

Comparação da toxicidade de espécies metálicas do Cromo (III e VI), através de testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos

Carolline Araujo de Nonno^{1*}
Danielly de Paiva Magalhães^{2,3}

¹Bolsista da FAPERJ – Iniciação Científica; *E-mail:carollinedenonno@hotmail.com

²Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA). Prédio Lauro Travassos.Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz. Av. Brasil, nº4365,Manguinhos, Rio de Janeiro.

³Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada à Indústria Mínero-metalúrgica (LECOMIN). Centro de Tecnologia Mineral – CETEM. Av. Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária, Rio de Janeiro; *E-mail:dmagalhaes@cetem.gov.br.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados significativamente devido a múltiplos impactos ambientais resultantes de atividades antrópicas, tais como a contaminação dos corpos hídricos por metais provenientes de processos industriais. Os metais podem ser tóxicos dependendo de sua espécie química e da concentração no ambiente, por isso alguns, considerados mais nocivos à biota, são regularmente monitorados pelos órgãos ambientais. Com intuito de enfrentar problemas ocasionados pela contaminação dos corpos d'água, o uso da ecotoxicologia tornou-se uma ferramenta para avaliação da qualidade ambiental, que auxilia na detecção de ecotoxicidade em ambientes contaminados. Para realização dos testes de toxicidade, são utilizados bioindicadores padronizados, correspondendo aos mais diversos grupos de organismos. Este estudo comparou o efeito tóxico das espécies metálicas do cromo inorgânico (Cr^{6+} e Cr^{3+}) em organismos aquáticos através de ensaios ecotoxicológicos, com objetivo de determinar o melhor bioensaio para detecção de toxicidade desses metais. Para isso foram utilizados representantes de três níveis tróficos: produtores (microalgas *Chlorella vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata*), consumidor primário (cladóceros *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*) e consumidores secundários (peixes *Danio rerio* e *Poecilia reticulata*). Essas informações poderão auxiliar no biomonitoramento ambiental. Segundo os dados obtidos através dos bioensaios, a forma hexavalente do Cr mostrou-se mais tóxica que a sua forma trivalente. Além disso, notou-se que os melhores bioensaios foram aqueles no qual se utilizou os indivíduos produtores como bioindicadores de contaminação.

Palavras-chave: cromo hexavalente, cromo trivalente, ecotoxicidade aguda, peixe, cladocero, alga.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems have been modified significantly due to multiple environmental impacts resulting from human activities such as pollution of waterbodies by metals from industrial processes. Metals can be toxic depending on their chemical species and the environmental concentration, so some of them considered to be more harmful to biota are regularly monitored by environmental agencies. Aiming to tackle problems caused by contamination of water bodies, the use of ecotoxicology has become a tool for assessing environmental quality, which helps in ecotoxicity detection in contaminated environments. Ecotoxicity tests are performing with diverse groups of organisms following standardized protocols. This study compared the toxic effect of inorganic chromium (Cr^{6+} and Cr^{3+}) in aquatic organisms using ecotoxicological tests, in order to determine the best bioassay for the detection of toxicity of these metals. For this, were used organisms that represent three trophic levels: producers (microalgae *Chlorella*

vulgaris and *Pseudokirchneriella subcapitata*), primary consumers (cladocerans *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia dubia*) and secondary consumers (fish *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*). This information will help in biomonitoring programs. According to data obtained from the bioassays, the hexavalent form of Cr was more toxic than its trivalent form. In addition, it was noted that the best bioassays were those in which was used producers specimens as bioindicators contamination.

Keywords: hexavalent chromium, trivalent chromium, acute ecotoxicity, fish, cladoceran, alga.

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa devido a múltiplos impactos ambientais resultantes de atividades antrópicas, tal como a contaminação da água por metais que comprometem a saúde dos organismos aquáticos e humana (Goulart e Callisto, 2003).

Devido ao amplo uso de metais no ramo industrial (Cervantes et al. 2001), as condições e padrões de lançamento de efluentes no Brasil foram estabelecidas pelo CONAMA, através da Resolução N°430/2011, onde dispõe-se os valores máximos permitidos para metais como o Cr^{+6} e Cr^{+3} (0,1 mg/L e 1,0 mg/L, respectivamente). Ainda que os efluentes estejam dentro dos padrões químicos exigidos, eles podem apresentar toxicidade para determinados indivíduos. Por essa razão, a legislação estabelece a determinados ramos industriais que sejam realizados ensaios ecotoxicológicos nos efluentes antes do despejo, porém, não são determinados quais os indivíduos devem ser testados para cada um dos metais e contaminantes (Costa et al. 2008). Esse fator possibilita que as indústrias usem organismos menos sensíveis às substâncias testadas, podendo negligenciar os efeitos e, dessa forma, quando lançado, o efluente pode impactar o ambiente e ser tóxico para indivíduos menos resistentes. Em virtude disso, o biomonitoramento surge como método de avaliação da “saúde” do ecossistema aquático e qualidade desse ambiente onde, através deste, podem ser realizados ensaios ecotoxicológicos com uso de organismos bioindicadores. Por meio do uso sistemático das respostas dos bioindicadores, é possível avaliar e monitorar mudanças ocorridas no ambiente, dando suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d’água por compostos tóxicos. A ecotoxicologia aquática pode atuar de forma preventiva, evitando efeitos tóxicos, ou de forma reativa, identificando efeitos e contaminantes após a contaminação do ambiente (Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Através do resultado desses ensaios, também é possível determinar bioindicadores que sejam mais sensíveis para determinada substância química.

