitidos para estes testes (OCDE, 1995; OCDE, 2000).

Tabela 18 - Valores de pH medidos nas soluções de nitrato de níquel às 0h, 24h e 48h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de Teste		
	O horas	24 horas	48 horas
0	7,9±0,01	7,9±0,02	7,9±0,02
0,625	8,0±0,01	7,9±0,01	7,9±0,02
1,25	7,8±0,03	7,8±0,02	7,8±0,01
2,5	8,0±0,03	8,0±0,01	7,9±0,02
5,0	8,1±0,02	8,1±0,02	8,0±0,01
10	8,1±0,01	8,2±0,01	8,1±0,01
20	7,9±0,03	7,9±0,02	7,9±0,03

Tabela 19 - Valores da concentração de oxigénio dissolvido medidos nas soluções de nitrato de níquel às 0h, 24h e 48h, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de Teste		
	O horas	24 horas	48 horas
0	8,2±0,01	8,2±0,01	8,2±0,02
0,625	8,2±0,01	8,1±0,01	8,1±0,01
1,25	8,3±0,02	8,3±0,01	8,3±0,03
2,5	8,3±0,02	8,3±0,01	8,2±0,02
5,0	8,2±0,01	8,2±0,02	8,2±0,03
10	8,2±0,04	8,2±0,04	8,2±0,02
20	8,2±0,02	8,2±0,03	8,1±0,03

Tabela 20 – Número de juvenis viáveis no início, e após 24 e 48 horas, de exposição às diversas concentrações do nitrato de níquel.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de teste (número de juvenis viáveis)		
	0 horas	24 horas	48 horas
0	20	20	20
0,625	20	20	20
1,25	20	20	20
2,5	20	19	18
5,0	20	14	9
10	20	7	1
20	20	7	0

Na tabela 21 estão indicados os valores de CL_{50} obtidos após 24 e 48 horas de exposição com o nitrato de níquel. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Tabela 21 – Valor de CL_{50} calculado a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais com nitro de níquel. Os limites de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada	CL_{50}	
	24 horas	48 horas
Nitrato de níquel (em relação ao elemento Ni^{2+})	8,82 mg/L Ni^{2+} (8,67-8,97)	4,96 mg/L Ni^{2+} (4,92-4,99)

3.2.5. Teste agudo com sulfureto de níquel

No ensaio agudo realizado com o sulfureto de níquel, verificou-se que a variação de pH nos recipientes não excedeu 0,4 unidades de pH, oscilando entre um mínimo de 7,8 e um máximo de 8,2 (tabela 22).

A concentração de oxigénio dissolvido medida nos recipientes de teste ao longo do ensaio com o sulfureto de níquel foi sempre igual ou superior a 7,3 mg/L (tabela 23).

A mortalidade das dáfnias expostas a diferentes concentrações do sulfureto de níquel foi determinada e os resultados obtidos mostram que concentrações do sulfureto de níquel da ordem dos 3.15 mgNi/L às 24 h e concentrações da ordem dos 1.57 mgNi/L, às 48 h são responsáveis pela diminuição do número de juvenis viáveis. Não foram encontrados juvenis viáveis para concentrações da ordem dos 50 mgNi/L às 24h e 48h (tabela 24). A mortalidade nos controlos nunca excedeu os 10% permitidos para estes testes (OCDE, 1995; OCDE, 2000).

Tabela 22 - Valores de pH medidos nas soluções de sulfureto de níquel ao longo das 24 e 48 horas, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+}	Tempo de Teste		
mg/L	O horas	24 horas	48 horas
0	7,9±0,01	7,9±0,02	7,8±0,03
1,57	7,9±0,03	8,0±0,01	7,9±0,02
3,15	7,8±0,01	7,8±0,02	8,0±0,02
6,25	8,0±0,01	8,1±0,02	8,0±0,01
12,5	8,1±0,01	8,1±0,01	8,2±0,01
25	7,8±0,01	7,8±0,01	7,9±0,01
50	7,9±0,04	7,9±0,02	7,8±0,03

Tabela 23 - Valores da concentração de oxigénio dissolvido nas soluções de sulfureto de níquel ao longo das 24 e 48 horas, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+}	Tempo de Teste		
mg/L	O horas	24 horas	48 horas
0	7,9±0,01	7,8±0,01	7,7±0,02
1,57	7,9±0,02	7,9±0,02	7,5±0,02
3,15	7,8±0,03	7,8±0,01	7,6±0,01
6,25	7,9±0,01	7,5±0,01	7,6±0,01
12,5	7,7±0,01	7,6±0,02	7,4±0,01
25	7,8±0,04	7,4±0,04	7,3±0,04
50	7,7±0,02	7,3±0,03	7,3±0,02

Tabela 24 –Número de juvenis viáveis no início, e após 24 e 48 horas, de exposição às diversas concentrações do sulfureto de níquel.

Ni^{2+}	Tempo de teste (número de juvenis viáveis)		
mg/L	0 horas	24 horas	48 horas
0	20	20	20
1,57	20	20	18
3,15	20	13	10
6,25	20	11	8
12,5	20	7	5
25	20	3	1
50	20	0	0

Na tabela 25 estão indicados os valores de CL_{50} obtidos após 24 e 48 horas de exposição com o sulfureto de níquel. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Tabela 25 – Valores de CL_{50} calculado a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais com sulfureto de níquel. Os limites de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada	CL_{50}	
	24 horas	48 horas
Sulfureto de níquel (em relação ao elemento Ni^{2+})	7,13 mg/L Ni^{2+} (7,01-7,25)	4,56 mg/L Ni^{2+} (4,47-4,66)

3.2.6. Teste agudo com sub-sulfureto de níquel

No ensaio agudo realizado com o sub-sulfureto de níquel, verificou-se que a variação de pH nos recipientes não excedeu 0,6 unidades de pH, oscilando entre um mínimo de 7,5 e um máximo de 8,1 (tabela 26).

A concentração de oxigénio dissolvido medida nos recipientes de teste ao longo do ensaio com o efluente foi sempre igual ou superior a 7.2 mg/L (tabela 27).

A mortalidade das dáfnias expostas a diferentes concentrações do sub-sulfureto de níquel foi determinada e os resultados obtidos mostram que concentrações do sub-sulfureto de níquel da ordem dos 1.57 mgNi/L são responsáveis pela diminuição do número de juvenis viáveis, tanto às 24 h como às 48h. Não foram encontrados juvenis viáveis para concentrações da ordem dos 50 mgNi/L às 24h e da ordem dos 25 mgNi/L às 48h (tabela 28).

A mortalidade nos controlos nunca excedeu os 10% permitidos para estes testes (OCDE, 1995; OCDE, 2000).

Tabela 26 - Valores de pH medidos nas soluções de sub-sulfureto de níquel ao longo das 24 e 48 horas, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de Teste		
	O horas	24 horas	48 horas
0	7,8±0,01	7,7±0,03	8,1±0,03
1,57	8,0±0,01	7,9±0,01	7,9±0,02
3,15	7,8±0,01	7,8±0,04	7,8±0,01
6,25	7,6±0,04	7,6±0,04	7,9±0,02
12,5	7,8±0,02	7,5±0,02	7,5±0,01
25	7,8±0,02	7,6±0,01	7,7±0,01
50	7,9±0,04	7,6±0,02	7,5±0,01

Tabela 27 - Valores da concentração de oxigénio dissolvido medidos nas soluções de sub-sulfureto de níquel ao longo das 24 e 48 horas, correspondentes à média das leituras efectuadas nos 4 recipientes de cada tratamento e os respectivos erros padrão.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de Teste		
	O horas	24 horas	48 horas
0	8,0±0,02	8,0±0,02	8,1±0,02
1,57	8,2±0,01	8,1±0,02	8,0±0,01
3,15	7,9 ±0,02	8,0±0,03	8,0 ±0,03
6,25	7,8±0,01	7,6±0,01	7,8±0,02
12,5	7,7±0,02	7,6±0,02	7,6±0,03
25	7,5±0,01	7,6±0,03	7,5±0,02
50	7,5±0,02	7,5±0,03	7,5±0,03

Tabela 28 –Número de juvenis viáveis no início, e após 24 e 48 horas, de exposição às diversas concentrações do sub-sulfureto de níquel.

Ni^{2+} mg/L	Tempo de teste (número de juvenis viáveis)		
	0 horas	24 horas	48 horas
0	20	20	20
1,57	20	19	16
3,15	20	12	11
6,25	20	9	8
12,5	20	5	3
25	20	1	0
50	20	0	0

Na tabela 29 estão indicados os valores de CL_{50} obtidos após as 24 e 48 horas de exposição com o sub-sulfureto de níquel. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Tabela 29 - CL_{50} calculado a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais com sub-sulfureto de níquel. Os limites de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada	CL_{50}	
	24 horas	48 horas
Sub-sulfureto de níquel (em relação ao elemento Ni^{2+})	5,38 mg/L Ni^{2+} (5,29-5,47)	3,92 mg/L Ni^{2+} (3,84-4,00)

3.2.7. Comparação da toxicidade aguda entre as várias substâncias testadas

Para a comparação da toxicidade entre o efluente, a matriz simuladora e os vários sais de níquel utilizados, determinou-se os valores de CL_{50} obtidos após as 24 e 48 horas de exposição para cada uma das várias amostras, nomeadamente o efluente, a matriz simuladora, o cloreto de níquel, o nitrato de níquel, o sulfureto de níquel e o sub-sulfureto de níquel como se encontra indicado na tabela 30.

Os resultados obtidos mostram que a toxicidade do efluente para *Daphnia magna* é muito maior do que a observada com a matriz simuladora ou com os sais de níquel. De acordo com o teor em Ni^{2+} a ordem de toxicidade obtida das várias amostras foi a seguinte: efluente > matriz simuladora > cloreto de níquel > sub-sulfureto de níquel > sulfureto de níquel > nitrato de níquel.

Tabela 30 – Valores de CL_{50} calculados a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais para as várias substâncias-teste. Cada concentração apresentada corresponde à média de 3 determinações (em 3 amostras) com o respectivo erro padrão. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada	CL_{50} (de acordo com o teor de Ni^{2+} presente)	
	24 horas	48 horas
Efluente (µg/L)	0,223 (0,221-0,225)	0,123 (0,122-0,125)
matriz simuladora (µg/L)	0,779 (0,767-0,792)	0,550 (0,543-0,558)
Cloreto de níquel (mg/L)	3,78 (3,73-3,83)	2,74 (2,73-2,74)
Sub-sulfureto de níquel (mg/L)	5,38 (5,29-5,47)	3,92 (3,84-4,00)
Sulfureto de níquel (mg/L)	7,13 (7,01-7,25)	4,56 (4,47-4,66)
Nitrato de níquel (mg/L)	8,82 (8,67-8,97)	4,96 (4,92-4,99)

3.3. Ensaios *in vitro* baseados na actividade da AChE

Para os ensaios *in vitro* usaram-se várias diluições do efluente e da matriz simuladora bem como várias concentrações do cloreto de níquel, do nitrato de níquel, do sulfureto de níquel e do sub-sulfureto de níquel estando indicadas na tabela 31. A média da actividade da AChE determinada nas amostras controlo (54 determinações) dos ensaios realizados foi de 8,990±0,563 U/mg de proteína.

Tabela 31 – Concentrações nominais de Ni^{2+} utilizadas para a realização dos ensaios *in vitro*.

Substância testada	Concentrações nominais
Efluente (%)	1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100
Matriz simuladora (%)	1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100
Cloreto de níquel (mg/L) *	1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100
Nitrato de níquel (mg/L) *	3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100
Sulfureto de níquel (mg/L) *	3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100
Sub-sulfureto de níquel (mg/L) *	3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100

* em relação ao elemento Ni^{2+} em mg/L

Os valores de CI_{50} calculados para os ensaios de inibição da actividade da AChE *in vitro* estão indicadas na tabela 32. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses. Como o cloreto de níquel, o sulfureto de níquel e o sub-sulfureto de níquel não inibiram a enzima AChE ($NiCl_2$: F=0.74; g.l.=7, 16; P>0,05; NiS_2: F=7.25; g.l.=6, 14; P>0,05; Ni_2S_3: F=0.64; g.l.=6, 14; P>0,05) não foi possível determinar os valores de CI_{50} para estas substâncias. O efluente apresentou uma toxicidade mais elevada do que a matriz simuladora e esta por sua vez é mais tóxica que o nitrato de níquel. Quanto ao efluente, à matriz simuladora e ao nitrato de níquel foram observadas diferenças significativas entre os vários tratamentos (efluente: F=3,97; g.l.=7, 16; P<0,05; matriz simuladora: F=3,46; g.l.=7, 16; P<0,05; $Ni(NO_3)_2$: F=8,06; g.l.=6, 14;

$P<0,05$). Os valores de CEO foram 0.446 µg/L, 1.7843 µg/L e 25 mg/L, para o efluente, matriz simuladora e nitrato de níquel, respectivamente (Tabela 32).