O cromo é comumente encontrado no ambiente aquático nas formas trivalentes e hexavalente. O Cr^{6+} é solúvel e relativamente estável na maioria das águas naturais, já a forma trivalente tende a formar complexos estáveis com espécies orgânicas ou inorgânicas carregadas negativamente e, assim, a sua solubilidade e toxicidade variam de acordo com as características de qualidade da água, tais como a dureza e alcalinidade. Com o intuito de contribuir com informações acerca do biomonitoramento ambiental, o presente trabalho tem como objetivo comparar a toxicidade das espécies metálicas do cromo inorgânico (Cr^{6+} e Cr^{3+}), através de testes ecotoxicológicos padronizados pela ABNT, utilizando duas espécies de organismos para cada nível trófico, as microalgas *Chlorella vulgaris* Beyerinck, 1890 e *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F.Hindák, 1990 (produtor), os cladóceros *Daphnia similis* Claus, 1879 e *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (consumidor primário) e os peixes *Danio rerio* Hamilton, 1822 e *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (consumidor terciário), a fim de determinar, dentre esses indivíduos, os melhores bioindicadores da toxicidade do

Cr⁶⁺ e Cr³⁺, partindo-se do pressuposto de que os organismos não responderão da mesma forma quando expostos aos mesmos agentes tóxicos testados.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), localizado no Instituto Oswaldo Cruz – IOC (FIOCRUZ).

Substâncias-teste

Para os testes de toxicidade da espécie de cromo hexavalente foi utilizado o reagente de padrão analítico dicromato de potássio (K₂CrO₇) - 99,9% - VETEC. Para os testes de toxicidade da forma trivalente, foi utilizado o reagente de padrão analítico Sulfato de Cromo III Básico (Cr₄SO₄) – Teor CrO₃ = Ca 25% - VETEC.

A unidade de volume utilizada foi de mg/L da espécie metálica testada. Para os ensaios, foram feitas soluções-mãe dos metais a serem testados em água processada (ultrapura) e, a partir dessas soluções-mãe, foram feitas as concentrações testadas utilizando a água de cultivo de cada organismo-teste para diluição.

Manutenção dos organismos e bioensaios

Através do cultivo e manutenção adequados dos organismos, foram realizados testes toxicológicos agudos e crônicos com os mesmos, que são métodos para determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀), a Concentração Efetiva Média (CE₅₀) ou a Concentração de inibição média (CI₅₀), isto é, a concentração do agente tóxico que causa mortalidade, imobilidade ou inibição do crescimento, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição.

Na manutenção e cultivo dos indivíduos produtores *P. subcapitata* e *C. vulgaris*, os organismos foram mantidos em meio de cultivo L.C. Oligo conforme recomendação da ABNT (NBR 12648:2011). As algas foram mantidas em câmara de BOD com temperatura constante de 23,5°C e fotoperíodo de 16h/8h claro/escuro.

Os testes de toxicidade crônica se deram conforme a ABNT (NBR 12648:2011), onde, para a realização dos mesmos, foi necessário que o inóculo das algas tivesse de 3 a 5 dias desde a última repicagem, sendo mantido em condições controladas de luminosidade e temperatura. Após esse período, um inóculo de alga foi centrifugado, o sobrenadante foi separado e a solução que sobrou foi ressuspensa para 20 ml com o próprio sobrenadante. O preparo do teste consistiu na exposição de 3 x 10⁴ céls de *P. subcapitata* e *C. vulgaris* para cada 1 ml de solução-teste, a várias concentrações de uma amostra com exposição em triplicata. As soluções-teste foram preparadas a partir da solução-mãe, utilizando o meio LC-Oligo como água de diluição. As réplicas das amostras foram mantidas sob luz e agitação constantes, e a determinação do crescimento algáceo foi realizada a partir da contagem celular em microscópio óptico, utilizando-se câmaras de contagem Neubauer, após 72h de exposição ao contaminante.

Para o teste definitivo, as concentrações foram definidas por meio de um bioensaio preliminar, onde foi utilizada uma ampla faixa de concentração (geralmente em escala logarítmica, ex.: 0,001; 0,01; 0,1; 1,0). Entre a concentração que não provoca nenhum efeito e a menor concentração que provoca 100% de efeito estabeleceram-se as concentrações para o teste definitivo. As concentrações utilizadas em todos os testes definitivos realizados neste trabalho, foram estabelecidas dessa forma.

A manutenção e cultivo da *D. similis* no laboratório incluiu água de cultivo (água Minalba®) e o preparo do alimento utilizado (alga). As fêmeas eram mantidas em béqueres com capacidade para 2000 ml. Esses béqueres eram armazenados em câmara de BOD com temperatura controlada de 23,5°C e fotoperíodo de 12h/12h. No caso da *C.*

dubia, as fêmeas adultas eram mantidas em béqueres com capacidade de 500 ml, onde eram preenchidos com 250 ml água de cultivo Minalba® (50%) e 250ml (50%) de água natural após filtração em malha 50µm. Esses béqueres eram armazenados em câmara de BOD com temperatura controlada de 23,5°C e fotoperíodo de 12h/12h.

Conforme a ABNT NBR 12713 (ABNT, 2004) , o teste toxicológico agudo consistiu na exposição de indivíduos de *D. similis* e *C. dubia* com 6 a 24h de nascidos a várias concentrações de uma amostra (sem renovação das soluções-teste) por um período contínuo de 48 horas, sob condições controladas de temperatura e fotoexposição onde, através desse procedimento, foi permitido determinar a 48h-CE₅₀.

Nos testes definitivos as soluções-teste foram preparadas em proveta de 100ml, diluindo a solução-mãe em água de diluição (água Minalba®). Após esse processo, foram transferidos de 30 a 50 ml da solução para béqueres referentes às três réplicas de cada concentração-teste.

As réplicas contemplaram ao menos seis concentrações. Em cada réplica foram adicionados 10 organismos com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o grupo controle constituiu apenas de água de diluição.

O ensaio foi mantido em câmara de BOD com temperatura controlada de 23,5°C, na ausência de luz e alimentação. A cada 24 horas de incubação do teste, os organismos afetados e não afetados pela amostra foram contados. O pH e oxigênio dissolvido (O.D.) foram medidos ao final do teste em cada concentração-teste em uma única réplica.

Na manutenção dos consumidores terciários *D. rerio* e *P. reticulata*, os peixes foram adquiridos em fornecedores comerciais e tinham tamanho médio de 3,5 cm. Eram mantidos em aquários com capacidade de 90L preenchidos com água de abastecimento público filtrada e desclorada. A temperatura da água variava de 24 a 26°C.

Os peixes eram alimentados uma vez ao dia, de segunda a sexta-feira, e o alimento era composto por uma mistura de Spirulina, Artemia, minhoca de sangue e Tetra Min. Nos finais de semana eram colocadas pastilhas que serviam como alimento durante esse período. Os peixes ficavam aclimatados nas condições descritas por um período mínimo de 7 dias até a realização dos bioensaios.

Conforme a CETESB (1990), o teste de toxicidade aguda consistiu na exposição de indivíduos de *D. rerio* e *P. reticulata* a várias concentrações de uma amostra, por um período contínuo de 24 a 96 horas, sob condições controladas de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e pH. Tal procedimento permitiu determinar a 96h-CL₅₀.

Para a realização dos testes definitivos, as soluções-teste foram preparadas em proveta de 2L, colocando a quantidade da solução-mãe necessária para 3L de solução-teste e avolumando com água de diluição (água de abastecimento público filtrada e desclorada) até a marcação de 2L. Essa solução foi transferida para o cristalizador de exposição, onde foi introduzido mais 1L de água de diluição, completando 3L de solução-teste.

Para cada concentração foi montada uma réplica, onde a faixa de teste contemplou pelo menos cinco concentrações. Nas réplicas foram adicionados 10 organismos com o auxílio de um puçá de nylon, assim como na réplica do grupo controle, constituída apenas de água de diluição.

Os béqueres de exposição foram vedados com filme plástico, aerados constantemente com auxílio de uma pipeta Pasteur ligada a uma mangueirinha que saía oxigênio e mantidos em ambiente com temperatura em torno de 25°C por 24 a 96 horas, permanecendo em ausência de luz e alimentação. A cada 24 horas de incubação do teste, os organismos vivos e mortos eram contados a olho nu.

Análise de dados

Os dados de mortalidade e imobilidade dos ensaios ecotoxicológicos agudos com cladóceros e peixes foram analisados por regressão linear usando o teste Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al. 1977), e os valores de 48h-CE50 e 96h-CL50 com 95% de intervalo de confiança foram calculados para o cromo trivalente e hexavalente. Para os bioensaios de toxicidade crônica com alga foi utilizado o programa estatístico Linear Interpolation (ICPIN, versão 2.0 - Norberg-King, 1993) onde foram calculados a concentração que inibe o crescimento algal em 50% (72h-CI₅₀) e seus intervalos de confiança 95%. Para cálculo do percentual de inibição de crescimento algal em relação ao controle foi utilizado a fórmula abaixo (ABNT NBR 12648:2011):

$$IC = \frac{Cc - Ct}{Cc} \times 100$$

Onde

Onde *Cc* = média de células por ml no controle e *Ct* = média de células por ml no tratamento.