Assim, a ordem da toxicidade decrescente das amostras testadas relativamente à inibição da actividade da AChE na *Daphnia magna* foi a seguinte: efluente > matriz simuladora > nitrato de níquel.

Na tabela 32 está representada a toxicidade entre as várias substâncias utilizadas com base nas concentrações de inibição da actividade da AChE a 50%.

Tabela 32 – Valores de CI_{50}, CENO e CEO calculados a partir dos resultados obtidos nos testes *in vitro* relativamente à actividade da AChE. Cada concentração apresentada corresponde à média de 3 determinações (em 3 amostras) com o respectivo erro padrão. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Amostra	CENO (de acordo com o teor de Ni^{2+} presente)	CEO (de acordo com o teor de Ni^{2+} presente)	CI_{50} (de acordo com o teor de Ni^{2+} presente)
Efluente (µg/L)	0,223	0.446	10.082 (3.502-29.022)
Matriz simuladora (µg/L)	0,892	1.784	6.844 (3.487-13.448)
Cloreto de níquel (mg/L)	Não houve diferenças significativas relativamente ao controlo		
Nitrato de níquel (mg/L)	12,5	25	254.258 (229.856-281.258)
Sulfureto de níquel (mg/L)	Não houve diferenças significativas relativamente ao controlo		
Sub-sulfureto de níquel (mg/L)	Não houve diferenças significativas relativamente ao controlo		

3.4. Ensaios *in vivo* baseados na actividade da AChE.

As concentrações nominais utilizadas nos ensaios *in vivo* estão indicadas na tabela 33 para as diferentes substâncias, nomeadamente o efluente, a matriz simuladora, o cloreto de níquel, o nitrato de níquel, o sulfureto de níquel e o sub-sulfureto de níquel A média de actividade da AChE determinada nas amostras controlo (54 determinações) foi igual a 8,988±0,556 U/mg de proteína. Os valores de CE_{50} obtidos, relativos à inibição da AChE *in vivo* após uma exposição de 48 horas à substância-teste, estão indicados na tabela 34.

Em todos os testes, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os vários tratamentos (efluente: $F=3,974,08$; g.l.=5, 12; $P<0,05$; matriz simuladora: $F=8,76$; g.l.=6,14; $P<0,05$; $NiCl_2$: $F=4,30$; g.l.=4, 10; $P<0,05$; $Ni(NO_3)_2$: $F=4,37$; g.l.=6, 14; $P<0,05$; NiS_2: $F=8,73$; g.l.=4, 0; $P<0,05$; Ni_2S_3: $F=16,55$; g.l.=5, 12; $P<0,05$). Os valores de CEO foram 0,111 µg/L, 0,111 µg/L, 3,12 mg/L, 3,0 mg/L, 0,78 mg/L e 1,3 mg/L, para o efluente, matriz simuladora, sulfureto de níquel, nitrato de níquel, sub-sulfureto de níquel e cloreto de níquel, respectivamente (tabela 34).

O efluente apresentou, no que se refere a estes parâmetros, uma toxicidade mais elevada do que a matriz simuladora e esta por sua vez é mais tóxica que os sais de níquel. A ordem da toxicidade decrescente das amostras testadas para *Daphnia magna* foi a seguinte: efluente > matriz simuladora > sulfureto de níquel > nitrato de níquel > subsulfureto de níquel > cloreto de níquel.

Tabela 33 - Concentrações nominais das soluções teste utilizadas nos ensaios de inibição da actividade da AChE *in vivo*.

Substância testada	Concentrações nominais (em relação ao elemento Ni^{2+})
Efluente (%)	0,39; 0,78; 1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25
Matriz simuladora (%)	0,78; 1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25
Cloreto de níquel (mg/L)	0,59; 0,8; 1,3; 2,0; 3,0
Nitrato de níquel (mg/L)	0,59; 0,8; 1,3; 2,0; 3,0; 5,0
Sulfureto de níquel (mg/L)	0,78; 1,56; 3,12; 6,25
Sub-sulfureto de níquel (mg/L)	0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25

Tabela 34 – Valores da CE_{50}, CENO e CEO calculados a partir dos resultados obtidos nos testes *in vivo* relativamente à actividade da AChE. Cada concentração apresentada corresponde à média de 3 determinações (em 3 amostras) com o respectivo erro padrão. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada	CENO (em relação ao elemento Ni^{2+})	CEO (em relação ao elemento Ni^{2+})	CE_{50} (em relação ao elemento Ni^{2+})
Efluente (µg/L)	0,053	0,111	0,535 (0,031-9,189)
Matriz simuladora (µg/L)	0,0556	0,111	1,333 (0,709-2,503)
Sulfureto de níquel (mg/L)	1,56	3,12	2,963 (2,917-3,009)
Nitrato de níquel (mg/L)	2,0	3,0	6,543 (4,227-10,127)
Sub-sulfureto de níquel (mg/L)	0,39	0,78	6,903 (6,120-7,787)
Cloreto de níquel (mg/L)	0,8	1,3	8,887 (3,799-20,787)

A inibição da actividade da enzima acetilcolinesterase provocada pelo efluente, matriz simuladora, cloreto de níquel, nitrato de níquel, sulfureto de níquel e sub-sulfureto de níquel foi determinada tanto nos ensaios *in vivo*, como nos *in vitro* e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 11 a 22.

Figura 11 – Efeitos do efluente na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vitro*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

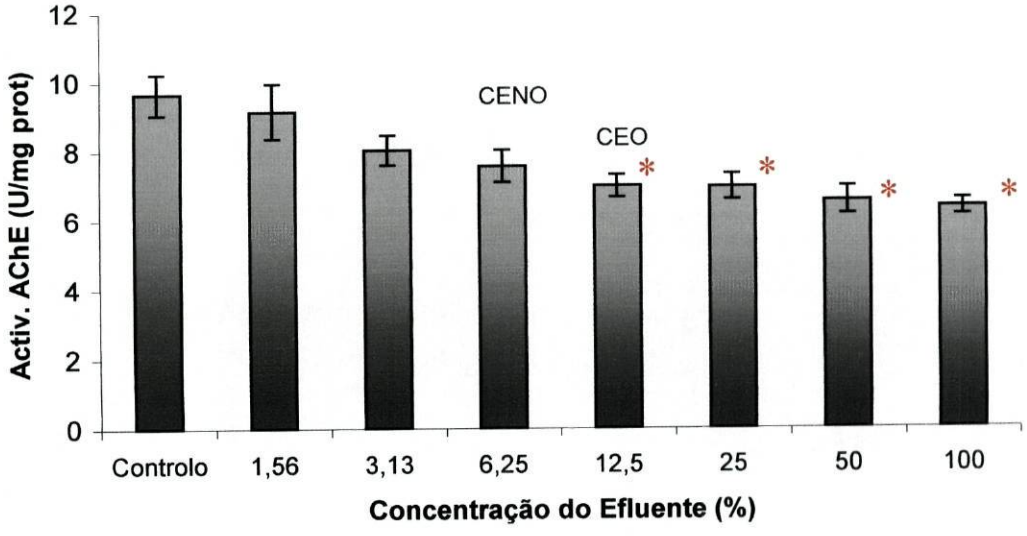


Figura 12 – Efeito da matriz simuladora na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vitro*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

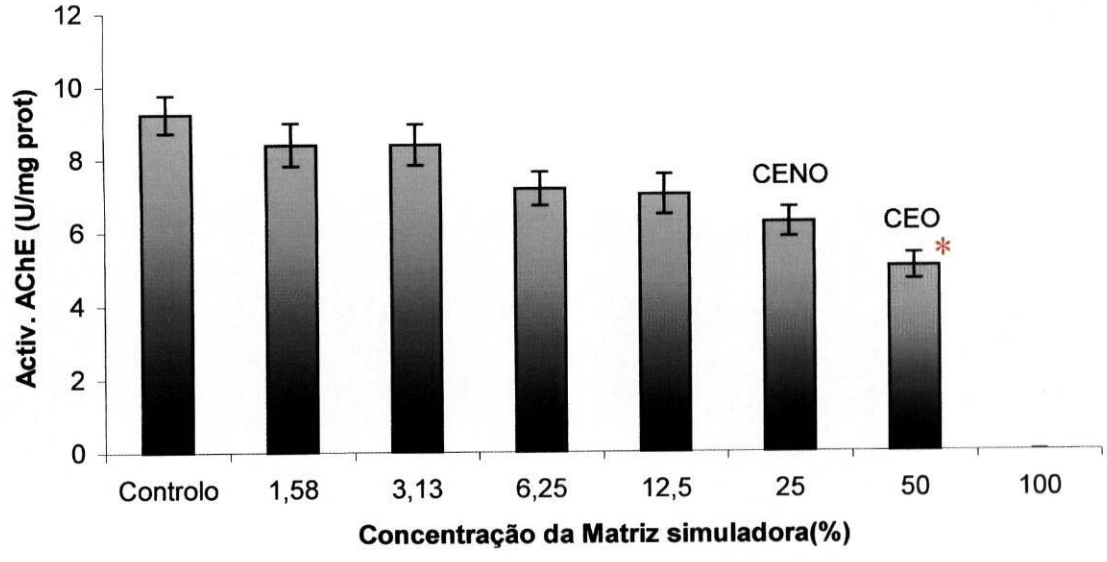


Figura 13 – Efeito do cloreto de níquel na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vitro*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão.

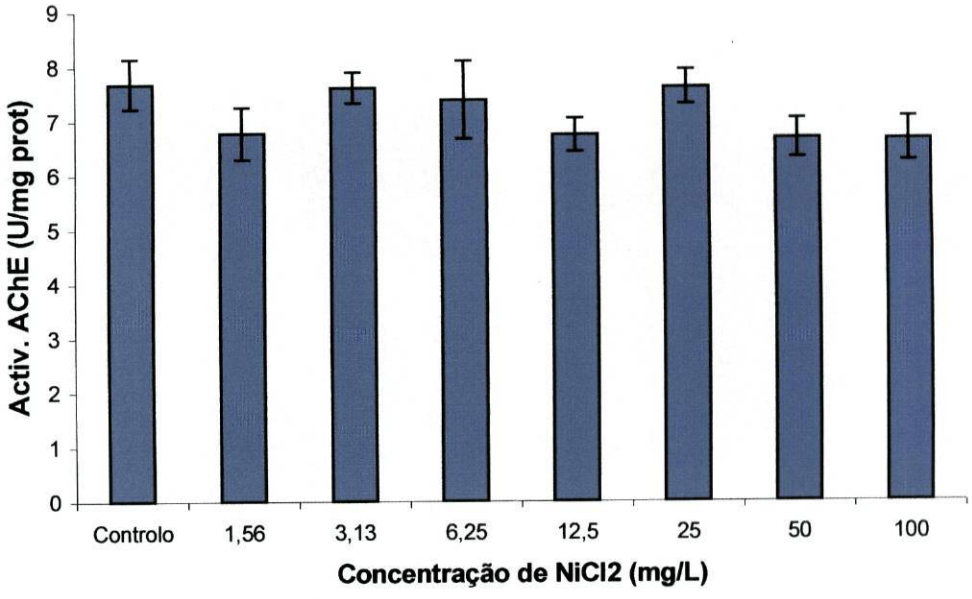


Figura 14 – Efeito do nitrato de níquel na actividade de acetilcolinesterase da *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vitro*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatísticamente significativas.

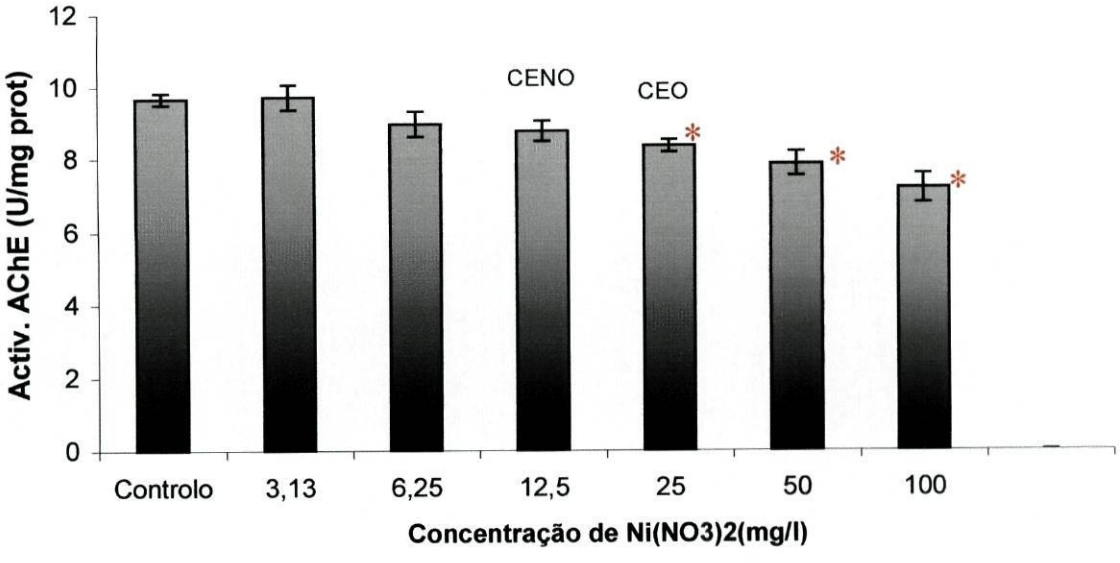


Figura 15 – Efeito do sulfureto de níquel na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vitro*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão.

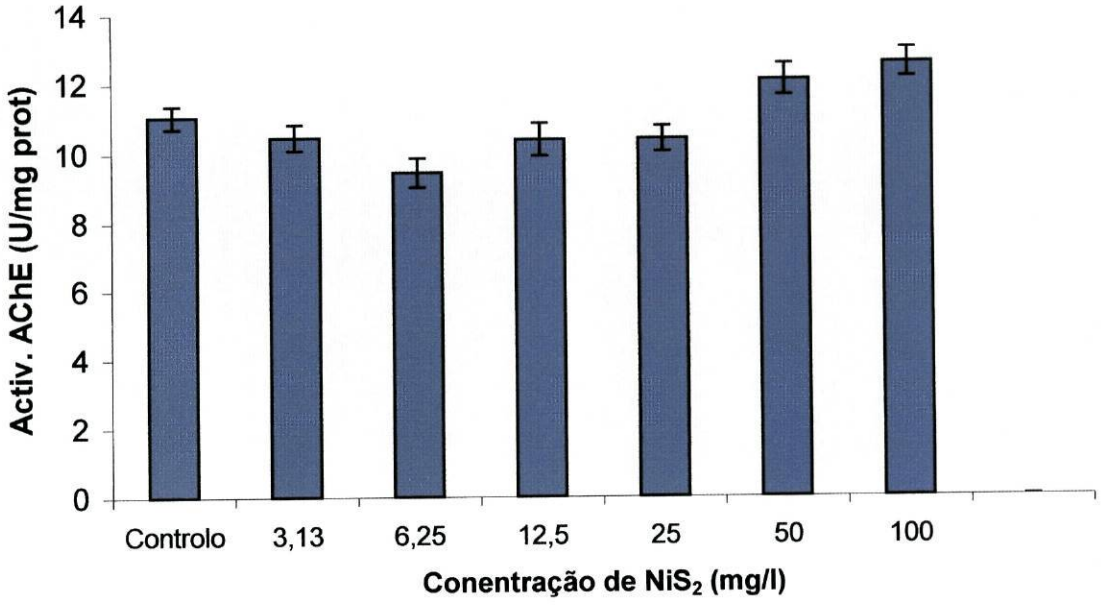


Figura 16 – Efeito do sub-sulfureto de níquel na actividade de acetilcolinesterase da *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vitro*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão.

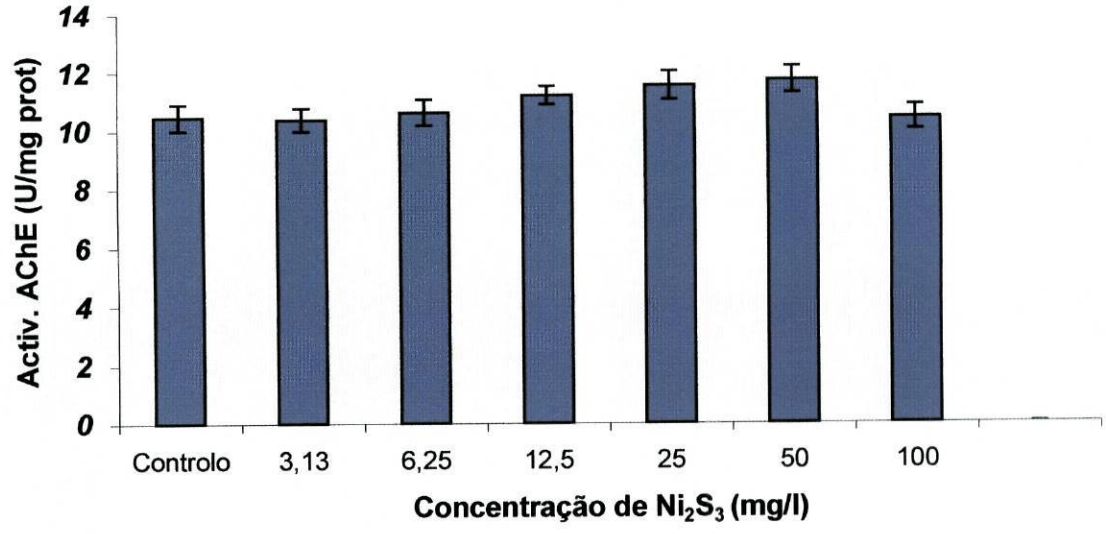


Figura 17 – Efeito do efluente na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vivo*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

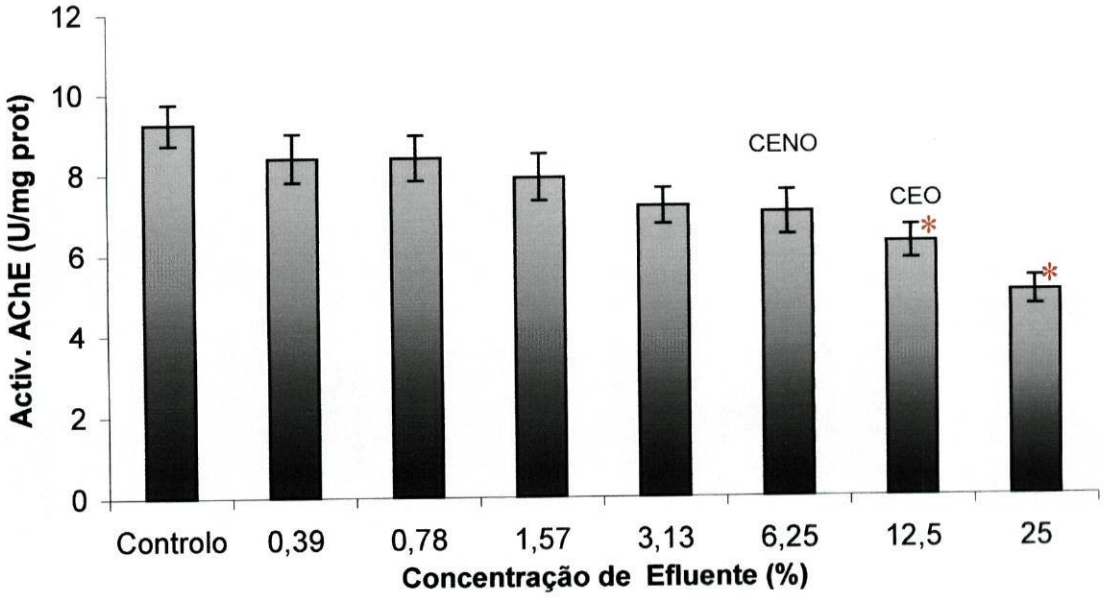


Figura 18 – Efeito da matriz simuladora na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vivo*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

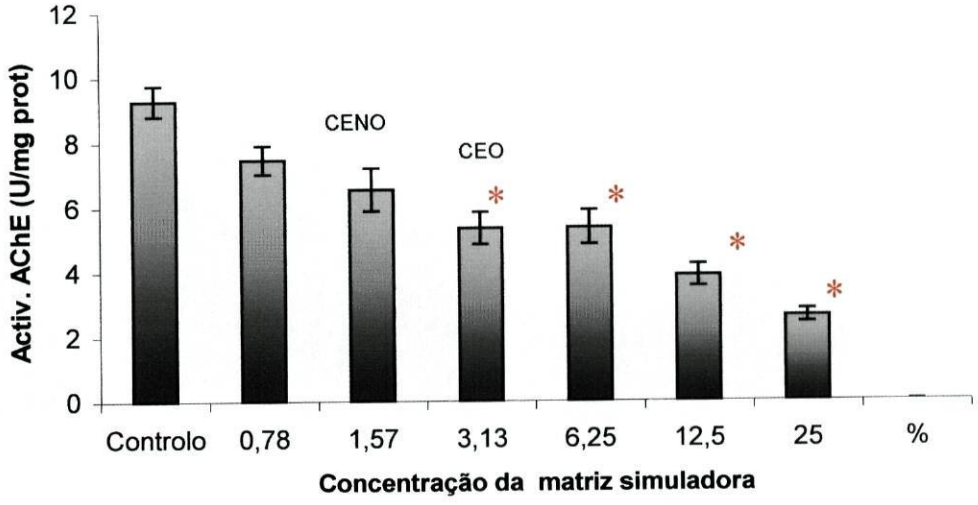


Figura 19 – Efeito do cloreto de níquel na actividade na actividade de acetilcolinesterase da *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vivo.* Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

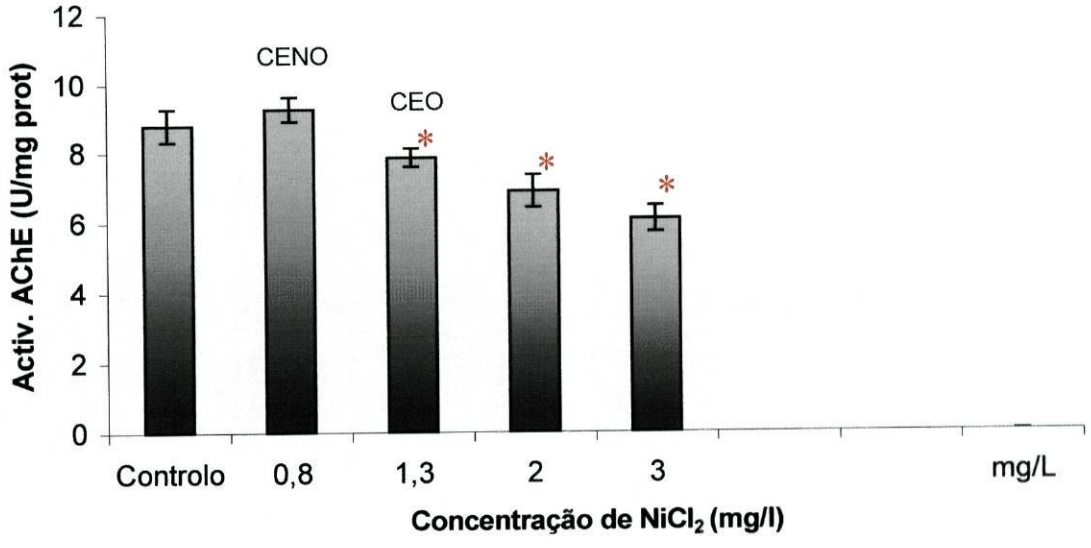


Figura 20 – Efeito do nitrato de níquel na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vivo.* Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

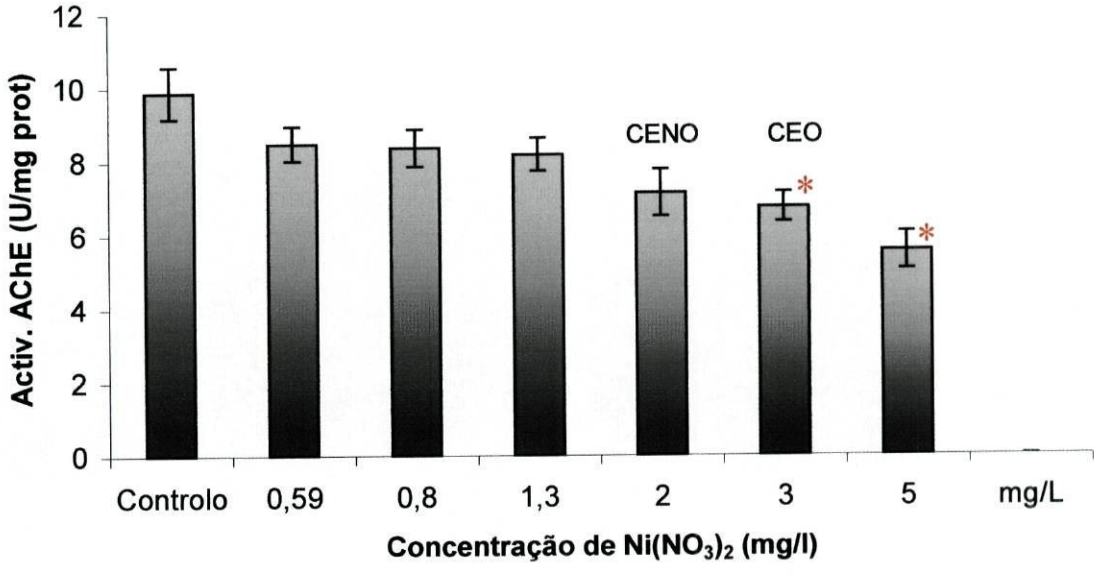


Figura 21 – Efeito do sulfureto de níquel na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vivo*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.