RESULTADOS

Nos testes realizados com o Cr³⁺ utilizando microalgas, o pH final das soluções-teste variou entre 7,1-8,5 e o O.D. variou entre 6,1-7,6 mg/L. Para a espécie *C. vulgaris*, a 72h-CI₅₀ observada foi de 37,12µg/L (IC95% 23,58-56,39). Ainda para essa espécie, a 72h-CI₂₀ foi de 16,5014µg/L (IC95% 7,41-29,45) (Tabela 1).

Para os indivíduos da espécie *P. subcapitata* a 72h-CI₅₀ obtida foi de 0,098µg/L (IC95% 0,047-0,358) (Tabela 2). Ainda para essa espécie, a 72h-CI₂₀ teve o valor médio aproximado de 0,028µg/L (IC95% 0,009-0,062). Comparando os valores da 72h-CI₅₀, 72h-CI₂₀ e IC95% das duas espécies de microalgas testadas, a que se mostrou mais sensível ao Cr³⁺ foi a *P. subcapitata*.

Tabela 1: Número de células por ml e percentual de inibição de crescimento de *C. vulgaris* após 72h de exposição ao Cr³⁺.

Concentração µg/L	Nº de cel/ml x 10 ⁶	Média	% inibição	pH	O.D.
Controle 1	15,439				
Controle 2	10,591	11,067	---	8,1	7,2
Controle 3	7,171				
15	10,590				
15	7,790	9,159	17,2	7,8	7,5
15	9,094				
30	6,754				
30	5,316	6,110	44,8	7,5	7,6
30	6,259				
60	3,663				
60	3,333	3,680	66,7	7,4	7,4
60	4,043				
120	3,788				
120	3,016	3,513	68,3	7,1	7,3
120	3,734				

Tabela 2: Número de células por ml e percentual de inibição de crescimento de *P. subcapitata* após 72h de exposição ao Cr³⁺.

Concentração µg/L	Nº de cel/ml x 10 ⁶	Média	% inibição	pH	O.D.
Controle 1	4,293				
Controle 2	4,233	3,887	---	8,5	6,9
Controle 3	3,135				
0,01	3,616				
0,01	3,116	3,411	12,3	8,4	6,9
0,01	3,500				
0,05	3,596				
0,05	1,408	2,739	29,5	8,2	6,8
0,05	3,211				
0,1	2,396				
0,1	1,120	1,910	50,9	8,3	6,9
0,1	2,213				
0,5	0,763				
0,5	0,980	1,187	69,5	8,3	6,7
0,5	1,818				
1,0	1,314				
1,0	0,867	1,137	70,7	7,8	6,1
1,0	1,229				

Nos testes realizados com o Cr³⁺ utilizando cladóceros, o pH soluções-teste variou entre 7,02-8,02 e o O.D. variou entre 5,3-6,5 mg/L. Para a espécie *D. similis*, a 48h-CE₅₀ observada foi de 15,96 mg/L (IC 95% 15,96-16,72 mg/L) (Tabela 3), enquanto que os indivíduos da espécie *C. dubia* apresentaram uma 48h-CE₅₀ de 4,98 mg/L (IC 95% 4,36-5,70 mg/L) (Tabela 4). Comparando os valores da 48h-CE₅₀ das duas espécies de cladóceros testadas, a que se mostrou mais sensível ao Cr³⁺ foi a *C. dubia*.

Tabela 3: Número de *D. similis* mortas/imóveis por réplica (R1, R2, R3) após exposição aguda ao Cr³⁺, pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortos/imóveis 24h			Mortos/imóveis 48h			pH	O.D.
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Controle	0	0	0	0	0	0	8,02	6,1
10	0	0	0	0	0	0	7,69	6,2
12,5	0	2	0	0	2	0	7,65	6,3
15	0	3	0	0	3	0	7,62	6,5
16	5	1	4	7	8	8	7,41	5,8
19	3	3	5	5	9	10	7,42	5,7
22	7	8	7	9	9	10	7,31	5,3
25	10	10	10	10	10	10	7,02	5,9

Tabela 4: Número de *C. dubia* mortas/imóveis por réplica (R1, R2, R3) após exposição aguda ao Cr³⁺, pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortos/imóveis 24h			Mortos/imóveis 48h			pH	O.D.
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Controle	0	0	0	0	0	0	8,02	6,3
0,1	0	0	0	0	0	0	7,91	6,2
0,5	1	1	0	1	1	0	7,92	6,1
1	1	1	1	1	1	1	7,93	6,5
2,5	2	0	1	2	0	1	7,87	6,4
5	1	3	8	1	3	8	7,81	6,3
7,5	9	10	8	9	10	8	7,82	6,2

Nos testes realizados com o Cr³⁺ utilizando peixes, o pH soluções-teste variou entre 4,96-7,42 e o O.D. variou entre 5,2-6,12 mg/L. Para a espécie *D. rerio*, observou-se uma 96h-CL₅₀ de 22,34 mg/L (IC 95% 20,18-24,74 mg/L) (Tabela 5), enquanto que os indivíduos da espécie *P. reticulata* apresentaram uma 96h-CL₅₀ de 16,88 mg/L (IC 95% 14,06-20,25 mg/L) (Tabela 6). Comparando os valores da 96h-CL₅₀ das duas espécies de peixe testadas, a que se mostrou mais sensível ao Cr³⁺ foi a *P. reticulata*. Tabela 5: Número de *D. rerio* mortos após exposição aguda ao Cr³⁺, pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortalidade					
	24h	48h	72h	96h	pH	O.D.
Controle	0	0	0	0	6,39	5,35
5	0	0	0	0	6,32	6,12
10	0	0	0	0	6,47	5,95
15	0	0	0	0	6,07	5,68
20	0	1	4	4	5,35	5,31
25	0	3	5	5	5,25	5,61
30	8	8	10	10	4,96	5,89

Tabela 6: Número de *P. reticulata* mortos após exposição aguda ao Cr³⁺, pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortalidade					
	24h	48h	72h	96h	pH	O.D.
Controle	0	0	0	0	7,42	5,2
5	0	0	0	0	7,23	5,6
10	0	1	1	2	7,3	5,3
15	1	1	1	2	7,3	5,4
20	0	0	3	4	7,28	5,6
25	10	10	10	10	6,27	5,8
30	10	10	10	10	6,12	5,3

Nos testes realizados com o Cr⁶⁺ utilizando microalgas, o pH final das soluções-teste variou entre 7,1-8,1 e o O.D. variou entre 6,8-7,6 mg/L. Para a espécie *C. vulgaris*, a 72h-CI₅₀ observada teve o valor médio de 0,701 µg/L (LC95% 0,56-0,7646). Para essa mesma espécie, a 72h-CI₂₀ teve o valor médio aproximado de 0,3361 µg/L (IC95% 0,0981-0,4574) (Tabela 7).

Os valores para os indivíduos da espécie *P. subcapitata* apresentaram uma 72h-CI₅₀ com o valor médio de 2,798 µg/L (IC95% 1,97-3,97). Ainda para essa espécie, a 72h-CI₂₀ foi de 0,837 µg/L (IC95% 0,3547-1,1250) (Tabela 8). Comparando os valores

da 72h- CI_{50} , 72h- CI_{20} e $IC_{95\%}$ das duas espécies de microalgas testadas, a que se mostrou mais sensível ao Cr^{6+} foi a *C. vulgaris*.

Tabela 7: Número de células por ml e percentual de inibição de crescimento de *C. vulgaris* após 72h de exposição ao Cr^{6+} .

Concentração $\mu\text{g/L}$	Nº de cel/ml x 10^6	Média	% inibição	pH	O.D.
Controle 1	14,895				
Controle 2	15,022	14,707	---	7,9	6,9
Controle 3	14,203				
0,05	14,421				
0,05	16,717	16,053	-9,2	7,5	7,1
0,05	17,019				
0,1	16,884				
0,1	18,802	15,956	-8,5	7,6	7,2
0,1	12,180				
0,5	8,357				
0,5	10,316	10,295	30,0	7,5	6,8
0,5	12,210				
1	4,574				
1	3,645	4,045	72,5	7,8	7,3
1	3,915				
1,5	3,470				
1,5	3,367	3,210	78,2	7,4	7,4
1,5	2,790				
2	3,065				
2	2,983	3,016	79,5	7,2	7,2
2	2,999				

Tabela 8: Número de células por ml e percentual de inibição de crescimento de *P. subcapitata* após 72h de exposição ao Cr^{6+} .

Concentração $\mu\text{g/L}$	Nº de cel/ml x 10^6	Média	% inibição	pH	O.D.
Controle 1	6,771				
Controle 2	6,550	6,722	---	8,1	7,2
Controle 3	6,844				
0,05	7,353				
0,05	5,442	5,739	14,6	7,8	7,5
0,05	4,422				
0,1	6,571				
0,1	6,362	6,558	2,4	7,5	7,6
0,1	6,739				
0,5	6,749				
0,5	4,551	6,070	9,7	7,4	7,4
0,5	6,908				
1	5,055				
1	4,392	5,042	25,0	7,1	7,3
1	5,677				
1,5	4,521				
1,5	4,621	4,545	32,4	7,8	7,5
1,5	4,491				
2	3,154				
2	3,684	3,540	47,3	7,5	7,6

2	3,781					
c	8,785					
c	8,362	8,554	---	7,4	7,4	
c	8,513					
5	4,561	4,485				
5	4,412		47,6	7,1	7,3	
5	4,482					

Nos testes realizados com o Cr^{6+} utilizando cladóceros, o pH final das soluções-teste variou entre 7,17-8,4 e o O.D. variou entre 5,2-6,7 mg/L. Para a espécie *D. similis*, a 48h-CE₅₀ observado foi de 3,94µg/L (Tabela 9), enquanto que os indivíduos da espécie *C. dubia* apresentaram uma 48h-CE₅₀ de 7,51µg/L (Tabela 10). Comparando os valores da 48h-CE₅₀ das duas espécies de cladóceros testadas, a que se mostrou mais sensível ao Cr^{6+} foi a *D. similis*.