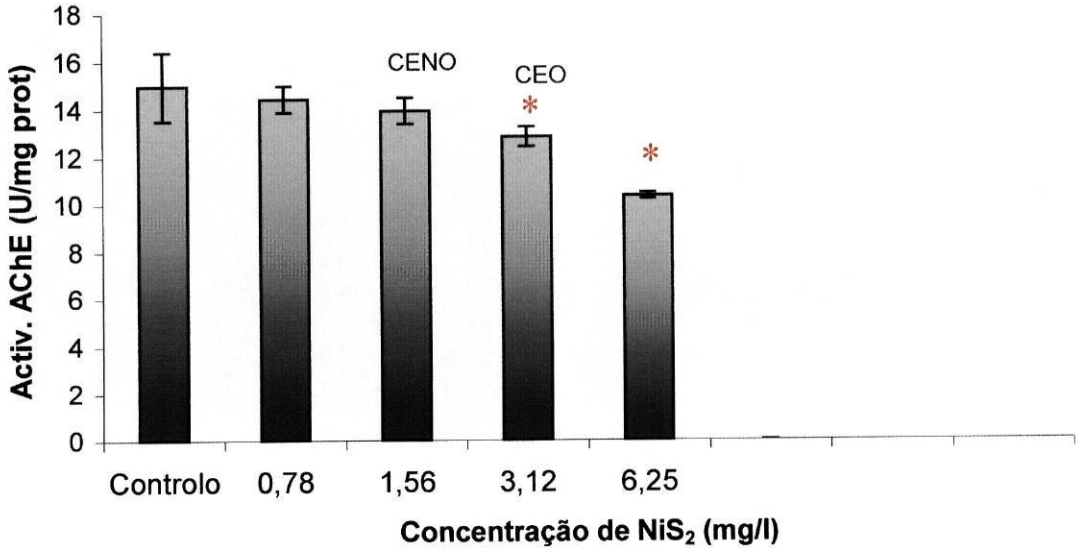
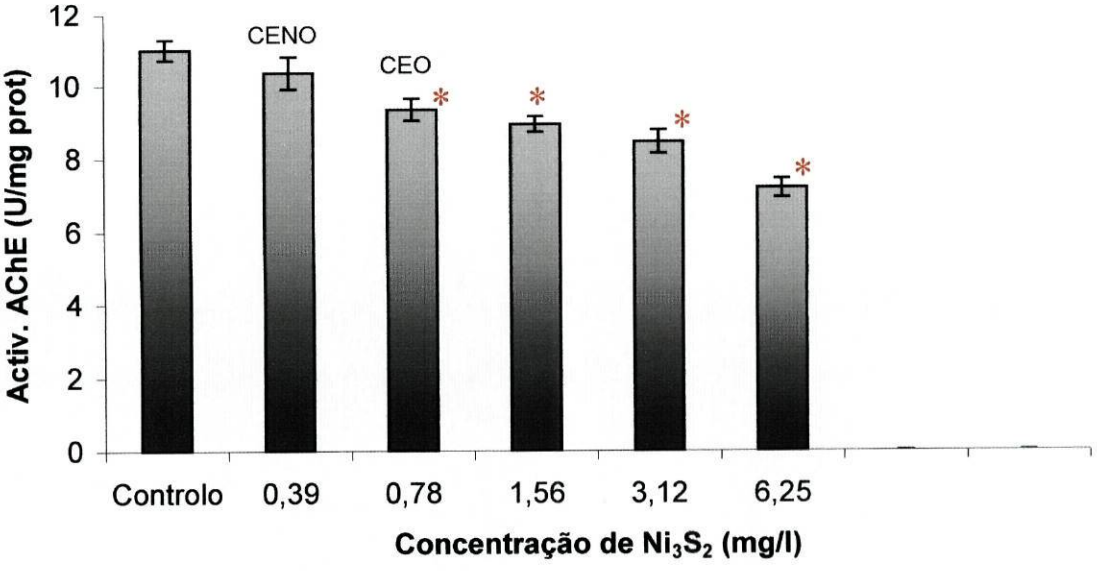


Figura 22 – Efeito do sub-sulfureto de níquel na actividade da acetilcolinesterase de *Daphnia magna* após realização do ensaio *in vivo*. Os valores apresentados são a média de 3 amostras com os respectivos erros padrão. (*) diferenças estatisticamente significativas.



3.5. Comparação da toxicidade entre as várias substâncias utilizadas, baseadas nos testes agudos convencionais, ensaios de inibição da actividade da AChE *in vivo* e *in vitro*.

Neste estudo comparou-se a toxicidade, expressa em inibição da AChE, dos vários sais de níquel, do efluente e da matriz simuladora relativamente aos ensaios efectuados. A toxicidade do efluente foi similar nos testes agudos convencionais (0,1238 µg/L Ni^{2+}) e nos ensaios de inibição da AChE *in vivo* (0,5350 µg/L Ni^{2+}), sendo consideravelmente inferior nos testes *in vitro* (10,0821 µg/L Ni^{2+}) (Tabela 35). A matriz simuladora teve um comportamento semelhante, assim como os restantes compostos testados. O cloreto de níquel, o sulfureto de níquel e o sub-sulfureto de níquel não inibiram a enzima AChE *in vitro*, pelo que não foi possível determinar os valores de CI_{50} para estas substâncias.

Tabela 35 – Valores de CL_{50}s calculados a partir dos resultados obtidos nos testes agudos convencionais, valores de CE_{50}s calculados para os ensaios de inibição da actividade da AChE *in vivo* e valores de CI_{50}s calculados para os ensaios de inibição da actividade da AChE *in vitro*. Os intervalos de confiança a 95% estão indicados entre parênteses.

Substância testada (em relação ao elemento Ni^{2+})	Testes agudos convencionais CL_{50} – 48h	Testes de inibição da AChE *in vivo* CE_{50}	Testes de inibição da AChE *in vitro* CI_{50}
Efluente (µg/L)	0,123 (0,1224-0,1253)	0,535 (0,031-9,189)	10,082 (3,5024-29,0222)
Matriz simuladora (µg/L)	0,550 (0,5432-0,5582)	1,333 (0,709-2,503)	6,844 (3,487-13,448)
Cloreto de níquel (mg/L)	2,74 (2,73-2,74)	8,887 (3,799-20,787)	Não houve diferenças significativas relativamente aos controlos
Nitrato de níquel (mg/L)	4,96 (4,92-4,99)	6,543 (4,227-10,127)	254,258 (229,856-281,258)
Sulfureto de níquel (mg/L)	4,56 (4,47-4,66)	2,963 (2,917-3,009)	Não houve diferenças significativas relativamente aos controlos
Sub-sulfureto de níquel (mg/L)	3,92 (3,84-4,00)	6,903 (6,120-7,787)	Não houve diferenças significativas relativamente aos controlos

3.6. Teste de inibição das enzimas antioxidantes *in vivo*

Foram realizados ensaios *in vivo* com o efluente, com a matriz simuladora, com o cloreto de níquel, com o nitrato de níquel de níquel, com o sulfureto de níquel e com o sub-sulfureto de níquel, nas concentrações descritas no capítulo anterior (material e métodos), em que se determinou a actividade das enzimas catalase, glutationa S-transferase, glutationa redutase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase. A tabela 36 refere concentrações nominais do efluente, da matriz simuladora e sais de níquel usados neste estudo. Na tabela 37 são apresentados os resultados da actividade da catalase (μmol H_2O_2/ mg proteína/ min) determinada nas amostras controlo (24 determinações) e no efluente, matriz simuladora e sais de níquel. Para as amostras controlo a actividade média da catalase foi de 63,76±8,92 μmol H_2O_2/ mg proteína/ min. Os valores são apresentados sob a forma de média ± desvio padrão. Para o efluente, matriz simuladora e sais de níquel os resultados correspondem à média de duas determinações. Como o n foi igual a dois não foram feitas comparações estatísticas.

Tabela 36 - Concentrações nominais das soluções teste utilizadas nos ensaios *in vivo* de avaliação da actividade da catalase relativamente ao efluente, à matriz simuladora, ao cloreto de níquel, ao nitrato de níquel de níquel, ao sulfureto de níquel e ao sub-sulfureto de níquel.

Substância testada	Concentrações nominais
Efluente (%)	0,39; 0,78; 1,57; 3,13; 6,25; 12,5
Matriz simuladora (%)	0,78; 1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25
Cloreto de níquel (mg/L) *	0,59; 0,8; 1,3; 2,0; 3,0
Nitrato de níquel (mg/L) *	0,59; 0,8; 1,3; 2,0; 3,0; 5,0
Sulfureto de níquel (mg/L) *	0,78; 1,56; 3,12; 6,25
Sub-sulfureto de níquel (mg/L) *	0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25

* em relação ao elemento Ni^{2+} em mg/L

Tabela 37 – Efeito do efluente, da matriz simuladora, do cloreto de níquel, do nitrato de níquel de níquel, do sulfureto de níquel e do sub-sulfureto de níquel usadas em diferentes concentrações na actividade da catalase (μmol H_2O_2/ mg proteína/ min), quando efectuado ensaio *in vivo* (48 horas de exposição).

Substância testada	Controlo	0,39	0,78	1,57	3,13	6,25
Efluente (μg/L Ni^{2+})	52,15	62,79	41,93	32,57	15,11	20,86

Substância testada	Controlo	0,78	1,57	3,125	6,25	12,5	25
Matriz simuladora (μg/L Ni^{2+})	63,43	32,35	18,30	5,74	9,57	11,06	4,89

Substância testada	Controlo	0,59	0,8	1,3
Cloreto de níquel (mg/L Ni^{2+})	88,54,35	80,258	70,37	59,89

Substância testada	Controlo	0,5	0,8	1,3	2,0
Nitrato de níquel (mg/L Ni^{2+})	60,66	33,49	27,24	14,27	14,58

Substância testada	Controlo	0,39	0,78	1,56	3,13
Sulfureto de níquel (mg/L Ni^{2+})	35,56	32,04	45,978	60,42	84,82

Substância testada	Controlo	0,78	1,56	3,13	6,25
Sub-sulfureto de níquel (mg/L Ni^{2+})	15,11	15,33	19,16	38,74	44,91

Relativamente às enzimas glutationa redutase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase não foram encontrados níveis quantificáveis nos homogeneizados de *Daphnia magna*. Quanto à avaliação da actividade enzimática da glutationa S-transferase foram apenas efectuados ensaios preliminares, tendo sido detectada actividade enzimática. Não foi possível prosseguir com os trabalhos devido a uma contaminação generalizada por fungos, o que levou a destruirem por completo todo o clone que existia no laboratório. Apesar de se terem realizado esforços no sentido de se conseguir mais dáfnias do mesmo clone a nível mundial, tal não foi possível, o que obrigou à paragem definitiva dos trabalhos experimentais que estavam a decorrer.

CAPÍTULO IV

Discussão

4. Discussão

4.1. Neste estudo procurou avaliar-se a toxicidade exercida por um efluente industrial de componentes de automóveis para o crustáceo cladócero *Daphnia magna*. Paralelamente, foi determinada a toxicidade de uma matriz simuladora, contendo as mesmas proporções de alguns metais encontrados no efluente, e de quatro sais de níquel (cloreto, nitrato, sulfureto e sub-sulfureto).

Tendo em vista um enquadramento de avaliação da toxicidade em termos ambientais, foram determinadas as concentrações de níquel, crómio total, cobre, chumbo e alumínio do efluente e em várias amostras recolhidas antes e depois de o mesmo ter passado por uma estação de tratamento de águas residuais. Os resultados obtidos foram comparados com os valores permitidos pela legislação para descargas de efluente no meio receptor; neste caso, um ribeiro sito em Oliveira de Azeméis.

4.2. Nas várias amostras do efluente verificou-se que o alumínio é o metal que se encontra em maior percentagem, seguido do cobre, chumbo, crómio total, níquel e por último o cádmio.

A EPTARI considerada é uma estação de tratamento direccionada para a remoção dos óleos e de matéria orgânica. Assim, comparando os valores à entrada e à saída da mesma, pode observar-se, pelos valores encontrados nas várias amostragens, que a EPTARI não alterou de uma maneira uniforme a concentração dos vários metais.

A comparação dos valores dos vários metais, à saída da EPTARI, com os valores máximos admissíveis para descarga de águas residuais no meio hídrico mostra que estes apresentam níveis bastante inferiores.

Como os valores se encontram dentro dos permitidos pela legislação, podíamos supor que não se verificaria qualquer tipo de alteração no meio ambiente, o que não parece corresponder à realidade.

Para o estudo desta situação, efectuaram-se ensaios de toxicidade aguda convencional e ensaios de avaliação da actividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro* e *in vivo* para o crustáceo cladócero *Daphnia magna*. Procedeu-se igualmente à determinação da actividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase por ensaios *in vivo*.

Na verdade, os metais pesados são contaminantes ambientais amplamente distribuídos, que aparecem com frequência como resultado da sua libertação durante os processos de extracção e transformação industrial (Peakall, 1994) e que podem prejudicar directamente os organismos, aumentando as suas taxas de mortalidade ou interferindo com os processos de aquisição de recursos e consumo de alimentos. Estes efeitos podem traduzir-se num declínio da população ou num crescimento populacional mais lento. Alternativamente, os organismos podem evitar ou restringir os efeitos nocivos usando mecanismos de desintoxicação ou de adaptação: mais uma vez os efeitos das substâncias com carácter tóxico nas populações estão relacionados, directa ou indirectamente, com os seus efeitos nos indivíduos e com a proporção em que estas substâncias se encontram (Moriarty, 1993; Walker *et al.*, 2001).

No entanto, há outros estudos que avaliam a actividade biológica dos iões de metais e os seus efeitos no ambiente (Lilius *et al.*, 1995; Guilhermino *et al.*, 1998a). Adicionalmente, há que considerar por isso a interacção dos iões dos metais nos sistemas biológicos, já que esta pode resultar em efeitos sinergéticos, antagonistas ou de outro tipo.

Na água, por outro lado, os metais não se encontram na forma pura, mas sim na forma de sais. Neste sentido, procurou investigar-se qual o efeito na mortalidade do organismo *Daphnia magna* relativamente ao cloreto de níquel, nitrato de níquel, sulfureto de níquel, sub-sulfureto de níquel, ao efluente e à matriz simuladora.

O níquel foi escolhido pelo facto de este metal ser considerado como poluente ambiental (Biesinger, 1972; Fargasová, 1997) e também por ser um dos metais mais tóxicos da tabela periódica (Barceloux 1999; Rudolfs *et al.*, 2000). É conhecido que a resistência dos organismos aos metais tóxicos depende do metal, da sua valência, da sua concentração, bem como de razões inerentes ao próprio organismo e suas condições fisiológicas (Merian, 1984; Lee *et al.*, 1993; Schubauer *et al.*, 1993).

4.3. Os estudos efectuados com o cladócero *Daphnia magna* mostraram a sensibilidade deste a concentrações extremamente baixas de efluente, e também à matriz simuladora.

Deve ser dada uma especial atenção ao facto de a matriz simuladora ser menos tóxica do que o efluente e, por sua vez, os compostos puros de níquel isolados serem os menos tóxicos, tal como já tinha sido descrito anteriormente (Wren *et al.*, 1991). Isto demonstra a importância do estudo das misturas de substâncias presentes nas soluções, em paralelo com ensaios efectuados

isoladamente com substâncias puras, já referido por outros autores (Viarengo, 1985; Biesinger *et al.*, 1986).

4.3.1. Relativamente aos compostos de níquel, aquele que demonstrou ser mais tóxico nos testes agudos, foi o cloreto de níquel, seguido do sub-sulfureto de níquel, sendo o menos tóxico o nitrato de níquel.

Comparando os valores de CL_{50} obtidos neste estudo com os referidos na literatura verificou-se que o valor de CL_{50} obtido no teste agudo convencional com o cloreto de níquel ($NiCL_2.6H_2O$) foi de 3,78mgNi/L(3,73-3,83), às 24h, e de 2,74 mgNi/L (2,73-2,74), às 48h.

Khangarot e colaboradores, em 1989, obtiveram valores de 10,90mgNi/L (8,20-13,20), às 24h, e de 7,29 mg Ni/L (6,05-9,26), às 48h.

O pH durante o teste foi controlado de uma forma criteriosa, pois como se sabe a toxicidade do níquel aumenta com a subida de pH (Schubauer *et al.*, 1993). Para valores de pH mais baixos, o níquel é menos tóxico a nível das membranas celulares, pois pensa-se existir adsorção superficial do metal (Krantzberg, 1988; Khangarot *et al.*, 1989).

Este efeito do pH na toxicidade dos metais é muito importante, pois os efluentes, muitas vezes, são descarregados a níveis de pH muito diferentes do pH das águas receptoras. Será de grande interesse ecológico, em estudos futuros, avaliar-se não só a toxicidade dos efluentes, mas também a toxicidade dos metais no local de descarga nas águas receptoras (Andren *et al.*, 1998).

4.3.2. Os ensaios *in vivo* realizados demostraram que todas as substâncias testadas apresentam toxicidade a níveis sub-letais, sendo o efluente aquele que se evidenciou como o de maior toxicidade, seguido da matriz simuladora. Mais uma vez as substâncias puras foram as que demonstraram menor toxicidade para com o organismo de ensaio. Referem-se por ordem decrescente de toxicidade: sulfureto de níquel, nitrato de níquel, sub-sulfureto de níquel, e cloreto de níquel.

Os estudos efectuados nos últimos anos sugerem que o teste de toxicidade aguda com invertebrados deve ser aplicado aos mamíferos como primeiro método de rastreio para a avaliação da toxicidade letal de novos químicos (Calleja *et al.*, 1992).

Uma vez que estes métodos requerem ensaios *in vivo*, a biotransformação dos químicos é tida em conta, e como tal, parece ser preferível à utilização dos ensaios *in vitro* (Guilhermino *et al.*, 1994; Ekwall *et al.*, 1998).

Numa primeira avaliação, a grande dificuldade em usar os testes de toxicidade aguda em invertebrados prende-se com o diferente nível de organização biológica relativamente aos mamíferos (Guilhermino *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* indicam que os metais sob a forma de compostos puros inibem a actividade da enzima AChE com valores na ordem dos mg/L, compreendidos entre 2,96 e 8,89 mg/l do ião níquel.

O efluente e a matriz simuladora inibem a actividade da enzima AChE, nos ensaios *in vivo,* com valores da ordem das µg/L relativamente ao ião níquel, compreendidos entre 0,54 e 1,33 µg/L, respectivamente.

Estas concentrações são ecologicamente relevantes podendo ocorrer em efluentes industriais com uma certa frequência e mesmo em pontos dos sistemas de água que os recebem.

Tendo em conta que o efluente é de origem industrial e conhecendo-se a sua composição relativamente a alguns metais (níquel, 2,80 µg/L; crómio total, 16,23 µg/L; cobre 15,2 µg/L; chumbo 15,29 µg/L; cádmio 1,40 µg/L e alumínio 1.49 µg/mL), pode eventualmente atribuir-se a sua elevada toxicidade à mistura dos vários metais que o constituem, mesmo em concentrações da ordem dos microgramas. Como o efluente provocou uma inibição maior na actividade da enzima AChE relativamente à matriz simuladora, pode equacionar-se a existência de um possível efeito aditivo ou sinérgico da mistura dos metais presentes no efluente, ou de outros factores existentes no meio natural.

4.3.3. A actividade da AChE foi determinada por ensaios *in vitro* e *in vivo*, usando várias diluições do efluente, da matriz simuladora e várias concentrações do cloreto de níquel, nitrato de níquel, sulfureto de níquel, e do sub-sulfureto de níquel.

Relativamente aos ensaios *in vitro,* que avaliam a concentração que provoca a inibição em 50% da população alvo, verificou-se que a matriz simuladora se revelou mais tóxica que o efluente.

Quanto às substâncias puras, apenas o nitrato de níquel apresentou diferenças significativas relativamente à actividade da enzima AChE quando comparada com o controlo.

É curioso notar que nestes ensaios *in vitro,* em que não é contemplado o factor ambiente, a mistura se revelou potencialmente mais tóxica que o efluente. Como já

referido anteriormente, em termos ambientais, é necessário ter em conta todos os fenómenos de acumulação e biomagnificação dos tóxicos através dos níveis tróficos, bem como o mecanismo de toxicidade de certos poluentes em que poderá actuar apenas no organismo intacto.

4.4. Fez-se a determinação da actividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase. Relativamente à glutationa peroxidase, glutationa redutase e superóxido dismutase não foram encontrados níveis quantificáveis nos homogeneizados de *Daphnia magna*.

No que respeita à catalase e glutationa S-transferase foi possível quantificar estas enzimas, mas os ensaios de inibição não se revelaram conclusivos.

4.5. A análise geral dos resultados obtidos no âmbito da investigação sugere que a enzima AChE é um biomarcador muito útil e pode ser utilizada na quantificação dos efeitos provocados pela exposição a metais, tal como já havia sido demonstrado (Guilhermino *et al.*, 1998a).

Uma redução significativa na actividade da AChE nos crustáceos cladóceros, nomeadamente *Daphnia magna,* após exposição a metais pode fornecer um aviso prévio relativamente aos efeitos adversos mais graves que podem ocorrer mais tarde ao nível da população ou comunidade.

Verificou-se que a toxicidade do efluente, da matriz simuladora e dos sais de níquel, é superior nos ensaios *in vivo* e nos testes agudos convencionais quando comparada com os ensaios *in vitro*. De um modo geral, foi no teste agudo convencional de 48 horas com *Daphnia magna* que se obtiveram valores de concentração mais baixos. Contudo, como este teste só se baseia num único critério, a morte ou a imobilização, ele é pouco informativo e pode levar a falsas conclusões, uma vez que os efeitos sub-letais não são avaliados (Sperling, 1976).

Relativamente aos ensaios *in vitro,* estes apresentam o inconveniente de não considerarem os efeitos integrados que ocorrem no organismo como um todo (Gad, 1993), sendo por esse motivo de uso limitado. Porém, são extremamente úteis como testes de rastreio e para o estudo de efeitos específicos.

Os ensaios *in vivo* revelaram-se os mais sensíveis, uma vez que foram detectados efeitos a concentrações mais baixas do que os restantes.

Comparativamente ao teste agudo convencional, os ensaios *in vivo* apresentam uma especificidade maior, pois sendo baseados num efeito específico, indicam a presença ou ausência de uma substância particularmente tóxica, possibilitam o uso de dois parâmetros indicativos de toxicidade, um específico (inibição da enzima) e um não específico (imobilização ou morte), uma vez que é possível contar os juvenis imobilizados ou mortos antes de preparar os homogeneizados.

De referir que o cloreto de níquel, o sulfureto de níquel e o subsulfureto de níquel não apresentaram efeitos *in vitro* significativos na actividade da AChE. Estes resultados indicam a grande importância que tem a parte fisiológica do organismo, em termos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos tóxicos, que pode funcionar como mecanismo de desintoxicação ou intoxicação (Slabbert, 1999).

Como biomarcador individual, a medição do conteúdo total de proteína do organismo tem pouca utilidade, porque a proteína é a última fonte de energia a ser utilizada nos organismos sujeitos a efeitos tóxicos e, portanto, não é um biomarcador muito sensível. Antes da mobilização das proteínas ocorre, normalmente, a mobilização e utilização do conteúdo lipídico. No entanto, o conteúdo de proteína é fácil de medir e é frequentemente utilizado para calcular outros parâmetros, pelo que deve ser usado numa "bateria de biomarcadores" (Mayer *et al.,* 1992). Neste estudo, não se verificou uma diminuição significativa no conteúdo de proteína nos vários ensaios realizados.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o crustáceo cladócero *Daphnia magna* é uma espécie adequada para ser utilizada em testes de ecotoxicidade e que a actividade da enzima acetilcolinesterase pode ser usada como critério de avaliação de toxicidade.

Em estudos futuros, pretende avaliar-se os efeitos de outras substâncias potencialmente tóxicas para o ambiente, com base em parâmetros bioquímicos, nomeadamente utilizando o grupo das enzimas anti-oxidantes presentes no cladócero

Daphnia magna, de forma a prever quais os efeitos que as misturas de compostos podem exercer na qualidade aquática.

CAPÍTULO V

Referências bibliográficas

Aar, E.V.D., Commandeur, Vermeuln, N. (1998). Strategies to characterize the mechanisms of action and the active sites of glutathione S-transferases: a review. *Drug Metabolism Review,* **30**(3), 569-643.

Adema, D. (1978). *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hidrobiologia.* **59**,125-134.

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro. In Oxygen Radicals in Biological Systems: Methods in Enzymology.* Ed. PPacker, LNew York: Academic press. 121-126.

Allen, Y Calow, P., Baird, D.J. (1995). A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna. Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 1625-1630.

Aller, A.R., Costa, M., Oberdorster, G. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol.* **143**, 152-166.

Anderson, B.G. (1932). The number of pre-adult instars, growth, relative growth and variation in *Daphnia magna. Biological Boletin.* **63**, 81-98.

Anderson, B.G. (1980). Aquatic invertrebates in tolerance investigations from Aristotle to Naumann. In: *Aquatic Invertrebates Bioassays. ASTM (Eds.),* 3-35.