Tabela 9: Número de *D. similis* mortas/imóveis por réplica (R1, R2, R3) após exposição aguda ao Cr^{6+} , pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortos/imóveis 24h		Mortos/imóveis 48h		pH	O.D.
	R1	R2	R1	R2		
Controle	0	0	0	0	7,17	6,5
0,001	0	0	0	0	7,31	6,3
0,002	0	0	1	0	7,96	5,2
0,003	2	2	1	1	7,97	6,6
0,005	7	6	8	9	8,15	6,3
0,01	10	10	10	10	8,4	6,4

Tabela 10: Número de *C. dubia* mortas/imóveis por réplica (R1, R2, R3) após exposição aguda ao Cr^{6+} , pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortos/imóveis 24h		Mortos/imóveis 48h		pH	O.D.
	R1	R2	R1	R2		
Controle	0	0	0	0	7,17	6,5
0,001	0	0	0	0	7,2	6,1
0,002	0	0	1	3	7,54	6,6
0,005	3	0	4	3	7,65	6,4
0,01	1	1	5	3	7,76	6,5
0,015	0	1	3	7	7,83	6,4
0,02	10	10	10	10	7,85	6,7

Nos testes realizados com o Cr^{6+} utilizando peixes, o pH final das soluções-teste variou entre 6,51-8,24 e o O.D. variou entre 6,0-6,5 mg/L. Para a espécie *D. rerio*, observou-se uma 96h-CL₅₀ de 15,78 mg/L (Tabela 11), enquanto que os indivíduos da espécie *P. reticulata* apresentaram uma 96h-CL₅₀ de 7,80 mg/L (Tabela 12). Comparando os valores das 96h-CL₅₀ das duas espécies de peixe testadas, a que se mostrou mais sensível ao Cr^{6+} foi a *P. reticulata*.

Tabela 11: Número de *D. rerio* mortos após exposição aguda ao Cr⁶⁺, pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortalidade				pH	O.D.
	24h	48h	72h	96h		
Controle	0	0	0	0	8,24	6,4
5	0	0	0	0	7,93	6,3
10	1	1	2	3	7,55	6
20	3	5	8	8	7,28	6,5
30	6	8	9	10	7,19	6,5
40	6	10	10	10	6,81	6,4
80	10	10	10	10	6,51	6,3

Tabela 12: Número de *P. reticulata* mortos após exposição aguda ao Cr⁶⁺, pH e oxigênio dissolvido (O.D.) ao fim do bioensaios.

Concentrações (mg/L)	Mortalidade				pH	O.D.
	24h	48h	72h	96h		
Controle	0	0	0	0	7,54	6
1	0	0	0	0	7,36	6
5	1	1	1	1	7,33	6
10	2	5	8	8	7,19	6
15	4	5	8	8	6,94	6
20	3	4	8	9	6,83	6
30	4	5	10	10	6,73	6

DISCUSSÃO

De acordo com Costa et al. (2008), o efeito dos metais nas algas pode ser observado através de alterações no crescimento populacional (inibição da fotossíntese), enquanto que nos microcrustáceos podem ocorrer a imobilidade ou até mesmo a morte do indivíduo, e em peixes pode causar mortalidade.

A maior parte da literatura publicada conclui que o Cr⁶⁺ é mais tóxico e/ou biodisponível que o Cr³⁺ (Van Der Putte et al. 1982; Thaker et al. 1996; Pawlisz et al. 1997; Khangarot et al. 1999; Blasiak e Kowalik, 2000; Bagchi et al. 2002; Stoecker, 2004; Munn et al. 2005; Shanker et al. 2005; Valko et al. 2005; Farag et al. 2006; Prabakaran et al. 2006). Apesar disso, dados encontrados em outros estudos (Thompson et al. 2002; Kaszycki et al. 2004; Ksheminska et al. 2005; Pereira et al. 2005) encontram-se em desacordo com essa conclusão.

Comparando as toxicidades das espécies de cromo para as algas, a microalga *C. vulgaris* mostrou-se mais sensível ao Cr⁶⁺ do que ao Cr³⁺ e a *P. subcapitata* mais sensível ao Cr³⁺ do que ao Cr⁶⁺, embora a literatura reconheça o Cr⁶⁺ como mais tóxico aos seres vivos. Esse mesmo padrão foi observado no estudo de Vignati et al. (2010), onde as microalgas utilizadas apresentaram inibição do seu crescimento quando submetidas à diferentes concentrações de Cr³⁺ e Cr⁶⁺, na qual a forma trivalente mostrou-se cinco vezes mais tóxica que a forma hexavalente para a espécie *P. subcapitata* e duas vezes mais tóxica para a espécie *Chlorella kessleri*.

Entre os cladóceros, *C. dubia* mostrou-se mais sensível ao Cr³⁺ e a *D. similis* mais sensível ao Cr⁶⁺. Segundo dados de Melkinov e Freitas (2011), a 48h-CE₅₀ encontrada para a espécie *D. similis* exposta a Cr³⁺ foi de 3,24 mg/L, este valor é cinco vezes menor que o encontrado para a mesma espécie neste trabalho. No entanto, esse resultado encontrado na literatura, aproxima-se da 48h-CE₅₀ obtida para a espécie *C. dubia*.

Entre as duas espécies de peixe, observou-se que a espécie *P. reticulata* foi mais sensível que *D. rerio* tanto para o Cr^{3+} quanto ao Cr^{6+} , sendo a forma hexavalente mais tóxica para ambas as espécies. Em bioensaios desenvolvidos por outros pesquisadores, observou-se que para a espécie de peixe *P. reticulata* o Cr^{6+} em alta concentração aumentou ao máximo a vida útil desses organismos (Perez-Benito, 2006), sugerindo a existência de um fenômeno chamado hormese química, quando determinada substância tóxica tem efeitos opostos em doses altas e em doses baixas. Em outro trabalho, a forma trivalente do Cr mostrou-se mais prejudicial que sua forma hexavalente, ao induzir estresse oxidativo mais forte ao tecido dos indivíduos da espécie de peixe *Carassius auratus*, ainda que em mesma concentração (Lushchak et al. 2010). Os dados encontrados nesses dois trabalhos, vão em desencontro com os resultados obtidos na presente pesquisa. Por outro lado, no trabalho de Mishra e Mohanty (2008) a 96h-CL₅₀ encontrada para o Cr^{6+} foi de 41,75 mg/L, onde indivíduos da espécie de peixe *Channa punctatus* expostos a esse agente tóxico, apresentaram alterações comportamentais como natação errática e letargia, além de variações físicas como alterações nas brânquias. Na pesquisa de Vutukuru (2005), a exposição aguda ao Cr^{6+} provou ser altamente tóxica e cumulativa para a espécie de peixe *Labeo rohita*, induzindo efeitos deletérios às funções vitais desses organismos como a taxa metabólica, os índices hematológicos e perfis bioquímicos.

Segundo os critérios de ecotoxicidade previstos pelo CONAMA, os resultados dos ensaios ecotoxicológicos aplicados no efluente devem ser realizados em organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos distintos. Em relação aos bioensaios desenvolvidos neste trabalho, aqueles que se mostraram mais indicados a serem aplicados na contaminação de Cr^{3+} foram os testes crônicos de 72h com a microalga *P. subcapitata*, e agudos de 48h com o cladóceros *C. dubia*. No caso do Cr^{6+} , os testes que melhor se aplicam são os crônicos de 72h com a microalga *C. vulgaris*, e agudos de 48h com o cladóceros *D. similis*. É possível notar que os organismos produtores foram os mais afetados para ambas as espécies do Cr inorgânico. A importância da produção primária se dá pelo fato desses indivíduos serem responsáveis pelo início do fluxo de matéria e energia da rede trófica dos ambientes aquáticos, contribuindo para a sua fertilização e sustentando indiretamente os animais de níveis tróficos superiores (Dring, 1992). Sabendo disso, ao serem afetados por determinado contaminante, tem-se como consequência afetar também o restante da cadeia trófica. Ainda para as microalgas, as concentrações encontradas para cada contaminante são muito inferiores àquelas permitidas pelo CONAMA ($\text{Cr}^{3+} = 1 \text{ mg/L}$ e $\text{Cr}^{6+} = 0,1 \text{ mg/L}$), dessa forma, nas condições estabelecidas, o Cr^{3+} seria letal para esses indivíduos. Em relação aos ensaios com peixes, os mesmos não são os mais indicados para detectar esses metais, visto que as concentrações encontradas para os contaminantes são extremamente superiores àquelas estabelecidas pelo CONAMA. Se esses organismos fossem usados como base, todos os indivíduos de níveis tróficos inferiores morreriam.

Sendo assim, conclui-se que os organismos não responderam da mesma forma quando expostos aos mesmos agentes tóxicos testados e que a forma hexavalente do Cr inorgânico, mostrou-se mais tóxica que a sua forma trivalente para a maioria dos bioensaios, com exceção do bioensaio crônico com a alga *P. subcapitata*. Os resultados indicaram que a contaminação por ambas as formas de cromo são mais prejudiciais aos indivíduos produtores e consumidores primários, sendo os bioensaios com estes organismos bons bioindicadores de contaminação para cromo.

AGRADECIMENTOS

À FAPERJ pela bolsa de Iniciação Científica. Ao Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental –IOC/FIOCRUZ pelo fornecimento dos materiais e espaço para desenvolvimento do trabalho durante o estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011. Pág. 28.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. Rio de Janeiro, 2004. Pág. 23.
- Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicol.* 2002 Oct.; 180(1):5-22.
- Blasiak J, Kowalik J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat. Res/Gen Tox. and Env. Mut.* 2000 Aug; 469(1):135-145.
- Cervantes JC, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R.. Interaction of chromium with microorganisms and plant. *FEMS Microb. Rev.* 2001 Mai; 25(3):335-347.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Norma técnica L5.019: Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos: Testes de toxicidade Aguda com peixes - Parte I Sistema Estático. São Paulo, 1990.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução N° 430/2011, de 13 de Maio de 2011. Dispõem sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Publicação DOU n° 92 16 Mai 2011; Pág. 89.
- Costa, CR, Olivi P, Botta CM, Espindola EL. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím. Nova* 2008 Jan; 31(7):1820-1830.
- Dring MJ, Dring MH. *The Biology of Marine Plants*. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.
- Farang AM, May T, Marty GD, Easton M Harper DD, Little EE, Cleveland L. The effect of chronic chromium exposure on the health of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquat. Toxicol.* 2006 Mar; 76(3-4):246-257.
- Goulart M, Callisto M.. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM* 2003 Oct ; 2(1):156-164.
- Hamilton M, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Env. Science & Tech* 1977 Jul; 11(7):714-719.
- Kaszycki P, Fedorovych D, Ksheminska H, Babyak L, Wójcik D, Koloczek H. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microb. Res.* 2004 Apr; 159(1):11-17.
- Khangarot BS, Rathore RS, Tripathi DM. Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, *Saccobranchus fossilis* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1999 May; 43(1):11-20.
- Ksheminska H, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycki P, Kolczek H. Chromium (III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochem.* 2005 Apr; 40(5):1565-1572.

- Lushchak OV, Kubrak OI, Lozinsky OV, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Chromium (III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aqua. Toxicol.* 2009 Jun; 93(1):45-52.
- Magalhães DP, Ferrão Filho AS. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 2008 Jul; 12(3):355-381.
- Melnikov P, Freitas TCM. Evaluation of Acute Chromium (III) Toxicity in Relation to *Daphnia similis*. *J. of Water Res. and Prot.* 2011 Feb; 3(2):127-130
- Mishra AK, Mohanty B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2008 Feb; 26(2):136-141.
- Munn SJ, Allanou R, Aschberger K, Berthault F, Cosgrove O, Luotamo M, Pakalin S, Paya-Perez A, Pellegrini G, Schwarz-Schulz B, Vegro S. Chromium trioxide, sodium chromate, sodium dichromate, ammonium dichromate, potassium dichromate, EUR 21508 EN. Luxemburg: European Union Risk Assessment Report, Office for Official Publications of the European Communities; 2005. Report 53.
- Norberg-King TJ. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach - Version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report: 03-93. Duluth: Environmental Research Laboratory, MN 55804; 1993.
- Pawlisz AV, Kent RA, Schneider UA, Jefferson C. Canadian water quality guidelines for chromium. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 1997 Dec; 12(2):123-183.
- Pereira MJ, Resende P, Azeiteiro UM, Oliveira J, Figueiredo DR. Differences in the effects of metal ion growth of two fresh water green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindakand and *Gonium pectorale* Müller. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 2005 Jul; 75(3):515-522.
- Perez-Benito JF. Effects of chromium (VI) and vanadium (V) on the lifespan of fish. *J. of Trace Elem. in Med. and Bio.* 2006 Sept; 20(3):161-170.
- Prabakaran M, Binuramesh C, Steinhagen D, Michael RD. Immune response and disease resistance of *Oreochromis mossambicus* to *Aeromonas hydrophila* after exposure to hexavalent chromium. *Dis. Aquat. Organ.* 2006 Apr; 68(3):189-196.
- Stoecker B. Chromium.. Elements and their Compounds in the Environment. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M. Metals and their compounds. 2nd ed. Vol. 2. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2004. Pg. 709-729.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 2005 Jul; 31(5):739-753.
- Thaker J, Chhaya J, Nuzhat S, Mittal R, Mansuri AP, Kundu R. Effects of chromium(VI) on some ion-dependent ATPases in gills, kidney and intestine of a coastal teleost *Periophthalmus dipses*. *Toxicol.* 1996 Sept; 112(3):237-244.
- Thompson SL, Manning FCR, McColl SM. Comparison of the toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to cyanobacteria. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 2002 Aug; 69(2):286-293.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005 May; 12(10):1161-1208.
- Van der Putte I, Laurier MBHM, Van Eijk GJM. Respiration and osmoregulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to hexavalent chromium at different pH values. *Aquat. Toxicol.* 1982 Mar; 2(2):99-112.
- Vignati DAL, Dominik , Beye ML, Pettine M, Ferrari BJD. Chromium (VI) is more toxic than chromium (III) to freshwater algae: A paradigm to revise?. *Ecot. and Environ. Saf.* 2010 Jul; 73(5):743-749

Vutukuru SS. Acute effects of Hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian Major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2005 Dec; 2(3):456- 462.