Andren, C., Eklund, B., Gravenfors, E., Kukulska, Z., Tarkpea, M. (1998). A multivariate biological and chemical characterization of industrial effluents connected to municipal sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. And Chemis.* **17**, 228-233.

APHA (1996). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*19ºed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington.*

ASTM (1980). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macro invertebrates and amphibians. *Report* **E**-790-80. *American Society for Testing and Materials. Philadelphia.*

Babich, H., Stotzky, G. (1982a). Nickel toxicity to microbies: effect of pH and implications for acid rain. *Environ. Res.* **29**, 335-350.

Babich, H., Stotzky, G. (1982b). Nickel toxicity to fungi: influence of some environmental factors. *Ecotoxicol Environ Saf.* **6**, 577-589.

Baird, D., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. & Soares, A. (1989). The *Daphnia magna* bioassay: a critique. *Hydrobiology* **188/189**, 403-406.

Baird, D., Barber, I., Calow, P. & Soares, A.(1990). An early life-stage test with *Daphnia magna Straus*: an alternative to the 21-day cronic test? *Funct. Ecol.* **4**, 399-407.

Baird, D., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. & Soares, A. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna Straus. Ecotoxicol. Environ.* Safety **21**, 257-265.

Ballantyne, B., Marrs, T.C., Turner, P. (1993). Fundamentals of Toxicology. *In*: Ballantyne, B.,Marrs, T.C., Turner, P. *(Eds.), General & Applied Toxicology, Macmillan Press, New York.* **1,** 3-38.

Banta, A.M. (1939). Some studies on the physiology, genetics and evaluation of some Cladocera. *Pap. Dep. Genet. Carnegie Inst. Washington.***39**.

Barata, C., Baird, D., Markich, S. (1998). Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of Daphnia magna Strauss to essential and non-essential metals. *Aquatic Toxicology.***42**, 115-137.

Barceloux, D.G. (1999). Nickel. *Clinical Toxicology.* **37**(2), 239-258.

Baudo, R. (1987). Ecotoxicological testing with *Daphnia.* In: Peters, R.H.; Bernardi, R. de (Eds.), *Daphnia. Mem.Inst.Ital.Idrobiol.Dott.Marco de Marchi.* **45**, 461-482.

Bernardi, R., Peters, R.H. (1987). Way Daphnia? In: In: Peters, R.H.; Bernardi, R. de (Eds.), *Daphnia. Mem.Inst.Ital.Idrobiol.Dott.Marco de Marchi.* **45**, 1-501.

Biesinger, K., Christensen, G., Fiandt, J. (1972). Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna. J.Fish. Res. Bd. Canada.* **29**, 1691-1700.

Biesinger, K., Christensen, G. & Fiandt, J. (1986). Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction. *Ecotoxicol. Environ.* Safety. **11**, 9-14.

Bodar, C., Zee, A., Voogt, P., Wynne, H. & Zandee, D.(1988). Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna. Aquat. Toxicol.* **12,** 301-310.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Bradley. M.C., Naylor, C., Calow, P. Baird, D., Barber, I. Soares, A.M.V.M. (1993). Reducing variability in Daphnia toxicity tests – a case for further standardization. *Lewis Publishers, Boca Raton.* 57-70.

Brien, P., Salacinski, H.J. (1996). Evidence for the relationship between the generation of reactive intermediates and the physicochemical characteristics of nickel oxides. Arch. Toxicol. **70,** 787-800.

Buege, J.A., Aust, S.D. (1978). Microssomal lipidic peroxidation. *In methods in enzymology.* 302-310.

Buikema, A.L.Jr, Niedelehner, B.R.and Cairns, J.Jr., (1998). Biological monitoring. Part-IV – Toxicity testing. *Water Research.***16**, 239-262.

Cairnes, J.Pratt, J.R. (1989) The scientific basis of bioassays. In: Environmental Techniques and their Application. *Kluwer Academic Publishers, London.*

Cairnes, J. (1998). Should regulatory criteria and standards be based on multispecies evidence? *Environm. Professional.* **10**, 157-165.

Calleja, M.C., Personne, G. (1992). Cyst-based toxicity tests. IV. The potencial of ecotoxicological tests for the predicyion of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC program. *ATLA.* **20**, 396-405.

Calow, P., Silby, R.M. (1990) A physiological basis of pollution processes: Ecotoxicological implications. Funct. Ecol. **4**, 283-288.

Calow, P. (1993). General principles and overview. In: Handbook of Ecotoxicology. *Calow Eds (Blackwell Scientific, Oxford)*, **1**, 1-7.

Carlberg, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* **113**, 484-490.

Carvalho, F., Guilhermino, L., Ribeiro, R., Gonçalves, F. & Soares, A. (1995). METIER (Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance). II Ecotoxicity of Poorly water-soluble Compounds: Concentration versus dose. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**, 431-434.

CEE (1992). Directive 92/32/EEC. Seventh amendment of Directive 67/548/EEC Annex V. Part C: Methods for the determination of ecotoxicity. C2. Acute toxicity for Daphnia. *J.O.* **L154**, 1-29.

Chapman, P.F., Crane, M., Wiles, J,A,, Noppert, F., Mcindoe, E.C. (1996). Asking the right questions: Ecotoxicology and Statistics. *Soc. Environ. Toxicol.Chem.*

Clement, G.F., Cigna, R., Santoroni, G.P. (1980). Nickel in foods and dietary intake of nickel. In: Nriagu, *J.O. ed.*. 493-498.

Codina, J., Pérez-Torrente, C., Pérez-García, A., Cazorla, F., Vicente, A. (1995). Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**, 260-265.

Coker, E.G., Mathews, P.J. (1993). Metals in sewage sludge and their potential effects in agriculture. *Water Sci Technol.* **15**, 209-217.

Comporti, M. (1998). Lipid peroxidation as a mediator of chemical-induced hepatocyte death. In *Toxicology of the liver. Ed. Plaa. G.L.&Hewitt*, W.R. 221.

Connel, D.W., Miller, G.J. (1984). The Chemistry and Ecotoxicology of Pollution. *John Wiley & Sons, NewYork.*

Cowgill, U.M. (1976). The chemical composition of two species of *Daphnia*, their algal food and their environment. *Sci. Total Environ.* **6**, 79-102.

Cox, J.E., Doll, R., Scott, W.A., Smith, S. (1991). Mortality of nickel workers: experience of men working with metallic nickel. *Br.J.ind.Med.* **38** (3), 235-239.

Cox, E.J., Naylor, C. ; Calow, P.(1992). Frozen algae as food for *Daphnia magna Straus* in toxicity testing. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **24**, 58-62.

Crossmann, G. (1988). The cycle in the system soil-plant-aniaml on locations with extremely high soil contaminatios by cadmium and nickel caused by sewage-sludge. Berlin, Federal *Agency of Environmental Protection*, 95.

Dabeka, R.W., McKenzie, A.D. (1995). Survey of lead, cadmium, fluoride, nickel, and cobalt in food composites and estimation of dietary intakes of these elements by Canadians in 1986-1988. *J AOAC Int.* **78**, 897-909.

Dallinger, R., Kautzky, H. (1985). The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (Salmo gairdneri): A field Study. *Oecologia.* **67**(1), 82-89.

Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto, que regulamenta os valores máximos admissíveis para descarga de águas residuais no meio hídrico.

DeLeve, L., Kaplowitz, N. (1991). Glutathione metabolism and its role in epatotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics.* **52**, 287-305.

Depledge, M. H. (1990). New approaches in ecotoxicology: can inter-individual physiological variability be used as a tool to investigate pollution effects? *Ambio.* **19**, 251-252.

Depledge, M. H., Weeks, J.M., Bjerregaard, P. (1993). Heavy metals. In: Calow, P. (Ed.), Handbook of Ecotoxicology. Blackell Scientific Publications, London.

Diamantino, T., Ribeiro, R., Gonçalves, F. & Soares, A.(1998), METIER (Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance) for difficult substances. 4. Testchamber for cladocerans in flow- through conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 433-439.

Doll, R., Mathews, J.D., Morgan, L.G. (1977). Cancer of the lung and nasal sinuses in nickel workers: a reassessement of the period of the risk. *Br J Ind Med.***34,** 102-105.

Dunnick, J.K., Elwell, Mr, Radovsky, A.E., et al. (1995). Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposure in the lung. *Cancer Res.* **55**, 5251-5256.

Duvigneaud, P. (1980). La Synthèse Écologique. *Instituto Piaget* **22**, (1) 3-24.

Editorial (1989). How Lethal are sublethal effects? *Environm. Toxicology and Chemistry,* **8**, 463-464.

Ekwall, B., Barile., F.A. Castano, A., Clemedson, C., Clothier, R.H., Dierícks, P. (1998). MEIC evaluation of acute systemic toxicity. PartVI. The prediction of human toxicity by rtedent LD_{50} values and results from 61 in virto methods. *Altern. Lab. Anim.* **26**, 617-658.

Elendt, B.P., Bias, W.R. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimisation of culture conditions on life history parameters of Daphnia magna. *Wat. Res.* **24**, 1157-1167.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.

Enserink, L., Haye, M., Maas, H.(1990). Reproductive strategy of *Daphnia magna:* implications for chronic toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* **17**, 15-26.

Environmental Protection Agency (1990). Project Summary Health Assessment Document for Nickel. Washington, DC: Office of Health and Environmental Assessment, EPA/600/S8-83/012.

Environmental Protection Agency (1991). Short-term methods for the estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. *Environ. Protection Agency*, EPA/600/4/00.

Erickson, W., McDonald, L. (1995). Tests for bioequivalence of control media and test media in studies of toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **14,** 1247-1256.

Eto, M. (1974). Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry. CRS Press, Othio.

Fargasova, A. (1997). Sensitivity of *Chironomus plumosus* Larvae to V^{5+}, Mo^{6+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, $Cu2^{+}$, and Cu^{+} Metal Ions and their combinations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **59**, 956-962.

Fernandez-Casalderry, A., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E. (1995). Chronic toxicity of methylparathion to Daphnia magna: Effects on survival, reproduction, and growth. *Bull. Enviton. Contam. Toxicol.* **54**, 43-49.

Festing, M. F. W. (1994). Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab. Anim.* **28**, 212-221.

Finney, D.J. (1971). *Probit analysis*. 3rd ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

Fishbein, L. (1979) – "Potential Industrial Mutages". Amsterdam: *Elsevier Publications.*

Fisher, N.S. (1996). On the reactivity of metals for marine phytoplankton. *Limnol.Oceanogr.* **31**(2), 443-449.

Flohé, L., Gunzler, W.A. (1984a). Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* **105**, 114-121.

Flohé, L., Otting, F. (1984b). Superoxide dismutase assays. *Meth. Enzymol.* **105,** 93-104.

Florence, T.M., Stauber, J.L., Ahsanullah, M. (1994). Toxicity of nickel ores to marine organisms. *Scienc. Total Environ.* 148, 139-155.

Forbes, V.E. and Forbes, T.L. (1994). *Ecotoxicology in theory and practice. Chapman and Hall Eds.*

Fossi, M.C.; Leonzio, C., Massi, A., Lari, L., Casini, S. (1994). Serum esterase inhibition in birds : a nondestructive biomarker to assess organophosphorus and carbanmate contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 99-104.

Fossi, M.C. ; Sanchez-Hernandez, J.C., Diaz-Diaz, R., Lari, Garcia-Hernandez, J.E., Gaggi, C. (1997). The lizard Galootia galloti as a bioindicator of organophosphorous contamination in the Canary islands. *Environ. Pollut.* **87**, 289-294.

Fredericks, W.M., Bosch,K.S. (1997). Localization of superoxide dismutase activity in rat tissues. *Free Radical Biology & Medicine.* **22**, 241-248.

Gad, S.C. (1993). Alternatives to *in vivo* studies in Toxicology. In: Ballantyne, B., Marrs, T., Turner, P. (eds.). *General & Aplplied Toxicology. Macmillan Press, New York.* **1**, 179-206.

Genoni, G.P. (1997). Influence of the Energy Relationships of Organic Compounds on Toxicity to the Cladoceran *Daphnia magna* and the fish *Pimephales promelas*. *Ecotox.* and *Environ. Safety.* **36**, 27-37.

Gerhardsson, Skerfving, S. (1996). Concepts on biological markers and biomonitoring for metal toxicity. Lasló, M. and Suzuki, T. Eds. In: *Toxicilogy of metals. Lewis Publishers, Chelsea.* 81-106.

Glazier, D.S. (1992). Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna. Ecology.* **73**, 910-926.

Grandjean, P., Andersen, O., Nielsen, G.D. (1988). Carcinogenecity of occupational nickel exposure: an evaluation of the epidemiological evidence. *Am J Ind Med.* **13**, 193-209.

Grothe, D., Kimerle, R. (1984). Inter- and intralaboratory variability in *Daphnia magna* effluent toxicity tests result. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 190-192.

Guilhermino, L., Lopes, M., Donato,A.,Silveira, L., Carvalho, A. & Soares, A. (1994b). Sistemas *in vivo* e *in vitro* em estudos de ecotoxicologia. *Actas da 4ºConferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Lisboa, 6 a 8 de Abril.* **I** :H12-H18.

Guilhermino, L., Lopes, M., Donato, A., Silveira, L., Carvalho, A., Soares, A. (1994c). Comparative study between the toxicity of 3,4-dichloroaniline and sodium bromide with 21-days chronic test and using lactate dehydrogenase activity of *Daphnia magna Straus . Chemosfere.* **28,** 2021-2027.

Guilhermino, L., Ribeiro, R., Gonçalves, F. & Soares, A. (1996a). METIER (Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance) for difficult substances - III. Effects of medium renewal and use of a carrier on the bioavailability of parathion. *Environ. Pollut.* **92**, 97-99.

Guilhermino, L., Lopes, M., Carvalho, A., Soares, A. (1996b). Acetylcholinesterase activity in juveniles of *Daphnia magna Straus. B. Environ. Contam. Tox.* **57**, 979-985.

Guilhermino, L., Diamantino, T., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Soares, A. (1997). Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute metal toxicity to *Daphnia magna Straus. Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38**, 292-295.

Guilhermino, L. Lacerda, M., Diamantino, T., Soares, A.M.V.M. (1998a). Inibição não-específica da acetilcolinesterase ed *Daphnia magna* por diversos tipos de poluentes *Cuad.Invet.Biol. Bilbao.* **20**, 59-61.

Guilhermino, L. Barros, P. Silva, M.C., Soares, A.M.V.M. (1998b). Should the use of inhibition of cholinesterases as a especific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers.* **3**, 157-163.

Guilhermino, L., Soares, A., Carvalho, A., Lopes, M. (1998c). Correlation between whole blood cholinesterase activity and cerebral cortex cholinesterase activity in rats treated with parathion. *Chemosphere.* **37**, 1385-1393.

Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, C., Soares, A.M.V.M. (2000a). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of chemicals toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**, 357-362.

Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M. (2000b). *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Daphnia magna* acetylcolinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *The Science of the Total Environment* **247**, 137-141.

Guyton, A.C. (1992). *Tratado de Fisiologia Médica*. Guanabora Kooban, Rio de Janeiro.

Haber, L.T., Diamond, G.L., Zhao, Q., Erdreich, L., Dourson, M.L., (2000). Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. *Reg Toxicol Pharmacol.* **31**, 231-241.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutatione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249,** 7130-7139.

Hall, T.M. (1982). Free ionic nickel accumulation and localization in the freshwater zooplankton *Daphnia magna*. *Limnol Oceanogr.* **27**, 718-727.

Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in Human disease. *American Journal of Medicine.* **91,** 14s-22s.

Hansen, K., Stern, R.M. (1983). *In vitro* toxicity and transformation potency of nickel compounds. *Environ Health Perspect.* **51**, 223-226.

Hartenstein, R., Neuhauser, E.F., Narahara, A. (1981). Effects of heavy metal and other elemental additives to activated sludge on growth of *Eisenia foetida*. *J.Environ.Qual.* **10**(3), 372-377.

Hayes, K., Douglas, W. & Fisher, J. (1996). Inter- and intralaboratory testing of the *Daphnia magna* IQ toxicity test. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 660-666.

Hebert, P.D.N., Ward, R.D. (1978). The population biology of *Daphnia* (*Crustacea, Daphnidae*). *Biol. Rev.* **53**, 386-426.

Heinrichs, H., Mayer, R. (1980). Distribuition and cycling of nickel in forest ecosystems. In: Nriagu, *J.O. ed. Nickel in the environment, New York*, 431-455.

Henry, W.M. Barbour, R.L., Jakobsen, R.J., Schumaker, P.M. (1982). Inorganic compound identification of fly ash emissions from municipal incinerators. *Final report, Washington, DC, US Environmental Protection Agency, 32pp (EPA-600/3-82-095.PB83-146175).*

Herbert, A., Guilhermino, L., Da Silva de Assis, H.C., Hansen, P.D. (1995/1996). Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. *Zeitschrift f. Angewandt Zoologie.* **3**, 1-15.

Hobbs, R.J., Streit, B. (1986). Heavy metal concentrations in plants growing on a copper mine spoil heap in the Grand Canyon, Arizona. *Am Mid Nat.* **155**(2), 277-281.

Hoekstra, J. & Van Ewijk, P. (1993). Alternatives for the No-Observed-Effect Level. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 187-194.

Hoeven, N., Van Der (1991). LC_{50} estimates and their confidance intervals derived for tests with only on concentration with partial effect. *Wat. Res.* **25**, 401-408.

Hoff, R.M., Barrie, L.A. (1986). Air chemistry observations in the Canadian arctic. *Water Sci. Tech.* **18**, 97-107.

Holwerda, D. A., Opperhuizen, A. (1991). Physiological and biochemical approaches to the toxicological assessment of environmental pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**, 1-310.

Hopkin, S. P. (1990). Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Funct. Ecol.* **4**, 321-327.

Hopkin, S. P. (1993). Deficiency and excess of copper in terrestrial isopods. In: Ecotoxicology of metals in invertebrates. *Eds R. Dallinger & P. S. Rainbow*. Lewis Publishers, Chelsea, USA.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.Jr., Bergman, M.L., Dickson, K.L., Fava, J.A., McCarthy, J.F., Parrish, R., Dorn, P.B., McFarland, V., Lahvis, G., (1992). « Introduction » in Biomarkers-biochemical, physiological, and histological maskers of anthropogenic stress. *Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.Jr., Bergman, H.L., (Eds). Lewis Publishers, Chelsea,* 1-5.

Hughes, K, Meek, M.E., Newook, R., Chan, P.K.L. (1995). Speciation in health risk assessments of metals: evaluation of effects associated with forms present in the environment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **22**, 213-220.

Hutchinson, T.C. (1973). Comparative studies of the toxicity of heavy metals to phytoplankton and their synergistic interactions. *Water Pollut. Res. Can.* **8**, 68-90.

Hutchinson, T.C. ; Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism in floating aquatic weeds. *Verh Int Ver Limnol.* **19**, 2102-2111.

Hrudey, S.E. (1985). Residues from hazard waste treatment. Effluent Water Treat. **25**(1), 7-12.

International Programme on Chemical Safety. (1991). Environmental Health Criteria 108: Nickel. Geneva: World Health Organization.

Janssen, C. & Persoone, G. (1993). Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 711-717.

Jenkins, D.W. (1980a). Nickel accumulation in aquatic biota. In: Nriagu, *J.O.ed.Nickel in the environment, New York.* 283-337.

Jenkins, D.W. (1980b). Nickel accumulation in terrestrial wildlife. In: Nriagu, *J.O.ed.Nickel in the environment, New York.* 457-462.

Kaul, N., Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Slezak, J., Singal, P.K. (1993). Free radicals and heart. *J. Pharmacol Toxicol. Methods.* **30**, 55-67.

Khangarot, B. & Ray, P. (1987). Correlation between heavy metal acute toxicity values in fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 722-726.

Khangarot, B., Ray, P. & Chandra, H. (1987). *Daphnia magna* as a model to assess heavy metal toxicity: comparative assessment with mouse system. *Acta Hydrochem. Hydrobiol.* **15**, 427-432.

Khangarot, B., Ray, P. (1989). Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna Straus. Ecotoxicol. Environ. Saf.* **18**, 109-120.

Koivisto, S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environ. Pollut.* **90**, 263-267.

Kowalczyk, G.S., Gordon, G.E., Rheingrover, S.W. (1982). Identification of atmospheric particulate sources in Washington, DC, using chemical element balances. *Env. Sci. Techonol.* **16**, 79-89.

Kretzschmar, M., Klinger, W. (1990). The hepatic glutathione system – influences of xenobiotics. *Exp. Pathol.* **38**, 145-164.

Krishnan, E.R, Hellwig, G.V. (1982). Trace emissions from coal and oil combustion. *Environ. Prog.* **1**(4), 290-295.

Kszos, L., Stewart, A. & Taylor, P. (1991). An evaluation of nickel toxicity to *Ceriodaphnian dubia* and *Daphnia magna* in a contaminated stream and laboratory tests. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 1001-1012.

Kuligowski, J., Halperin, K. (1992). Stainless steel cookware as a significant source of nickel, chromium, and iron. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 211-215.

Lamoureux, G.L., Rusness, D.G. (1987). Synergism of diazinon toxicity and inhibition of diazinon metabolism in the house fly by Triphane: inhibition of glutathione-S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **27**, 318-329.

Lauwerys, R.R., Hoet, P. (1993). Industrial Chemical Exposure Guidelines for Biological Monitoring. 2nd ed. Boca Ranton, Florida: *Lewis Publishers.* 82-86.

Lazareva, L.P. (1985). Changes in biological characteristics of *Daphnia magna* from chronic action of copper and nickel at low concentrations. *Gidrobiol. Zh.* **21**, 59-62.

LeBlanc, G.A., Hilgenberg, B., Cochorane, B.J. (1985). Modulation of substrate-specific glutathione S-transferase activity in *Daphnia magna* with concomitant effects on toxicity tolerance. Comp. Biochem. Physiol.**I**, 37-42.

LeBlanc, G.A., Cochorane, B.J. (1987). Identification and purification of multiple glutathione S-transferases from Daphnia magna. *Comp. Biochem. Physiol.***88B**, 39-45.

LeBlanc, G.A., Hilgenberg, B., Cochorane, B.J. (1988). Relationships between the structures of chlorinated phenols, their toxicity, and their ability to induce glutathione S-transferase activity in *Daphnia magna. Aquatic Toxicology.***12**, 147-156.

Lee, R.E., Von Lehmden, D.J. (1973). Trace metal pollution in the environment. *J.Air.Pollut. Control Assoc.* **23**, 853-857.

Lee, C.M., Turner, C. A., Huntington, E. (1986). Factors affecting the culture of *Daphnia magna.* In: *Poston, T.M., Purdy, R. (Eds.), Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, **9**, 357-368.

Lewis, P. & Weber, C. (1985). A study of the reliability of *Daphnia.* Acute toxicity tests. *Aquat. Toxicol. Hazard Assessment. Seventh Symposium. ASTM STP 8.* **54**, 73-86

Lilius, H., Hastbacka, T., Boris I, (1995). A comparison of the toxicity of 30 reference chemicals to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex. Environ. Toxicol. Chem.***14**, 2085-2088.

Linden, C. (1992). Nickel in jewelry and associated products. *Contact Dermatitis*. **26**, 73-75.

Livingstone, D. R. (1985). Biochemical measures. In: The effects of stress and pollution on marine animals. *Praeger Publishers, New York,* 81-132.

Lynn, H. B., Heppelthwaite, V., Mcglinchy A. (2000). The effect of environmental parameters on growth, cholinesterase activity and glutathione S-transferase activity in the earthworm (*Apporectodea caliginosa*). *Biomarkers*.**5** (1),46-55

Maltby, L. Calow, P. (1990). The application of bioassays in the resolution of environmental problems: past, present and future. In: Environmental Bioassay Techniques and their Application. *Kluwer Academic Publishers, London,* 65-77.

Mayer, F. L., Versteeg, D. J., McKee, M. J., Folmar, L. C., R. L., McCume, D. C. and Rattner, B. A. (1992). Physiological andNonspecific Biomarkers. In: *Huggett, R. J. Kimerle. Lewis Publishers,* 5-86.

McCarthy, D.C, Shugart, L.R. (1990).*Biomarkers of Environmental Contamination.* Lewis Publishers, Boca Raton.

Menzer, R.E., Michael, A.L., Fairbrother A. (1994). Principles and Methods of Toxicology, *3rd Wallace Hayes. Raven Press. New York.*

Merian, E. (1984). Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt, beryllium, arsenic, cadmium, and selenium, and their derivates. *Toxicol Environ Chem.* **8**, 9-38.

Michiels, C., Remacle, J. (1988). Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *Eur. Jorn. Biochem.* **177**, 435-441.

Mond, L., Langer, C., Imiche, F.(1890). The action of carbon monoxide on nickel. *J.Chem Soc London.* **57**, 749-753.

Moriarty, F. (1983). Ecotoxicology: the Study of pollutants in ecosystems. *Academic press, 2nd Edition,* 277.

Moriarty, F. (1993) Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems . *Acad. Press London.* 1-17.

Münch, D. (1992). Concentration profiles of arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, zinc, vanadium and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) in forest soil beside an urban road. *Sci. Total Environ.* **138**, 47-55.

Münzinger, A., Monicelli, F. (1991). A comparison of the sensitivity of three *Daphnia magna* populations under chronic heavy metal stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **22**, 24-31.

NAS, (1975). Principles for evaluating chemicals in the environment. *Washington D.C.*

Naylor, C., Bradley, M. & Calow, P. (1992a). Effect of algal ration - quality and method of quantification on growth and reproduction of *Daphnia magna. Arch. Hydrobiol.* **913**, 1-11.

Naylor, C., Bradley, M.C., Calow, P.(1992b). Effect of differing maternal food ration on susceptibility of *Daphnia magna Straus* neonates to toxic substances. *Aquatic. Toxicol.* **24**, 72-82.

Nebel, B.J., Richard, T. Wright.(1996). *The Way the World Works*. Environmental Science. Ed. Prentice-Hall. 5th ed.

Nielsen, G.D., Flyvholm, M. (1984). Risks of high nickel intake with diet. In: Nickel in the human Environment. *Sunderman FW Jr ed., Lyon:International Agency for Research on Cancer.* 333-338.

Nielsen, N.H., Menne, T. (1993). Nickel sensitisation and ear piercing in an un-selected Danish population. *Contact Dermatitis*. **29**, 16-21.

Nielsen, G.D. Soderberg, U., Jorgensen, P.J. *et al.* (1999). Absorption and retention of nickel from drinking water in relation to food intake and nickel sensitivity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 67-75.

Nikunen, E., Miettinen, V. (1985) *Daphnia magna* as an indicator of the acute toxicity of waste waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 368-374.

Nogueira, A.J.A. (1992). Estatística linear em Ecotoxicologia. *Daphnia* um caso de estudo. Relatório de aula prática apresentado para a prestação de provas de aptidão pedagógica e científica. Departamento de Zoologia da faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 46.

O'Brien, R.D. (1967). Insecticides. *Academic Press New York*. 131-154.

OCDE 1993a. Draft OECD guideline 202 part II, *Daphnia* reproduction test. Organisation for Economic Co-operation and Development, TGP/6/93-DAPH. 1-9.

OCDE 1993b. OECD test guidelines programme: updating of guideline 202 part II, *Daphnia* reproduction test. Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/EHS/NJG/mc/93.38, 1-18.

OCDE 1995. OECD test guidelines for testing of chemicals. Guideline 202 part I, *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Organisation for Economic Co-operation and Development.

OCDE 1997. Report of the final ring test of the *Daphnia magna* reproduction test. *Environ. Health and Saf. Pub.* **6**, 3-190.

OCDE 2000. OECD guidelines for the testing of chemicals. **215**, 2-16.

Pang, D., Burges, D.C.L., Sorahan, T. (1993). Mortality study of nickel platers with special reference to cancers or the stomach and lung. *Occup Environ Med 1996*. **53**, 714-717.

Peakall, D.B. (1994). Biomarkers:. The way forward in environmental assessment. *TEN* **1**, 55-60.

Peakall, D.B., *et al.* (1999). Biomarkers:. A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe. *NATO workshop*.

Peters, R.H., Bernardi, R. (1987). Memorie dell'instituto italiano di idrobiologia dott.Marco de Marchi. *Peters, R.H., Bernardi, R. Editors.*

Phillips, D.J.H., Muttarasin, K. (1985). Trace metals in bivalve molluscs from Thailand. *Mar Environ Res.* **15**(3), 215-234.

Phillips, D. J. H. (1990). Use of metal levels in estuaries and coastal waters. In: heavy metals in the marine environment. Eds R.W. Furnes & P. S. Rainbow.

Phillips, D. J. H. (1993). Quantitative Aquatic Biological Indicators. *Applied Science, London.*

Portaria nº732-A/96 (11 de Dezembro de 1996). Aprova o Regulamento para a notificação de substâncias químicas e para a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas.

Power E. A., Chapman P.M. (1992). Assessing Sediment Quality. G. Allen Burton Jr., Ed. Sediment Toxicity Assessement. Lewis Publishers, Florida.

Purves, W.K., Orians, G.H., Heller H.C. (1995). Life, the science of biology. *Ed. Andrew D. Sinauer. 4th ed.*

Rainbow, P.S. (1997). Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine coastal Shelf Sci.* **44**, 169-175.

Ramade, F., (1992). *Précis d'Ecotoxicologie*. Masson, Paris. 47-51.

Raport, D. (1990). Workshop issue paper: criteria for ecological indicators. *Environ. Monit. Assess.* **15**, 273-275.

Ratte, H. (1996). Statistical implications of end - point selection and inspection interval in the *Daphnia* reproduction test: a simulation study. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1831-1843.

Reed, D.J. (1998).Evaluation of chemical-induced oxidative stress as a mechanism of hepatocyte death. In *Toxicology of the liver. Ed. Plaa, G.L. & Hewitt. Taylor and Francis.* 187-217.

Rudolfs, K.Z., Koropatnick, J. (2000). Molecular Biology and Toxicity of Metals. *Taylor &Francis.* 382-413.

Sanders, B. (1990). Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. *Biomarkers Environmental Contamination*, 165-191.

Schubauer-Berigan, M., Dierkes, J., Monson, P. & Ankley, G. (1993). PH - dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriophnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1261-1266.

Sciuto, A.M. (1997). Antioxidant proprieties of glutathione and this role in tissue protection. In *Oxidants, antioxidants and free radicals. Ed. Taylor and Francis.*

Shaw, I., Chadwick, J. (1995). Ecotoxicity testing. *Taylor & Francis Ltd.* **2**(3), 80-85.

Slabbert, J.L., Venter, E.A. (1999). Biological assays for aquatic toxicity testing. *Wat.Sci.Tech.* **39**, 10-11.

Soares, A.M.V.M. (1987). Toxicidade Aguda do Magnésio. Resposta de três populações diferentes de *Daphnia magna*. Relatório de Aula Prática. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica., Universidade de Coimbra.

Soares, A.M.V.M. (1989). Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for Ecotoxicology. *University of Sheffield, PhD Thesis.*

Soares, A.M.V.M. (1990). Ecotoxicologia e determinação de riscos ecológicos. Práticas e perspectivas. *Actas da 2ª Conferência Nacional Sobre a Qualidade do Ambiente, 4-6 Abril, Lisboa.* **I**, B43-B52.

Soares, A.M.V.M., Baird, D.J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. (1991). Variation in chronic stress-tolerance among artificial clone-populations of *Daphnia magna Straus*: an ecophysiological study. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **24**, 2326.

Soares, A.M.V.M., Calow, P. (1993). Seeking standardization in ecotoxicology in Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests. *A special Publication of SETAC, Lewis Publishars, London.* **1,** 1-6.

Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., Lopes, M.C., Donato, A.M., Silveira, L., Carvalho A. P. (1994). Sistemas *in vivo* e *in vitro* em estudos de ecotoxicologia. *4ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Lisboa.* **I**, H12-H19.

Somani, S.M., Husain, K., Schlorff, E.C. (1997). Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: *Oxidants, antioxidants and free radicals.(ed). Taylor & Francis. London.*125-141.

Sperling, F. (1976). Nonlethal parameters as indices of acute toxicity. Inadequacy of acute LD_{50}.Advances in modern toxicology, 177-191.

Stangl, G.I., Kirchgessner, M. (1996). Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats. *J Nutr.* **126**, 2466-2473.

Stegeman, J.J., Bronwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., (1992)., "Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect" in Biomarkers-biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. *Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M.Jr., Bergman, H.L. (Eds). Lewis Publishers, Chelsea.* 235-337.

Stein, J.R. (1973). Handbook of Physiological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. *Cambridge University Press, London*

Stratton, G., Giles, J. (1990). Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **44**, 420-427.

Streit, B. (1992) Bioacumulation processes in ecosystems. *Experimentia*, **48**, 955 – 970.

Sunderman, F.W.Jr., Dingle, B., Hopfer, S.M., Swift, T. (1988). Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulphate and nickel chloride. *Am. J. Ind. Med.* **14**, 257-266.

Sunderman, F.W. (1989). A pilgrimage into archives of nickel toxicology. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **19**, 1-16.

Sunderman, F.W. Sr. (1992) The extended therapeutic role of dithiocarb (sodium diethyldithiocarbamate) from nickel poisoning to AIDS. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **22**, 245-248.

Taylor, B., Gabriel, W. (1993). Optimal adult growth of *Daphnia* in a seasonal environment. *Funct. Ecol.* **7**, 513-521.

Taylor, G., Baird, D., Soares, A.M.V.M. (1998). Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna Straus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 412-419.

Timbrell, J.A. (1994). Do in vivo and in vitro biochemical and toxic effects correlate? Studies with hydrazine. *TEN* **1**, 131-133.

Tjalve, H., Jasim, S., Oskarsson, A. (1984). Nickel mobilization by sodium diethiocarbamate in nickel-carbonyl-treated mice. *IARC Sci Publ.* **53**, 311-320.

Tjalve, H., Borg-Neczk, K. (1994). Effects of lipophilic complex formation on the disposition of nickel in experimental animals. *Sci Total Environ.* **148**, 217-242.

Trevan, (1992). In Précis d'Ecotoxicolgy. *Ed. Masson, Paris. 1th ed.*

Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objrctives, principles, and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **1**, 151-173.

Tyler, G. (1990). Bryophytes and heavy metals: a literature review. *Biol. J. Linn. Soc.* **104**, 231-253.

Uthus, E.O., Poellot, R.A. (1996a). Dietary foliate affects the response of rats to nickel deprivation. *Biol Trace Elem Res.* **52**, 23-35.

Uthus, E.O., Seaborn, C.D. (1996b). Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradims for dietary recommendations of the other trace elements. *J. Nutr.* **126**, 2452S-2459S.

Van Der Aar, E.M., Tan, K., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E. (1998). Strategies to characterize the mechanisms of action and the active sites of glutathione S-transferases: A Review. *Drug Metaboloism Review.* **30**(3), 569-643.

Van Hattum, B. Timmermans, K.R., GoversH.A. (1991). Abiotic and biotic factors influencing *in situ* trace metal levels in macroinvertrebates in freshwater ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 275-292.

Van Leeuwen,(1988). Short-term toxicity testing in: Manual on aquatic Ecotoxicology. Klumer *Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.* 107-108.

Vermeulen, N.P.E., Mulder, G.J., Nieuwenhuyse, H., Perters, W.H.M., Van Bladeren, P.J. (1996). Glutathione S-Transferases. *Taylor & Francis Pubblishers. London.*

Versteeg, D.J., Graney, R.L., Giesy, J.P. (1988). Field utilization of clinical measures for the assessement of xenobiotic stress in aquatic organism. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Philadelphia,* 289-306.

Versteeg, D.J., Stalmans, M., Dyer, S.D., Janssen, C. (1997). *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere.* **34**, 869-892.

Viarengo, A. (1985). Biochemical Effects of Trace Metals. *Marine Pollut Bull.* **16**, 153-158.

Villegas-Navarro, A., Santiago, M., Pérez, F., Torres, R., Abularach, T. & Reyes, J. (1997). Determination of LC_{50} from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. *Environ. Internat.* **23**, 535-540.

Walker, C.H. Hopkin, S.P. (2001). Principles of ecotoxicology. *Taylor & Francis Pubblishers. London.*

Warner, J.S. (1984). Occupational exposure to airborne nickel in producing and using primary nickel products. In: Nickel in the Human Environment, *Sunderman FW Jr, ed.* 419-437.

Watras, C.J., MacFarlane, J., Morel, F.M.M. (1985). Nickel accumullation by Scenedesmus and Daphnia: food-chain transport and geochemical implications.*Can J Fish Aquat Sci.* **42**(4), 724-730.

Webster, J.D., Parker, B.S., Alfrey, A.C. (1980). Acute nickel intoxication by dialysis. *Ann. Inter. Med.* **92**, 631-633.

Weiss, C.M. (1958). The determination of cholinesterase in the brain tissue of three species of fresh water fish and its inactivation *in vivo*. *Ecology*. **39**, 194-199.

Widdows, J., Johnson, D. (1988). Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **46**, 113-121.

Widdows, J., Donkin, (1991). Role of physiological energetic in ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**, 69-75.

Widdows, J.(1995). Physiological response to pollution. *Mar. Poll. Bull.* **16**, 129 - 134.

Wong, C.K. (1993). Effects of chromium, copper, nickel, and zinc on longevity and reproduction of the cladoceran Moina macrocopa. *Bull. Environ.Contam.Toxicol.* **50**, 633-639.

Wren, C.D. & Stephenson, G.L. (1991) The effects of acidification on the accumulation and toxicity of metals to freshwater invertebrates. *Environ. Pollut.* **71**, 205-241.

Zaffagnini, F. (1987). Reproduction in *Daphnia magna*. In: Peters, R.H., Bernardi, R. (Eds.), *Daphnia. Mem. Inst. Iatl. Idrobiol.* **45**, 245-284.

Zar, J.H. (1996). *Biostatistical Analysis*. 3ª ed. Prentice-Hall International, New Jersey.

Zhicheng, S. (1994). Nickel carbonyl: Toxicity and human health. *Sci Total Environ.* **148**, 293-298.

Zparks, T. (2000). *Statistics in Ecotoxicology*. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridgeshire, UK.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA