

# CAPÍTULO 2

## O ESTADO TRÓFICO DE SISTEMAS AQUÁTICOS SEGUNDO O ESPECTRO DE TAMANHOS DA COMUNIDADE MICROBIANA E SUA COMUNIDADE CRÍPTICA

Andréa Galotti

Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Jaén, España.  
E-mail: agalotti@ujaen.es

### RESUMO

O espectro de tamanhos da comunidade microbiana em sistemas aquáticos tem sido de grande interesse para a comunidade científica, especialmente como meio de identificação dos possíveis desequilíbrios em relação ao estado original do meio objeto de estudo. Neste contexto, é feita uma revisão sobre os conceitos de espectro de tamanhos e seus usos, assim como de espécies crípticas e a evidencia de uma possível utilização dos resultados das retas geradas pelo espectro de tamanhos como índice de estado trófico. De fato, em um estudo realizado recentemente em reservatórios de Catalunha (Espanha), foi encontrada uma relação direta entre o valor da reta do espectro de tamanhos-abundância de diatomáceas e o estado trófico de cada um dos sistemas. Como dado adicional, também é proposta a utilização do estudo da comunidade críptica da comunidade microbiana, através de manipulações em laboratório para favorecer a eclosão dos cistos, e conseguinte a contagem do número de organismos para o cálculo de abundância e do tamanho e biovolume dos organismos desta comunidade. A taxa de enquistamento de microorganismos, sobretudo ciliados, em sistemas com variações associadas a processos naturais ou atividades antrópicas chega a ser de até 100%, o que nos leva a acreditar que esses organismos que se enquistam poderiam ser incluídos no espectro inicial dos sistemas e ajudar também a conhecer a capacidade de auto-restauração do sistema em questão além de obter resultados mais completos para a identificação do estado trófico de maneira muito fiável.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DO PICOPLÂNTON AO MICROPLÂNTON

De acordo com a classificação de Sieburth (1978), o fitoplâncton pode ser dividido em quatro principais grupos com base no tamanho: Picoplâncton (0,2-2  $\mu\text{m}$ ); Nanoplâncton (2-20  $\mu\text{m}$ ); Microplâncton (20-200  $\mu\text{m}$ ) e Macroplâncton (>200  $\mu\text{m}$ ) (Figura 1).

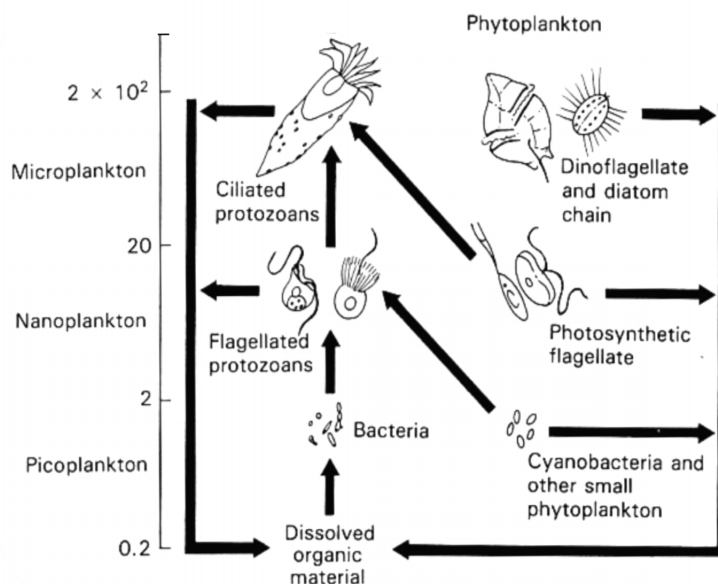


Figura 1: “Microbial loop” por tamanhos (modificado de FENCHEL,1987).

O intervalo de tamanho linear visto em organismos planctônicos fototróficos abrange desde bactérias fotossintéticas (0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro) - por exemplo, *Prochlorococcus marinus*: uma alga verde-azulada, principalmente marinha, com um diâmetro que varia de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  até grandes algas coloniais tal como *Microcystis* (2000  $\mu\text{m}$  de diâmetro da colônia) (SIGEE, 2005). Outros exemplos nítidos de organismos que pertencem a estes grupos são *Synechococcus*, *Nannochloris* e *Chlorellas* no intervalo referente ao picoplâncton. *Rhodomonas*, muitas *chlorococcales* e pequenas *Chrysophytes* no nanoplâncton. Dinoflagelados, *Sphaerocystis* e algas verde-azuladas filamentosas no microplâncton, assim como organismos coloniais do tipo diatomáceas. Por último, no intervalo referente ao macroplâncton, algas verde-azuladas coloniais. Todas elas representam uma variação sobre quatro ordens de magnitude.

Formando uma importante parte do “microbial loop” encontramos os protozoários ciliados que flutuam entre os diferentes intervalos relatados acima, englobando os grupos desde nanoplâncton até macroplâncton, desde 10  $\mu\text{m}$  até os 3 mm máximos do *Spirostomum*, o maior ciliado de água doce conhecido. Também deve ser destacado a importância dos ciliados por ocorrer em uma ampla gama de micro-nichos (FENCHEL, 1987).

O fitoplâncton de água doce, composto por bactérias fotossintéticas e algas, mostra uma considerável variação não só de tamanho, mas também de formas (células ou colônias) e de composição química (sendo de grande importância funcional a presença de mucilagem ou esqueletos carbonatados, por exemplo). As dimensões do fitoplâncton são importantes em relação à enumeração e determinação do biovolume, designação da categoria de tamanho (pico-macroplâncton como comentado anteriormente) e atividade biológica. Embora as algas planctônicas pudessem ser consideradas simplesmente como um grupo de organismos microscópicos relativamente uniformes, a variedade linear de tamanhos de algas encontradas em um ecossistema de lagos, por exemplo, é equivalente à variedade de tamanhos de plantas vistas numa floresta tropical. Se considerarmos os biovolumes, o intervalo de tamanhos desde picoplâncton a

macroplâncton se estende a mais de nove ordens de magnitude, assim, o *Mycrocystis* tem um volume maior que uma célula bacteriana num fator de  $10^{12}$ .

Em suma, o tamanho e a forma do fitoplâncton têm importantes implicações para as funções biológicas, incluindo processos fisiológicos tais como troca de materiais pela superfície, absorção de luz e habilidade para crescer, assim como o papel ecológico que tem para o próprio ecossistema pelágico (velocidades de sedimentação, taxa de herbivoria etc.). De fato, o tamanho corporal é proposto por ser um fator de escala importante na manifestação das tão conhecidas “leis ecológicas gerais” (AZOVSKY, 2002).

Tal como indicado, outras funções afetadas são a distribuição na coluna de água, alterada segundo o tipo de mobilidade (passiva ou ativa) e a sedimentação, além da resistência ao ser ingerido pelo zooplâncton. Por isso, são importantes tanto uma detecção como uma enumeração correta, especialmente das células de menor tamanho. Com o objetivo de evitar que este grupo de organismos seja subestimado ao ser analisado, por técnicas convencionais de microscopia, foram desenvolvidas novas técnicas como a microscopia de epifluorescência e provas espécie-específicas do oligonucleotídeo (CARON et al., 1999). Esta importância já se viu refletida, por exemplo, no estudo realizado por Haphey-Wood (1988), onde mais de 90% das células algais contadas em alguns lagos oligotróficos do norte do País de Gales (Reino Unido) eram micro-clorofitas, abrangendo mais de 75% da biomassa algal expressa em volume celular. Em outros lagos estudados por Nagata et al. (1994), tal como o Lago Baikal (Rússia), a comunidade nanoplânctônica estava dominada por *Synechocystis limnetica* (alga verde-azulada unicelular) e causava grandes “blooms” nos finais de verão, chegando a representar até 60% do total da produção primária anual deste lago (SEMOVSKI et al., 2000).

Do ponto de vista prático, viu-se a necessidade de explorar alternativas, complementares em muitos casos, com base em critérios de agregação que permitam reduzir a complexidade do estudo puramente taxonômico dos ecossistemas pelágicos. A biomassa e o tamanho dos grupos funcionais presentes no plâncton, já mencionados anteriormente, são medidas que, além do seu grande valor *per se*, permitem uma aproximação simplificada ao estudo de tais sistemas.

Nesse sentido, a incorporação de técnicas automáticas de análise do plâncton facilita o desenvolvimento dessas aproximações. Tanto a objetividade das medidas como a potência estatística, facilitam a difusão desses enfoques alternativos ao estudo taxonômico clássico. Porém, um dos grandes problemas desse enfoque se erradica na carência de dados empíricos suficientes para validar seus postulados. Dessa forma, os estudos sobre métodos de determinação da estrutura de tamanhos das comunidades planctônicas apresentam um grande valor em si mesmo (RODRÍGUEZ; LI, 1994). A ampla variedade funcional e de tamanhos para cobrir os grupos que constituem o plâncton requerem freqüentemente o uso de uma extensa gama de técnicas para tal fim.

A citometria de fluxo ocupa um lugar destacado entre as técnicas mais recentes no campo da Ecologia, notadamente da Limnologia. Esta técnica permite a caracterização das propriedades ópticas de milhões de células em poucos minutos de forma individualizada, o que possibilita a conexão das propriedades individuais com a ecologia das comunidades fitoplânctônicas (PLATT 1989; LI 1994; RODRÍGUEZ; LI, 1994). Além disso, com esta técnica pode-se determinar o tamanho das células de uma suspensão aquosa mediante a dispersão frontal de luz (FSC) das mesmas, seguindo as oportunas calibrações com amostras naturais ou esferas de látex de tamanho conhecido (CUCCI; SIERACKI; 2001).

## 1.2 ESPECTRO DE TAMANHOS: SIGNIFICADO ECOLÓGICO

Em 2010, Petchey; Belgrano publicaram uma síntese do projeto multidisciplinar SIZEMIC (The European Science Foundation Research Network), onde afirmam que o tamanho individual dos organismos, além de sua taxonomia, pode ser utilmente usado nos processos de gestão e conservação de alguns sistemas aquáticos e que o projeto em questão facilitará a integração de tais aproximações adicionadas a outras taxonômicas usadas em ecologia terrestre.

Esta recente publicação somada a tantas outras geradas em todo o mundo, demonstra particularmente a importância, assim como a necessidade, de estudos sobre o significado das distribuições de tamanhos dos organismos nos ecossistemas como indicador do estado ecológico.

Já em 1953, Coulter patenteou o que mudou o conceito de agregação de dados de tamanho no mundo científico dedicado aos ecossistemas aquáticos: “Means of counting particles suspended in a fluid” (O significado da contagem de partículas suspensas num fluido) e a tecnologia do conhecido *Coulter counter*, uma máquina que podia contar e medir o tamanho de partículas, incluindo pequenos organismos. Sheldon et al. (1972) descreveu tal máquina como capaz de contar partículas de menos de 1 µm até quase 100 µm de uma amostra de água. A partir daí, pode-se então dizer quantos indivíduos planctônicos eram registrados em determinadas gamas de tamanho, isto é, desde 1 até 4 µm, depois de 4 a 8 µm e assim por diante. O resultado da relação entre abundância e tamanho foi apelidado de espectros de tamanho e eles revelaram uma notável regularidade na estrutura da comunidade pelágica (KERR; DICKIE, 2001).

As análises da inclinação das retas geradas pelo espectro de tamanhos estão sendo extensamente usadas para avaliar o estado de ecossistemas marinhos em escala regional e global (SHIN et al., 2005). Neste caso, são tipicamente observadas as retas com declives mais negativos quando o sistema está sendo ou foi objetivo de uma atividade exploratória (veja Figura 12 mais adiante), demonstrando que os efeitos desta atividade são detectáveis pelo espectro de tamanhos e sua utilização como indicador em sistemas marinhos. Este potencial do espectro de tamanhos em proporcionar indicadores do estado do ecossistema e permitir estimar a distância desde o estado de referência, provavelmente contribuiu para seu uso como indicador geral do estado dos ecossistemas marinhos (SHIN et al., 2005).

Petchey; Belgrano questionaram então se os espectros de tamanho seriam menos úteis em sistemas não marinhos. Eles afirmam que a resposta parece ser “não” e que inclusive as mesmas leis poderiam ser aplicadas a ecossistemas de solo (MULDER; ELSER, 2009). Assim, estão sendo abertos caminhos sobre a importância e a utilidade do estudo do espectro de tamanhos como ferramenta de pesquisa da situação trófica dos sistemas, sobretudo dos sistemas de água doce.

Mas qual é o desenho experimental mais favorável? Quais são os grupos de indivíduos que refletem melhor o estado trófico de um ecossistema aquático?

A resposta para estas questões necessita mais investigação, tanto focalizadas nos diferentes grupos de organismos e comunidades que compõem os ecossistemas, quanto nos sistemas em diferentes estados de conservação, exploração e estado trófico. Entretanto, a importância e a utilidade, sobretudo da comunidade microbiana como foco do estudo do espectro de tamanhos, já foi mencionada anteriormente. Mas são poucos os estudos, que incluem as espécies crípticas, principalmente de protozoários.

### 1.3 O QUE SÃO AS ESPÉCIES CRÍPTICAS E PORQUE INCLUÍ-LAS NOS ESTUDOS DE ESPECTRO DE TAMANHOS?

O fundo dos lagos e dos rios está tipicamente coberto por uma rica formação de material orgânico. Isto é amplamente composto de detritos em decomposição, mas também de uma vasta população de micro-organismos, algum dos quais proporcionam uma importante fonte de alimentos (em particular, bactérias) para os protozoários. A superfície dos sedimentos fornece então uma multidão de micro-habitats para os protozoários capazes de se movimentar, uma variedade de lugares ligados a espécies sésseis e uma fonte de compostos de carbono para esses organismos heterotróficos.

Em *habitat* natural, a composição de espécies da comunidade de protozoários bentônicos varia com o microambiente local e as mudanças estacionais. A atividade humana também poderia ter um impacto sobre estes organismos podendo, no pior dos casos, extingui-los, ou mesmo causar o enquistamento resistente.

Como parte do ciclo vital destas espécies, o enquistamento pode ocorrer como fases temporárias de dormência para sobreviver a condições adversas, ou fases terminais de senescência,

levando à morte. Apesar de a maioria dos protozoários presentes no sedimento serem fisiologicamente ativos, outros passam por tais estágios metabolicamente inativos, em alguns casos derivados da própria sedimentação da coluna de água. Além disso, muitos destes estágios inativos se apresentam como cistos de resistência (Figura 2): as chamadas *Espécies Crípticas*.

Algumas das espécies mais conhecidas e estudadas que formam cistos são os organismos ciliados (*Paramecium*, *Tetrahymena*, *Stentor*, *Blepharisma*, *Stylonychia*) e amebóides (*Actinosphaerium*, *Amoeba proteus*). Os flagelados também estão bem representados na maioria dos *habitat* bentônicos, com alta abundância de microflagelados e nanoflagelados ( $10^2$ - $10^5$  e  $10^5$ - $10^6$  organismos  $ml^{-1}$ , respectivamente; Alongi 1991).

Em 2007, Bickford e colaboradores publicaram uma revisão onde afirmavam que o incremento exponencial do reconhecimento das espécies crípticas havia ocorrido nas últimas duas décadas sobretudo desde o advento do PCR (Figura 3), apesar de o conceito de espécies “crípticas” já existir há séculos. Esta aproximação detectou primeiramente grupos de organismos desconhecidos até os níveis taxonômicos mais altos na árvore vital eucariótica (DAWSON; PACE, 2002) e revelou uma riqueza inesperadamente alta de protistas inclusive na maioria dos ambientes extremos estudados até agora (EPSTEIN; LÓPEZ-GARCÍA, 2008).

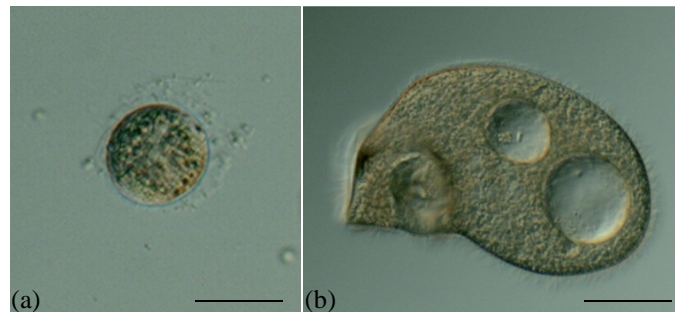


Figura 2: *Fabrea salina* em forma de cisto de resistência (a) e após ser mantido em cultivos manipulados em laboratório para proporcionar sua eclosão (b). (Escala = 45  $\mu m$ ; fotos de Andréa Galotti).

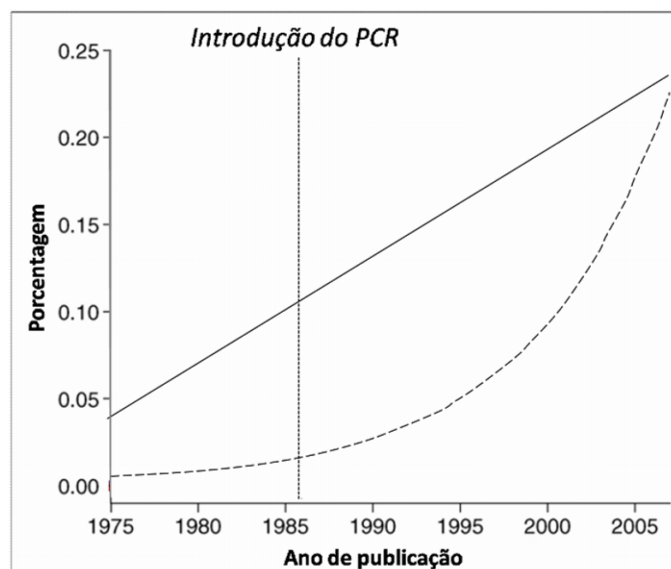


Figura 3: Incremento do reconhecimento das espécies crípticas antes e depois da introdução do PCR; linha preta contínua: menções como espécie críptica; linha cinza descontínua: menções como espécies irmãs. (modificado de BICKFORD et al., 2007).

Fenchel et al. (1997) e.g. estudou a diversidade global em relação à local de micro-organismos, centrando sua atenção nas espécies crípticas de protozoários ciliados. Ele denominou



de espécies crípticas aqueles organismos que estão presentes como cistos de “descanso” ou são demasiado raros (pouco abundantes) para serem encontrados microscopicamente. Consequentemente, amostras de sedimento eram incubadas sobre uma variedade de diferentes condições de cultivos até alcançar a eclosão de espécies, até aquele momento, crípticas. Em 2005, o mesmo autor estudou as possíveis diferenças genéticas comentadas anteriormente entre as espécies e suas semelhantes crípticas e descobriu que a variação na sequência genética do rRNA mostra mutações neutrais acumuladas que não necessariamente retratam uma diversidade funcional.

Como já foi dito antes, a formação de esporas de resistência está tipicamente relacionada com a deterioração das condições ambientais, tal como a superpopulação, redução de nutrientes e disponibilidade de luz, acumulação de metabolitos tóxicos ou redução da temperatura. Em alguns casos, a dormência parece estar relacionada a uma específica mudança ambiental, tal como concentração de oxigênio.

Nesse sentido, a contaminação antropogênica tem um papel importante na deterioração das condições ambientais dos ecossistemas aquáticos. Entre as alterações antropogênicas que os sistemas aquáticos sofrem, destacam-se as provocadas pelas atividades associadas à agricultura intensiva, principalmente o uso excessivo - e às vezes descontrolado - de produtos fitossanitários (GUERRERO et al., 2003). Os fatores que influem no impacto que um tóxico pode ocasionar dependerão da sua toxicidade, persistência no meio e da quantidade que se libere. Uma vez liberados no meio, a água da irrigação e da chuva é responsável por arrastar o que não foi incorporado pelas plantas (HUBER, 1993). As substâncias utilizadas, principalmente fertilizantes e pesticidas, chegam à última instância desde o ecossistema doador ao ecossistema receptor (sistema aquático) carregando todo tipo de produtos químicos que podem afetar negativamente a comunidade microbiana. Um deles são os conhecidos efeitos negativos dos metais pesados. Apesar de muitos dos micro-organismos possuírem o mecanismo de desintoxicação, não só especificamente aqueles que crescem em ambientes contaminados por metais (GADD; GRIFFITHS, 1978) e muitos se vêem alterados de maneira irremediável.

Nas grandes cidades, os lagos ou reservatórios podem ser os ecossistemas receptores de grandes quantidades de metais pesados provenientes de diferentes atividades. Esses metais foram utilizados durante séculos, mas o incremento de seu uso nas áreas industriais e, sobretudo, em países subdesenvolvidos, é preocupante (NRIAGU, 1996; Figura 4). Tanto o uso de mercúrio na mineração do ouro em muitas partes da América do Sul quanto o de arsênico na conservação da madeira e, especialmente, os desperdícios das grandes fábricas fizeram com que a concentração destes metais se tornasse um problema não só ambiental, mas também de saúde pública.

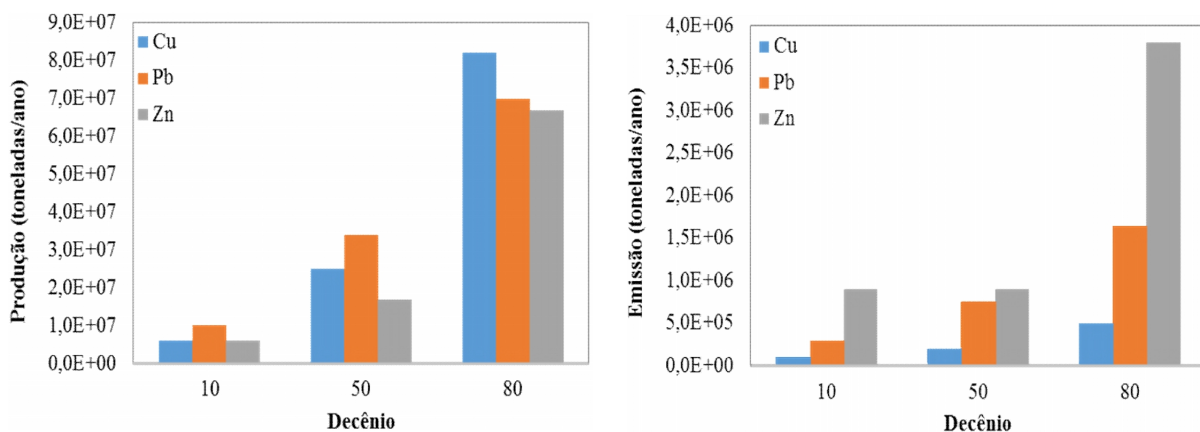


Figura 4: Produção e emissão global de cobre (Cu), chumbo (Pb) e zinco (Zn) nos decênios 10, 50 e 80 (modificado de Järup 2003).

A contaminação por metais pesados em sistemas aquáticos pode causar precisamente o enquistamento de algumas espécies com esta capacidade. Dois tipos de ciliados, *Colpoda* e *Drepanomonas* mostraram, a partir de microscopia eletrônica, a formação de cistos com uma parede

cística imatura e provavelmente não viável, depois de estarem expostos ao metal pesado cádmio (GUTIÉRREZ, J.C. comentário pessoal; GONZÁLEZ et al., 2005).

Rocha-Olivares et al. (2004) afirmaram que a mortalidade diferencial de espécies crípticas pode contribuir para a redução observada na diversidade genética em locais contaminados, se os membros de um complexo de espécies crípticas apresentarem respostas diferenciadas aos contaminantes que estão presentes.

Outro fator que estimula o enquistamento dos protozoários ciliados é a mudança das condições ambientais em sistemas extremos. Como tais entendem-se os sistemas com qualquer valor dos parâmetros físico-químicos em demasia ou em menor quantidade do esperado para um sistema equilibrado. Entre os mais conhecidos e estudados estão os sistemas hipersalinos, águas continentais que contêm mais de 50 g L<sup>-1</sup> de sal expressos como total de sólidos dissolvidos (TSD), segundo Hammer (1978).

A porcentagem de espécies crípticas de protozoários ciliados encontrados em sistemas continentais hipersalinos pode ser de até 100% (GALOTTI, 2010). Na Salina de Brujuelo, sul da Espanha, Galotti et al. (2010) encontraram 92% destas espécies quando a salina tinha um TSD de 108 g L<sup>-1</sup>.

Galotti (2010) também estudou os espectros de tamanhos da comunidade microbiana de 17 sistemas hipersalinos. Em todos eles foram detectados deslocamentos na distribuição de bactérias e fitoplâncton, refletidos na forma do sino típico dos espectros de tamanho, com mudanças nos valores modais e descontinuidade na forma do espectro (Figura 5). Isto significa que a rede trófica se vê alterada em forma de simplificação da comunidade primária em sistemas extremos (POR, 1980), contendo, neste caso, um menor número de espécies por intervalos de tamanho (SOROKIN, 1999), assim como espaços vazios entre tamanhos onde não foi encontrada nenhuma espécie que fosse classificada nestes intervalos.

Com isso, nasce a pergunta: as espécies crípticas preencheriam esses espaços abertos causados pela descontinuidade no espectro de tamanhos?

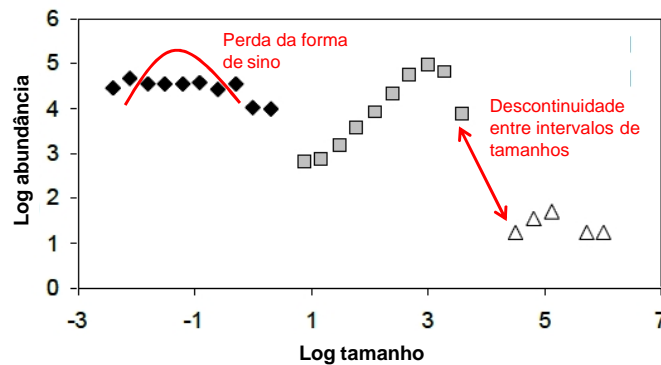


Figura 5: Espectro de tamanhos típico de um sistema hipersalino onde se observam as frações de tamanhos e suas diferenças em relação ao espectro de um sistema teoricamente equilibrado (GALOTTI, 2010).

Em primeiro lugar, é importante destacar a inclusão da comunidade de ciliados nos estudos de espectro de tamanhos da comunidade microbiana, não só pela visão mais completa que o espectro poderia ter, mas pela importância desta comunidade para o laço microbiano, assim como a necessidade de conhecer melhor seu papel ecológico num ecossistema (STOECK; STOCK, 2010). Caso o estudo da estrutura de tamanhos dos ciliados não fosse levado a cabo, possíveis alterações no sistema como um todo não seria percebido.

A figura a seguir (Figura 6) mostra o espectro de tamanho-biomassa resultado do estudo da comunidade microbiana de três sistemas hipersalinos continental no sul da Espanha (GALOTTI, 2010): Salina de Barranco Hondo, 138 g L<sup>-1</sup> TSD; Don Benito, 116 g L<sup>-1</sup> TSD; e San José, 132 g L<sup>-1</sup> TSD; onde na coluna da esquerda não se vêem incluídas as espécies crípticas de ciliados; à direita, sim, estão incluídas tais espécies. Os três sistemas citados foram os casos encontrados com 100% de espécies crípticas de ciliados. O aspecto dos espectros de tamanho muda perceptivelmente de um

caso para o outro, refletindo-se também no valor da inclinação da reta. Por exemplo, no caso de Barranco Hondo, o valor da reta que antes da inclusão dos resultados de tamanho e biomassa dos ciliados era de 0,75; passou a ser 0,80. As linhas de tendência dos espectros de tamanhos de Don Benito e San José foram respectivamente 0,51 e 0,37, e passaram a ser 0,30.

Na Figura 7 vê-se aquelas salinas onde foi menos de 100% (entre 83-92%) a porcentagem de espécies crípticas de ciliados encontradas (GALOTTI, 2010; GALOTTI et al., 2014): Salina de Brujuelo, 108 g L<sup>-1</sup> TSD; Los Vélez, 139 g L<sup>-1</sup> TSD; e Peñaflor, 145 g L<sup>-1</sup> TSD. Os pontos marcados em vermelho são aqueles que apareceram depois que as amostras foram manipuladas em laboratório com o fim de estimular a eclosão destas espécies, isso é, não apareciam na amostra fresca (original). Obviamente, o valor das retas desses espectros também se viu alterado na mesma ordem dos comentados acima.

Os exemplos mencionados anteriormente demonstram que estas novas técnicas de análises estão disponíveis para fechar a lacuna existente quando se trata de protistas (STOECK; STOCK, 2010), sobretudo, quanto às espécies crípticas. O ressurgimento da “era de descobrimento de organismos” pode ser altamente emocionante para os ecologistas microbianos.

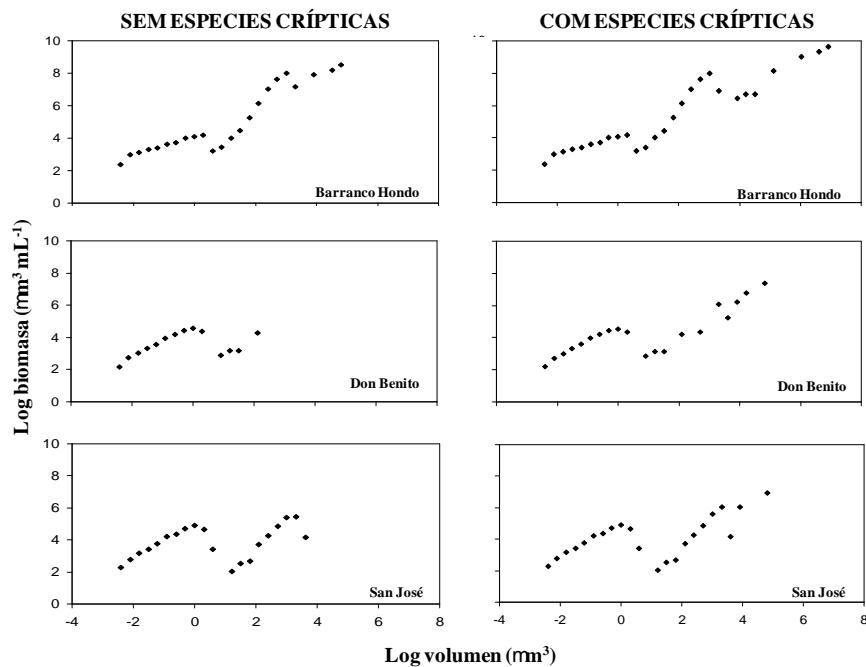


Figura 6: Espectro de tamanho-biomassa de três sistemas hipersalinos (Salina de Barranco Hondo, Don Benito e San José; Comarca La Loma, Espanha) com 100% de espécies crípticas de ciliados. Na coluna da esquerda o espectro é apresentado antes da inclusão dessas espécies.

## 2 O ESTADO TRÓFICO DOS SISTEMAS AQUÁTICOS E ESTADO DE CONSERVAÇÃO

### 2.1 A ESTRUTURA DE TAMANHOS COMO INDICADOR DE ESTADO TRÓFICO

Em ecologia definem-se características chaves dos ecossistemas para poder entender, quantificar e investigar suas variações no tempo, associadas a processos naturais ou atividades antrópicas. Neste contexto, em limnologia identificam-se os indicadores do estado trófico e fatores que os determinam.

Naumann (1919) introduziu os termos gerais de oligotrofia e eutrofia, definindo-os em função da comunidade fitoplânctônica. Atualmente, se define a oligotrofia como um estado que se caracteriza por sua baixa biomassa fitoplânctônica, uma alta transparência da água e uma limitada concentração de nutrientes e substâncias húmicas (Figura 8). Pelo contrário, a eutrofia implica em uma elevada biomassa algal, redução da transparência da água, alta carga de nutrientes e baixas concentrações de substâncias



húmicas, apesar de também existirem estados intermediários entre os extremos mencionados anteriormente, que se definem como mesotrofia.

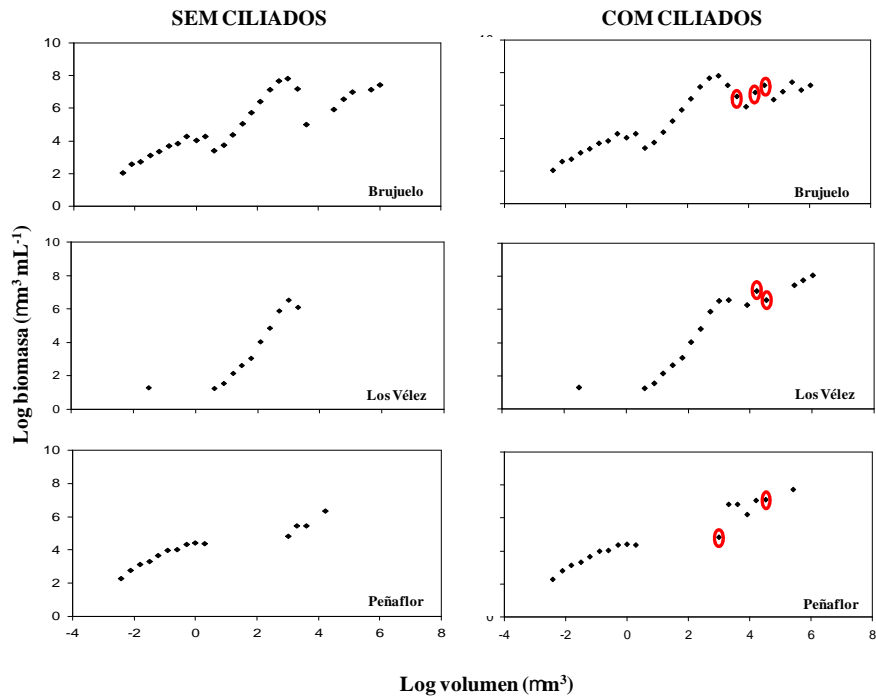


Figura 7: Espectro de tamanho-biomassa de três sistemas hipersalinos (Salina de Brujuelo, Don Benito e San José; Comarca La Loma, Espanha) com 100% de espécies crípticas de ciliados. Na coluna da esquerda o espectro é apresentado antes da inclusão dessas espécies.

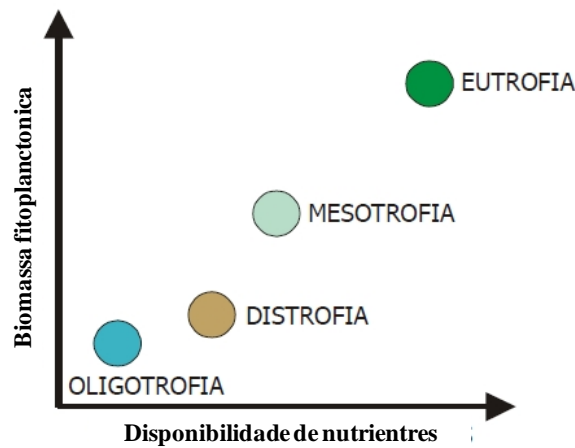


Figura 8: Gráfico esquemático da definição do estado trófico como oligotrófico, mesotrófico e eutrófico, além da distrofia, segundo os parâmetros de disponibilidade de nutrientes e biomassa fitoplanctônica.

A relação entre índice de estado trófico e estrutura de tamanhos da comunidade é um tema que já foi abordado por outros autores científicos (por exemplo, KERR, 1971; ROJO; RODRÍGUEZ, 1994; JENNINGS et al., 2002); foi publicado inclusive no Brasil como ferramenta bioindicadora na Acta Limnologica Brasiliensia de 2005 (RACY et al.; VELHO et al.), mas nunca foi quantificado a partir dos resultados do espectro de tamanhos do laço microbiano e, menos ainda, foi incluída nele a comunidade de espécies crípticas.

Sprules; Munawar (1986) afirmaram que o monitoramento das comunidades pelo espectro de biomassa normalizado, como procedimento habitual, poderia prover uma advertência antecipada de casos de stress tóxico o de nutrientes em ecossistemas aquáticos. Além disso, como resultado do

trabalho dos mesmos autores, concluíram que foram observadas nítidas diferenças na estrutura de biomassa da comunidade planctônica aquática que estão relacionadas tanto com o tamanho quanto com a produtividade do ecossistema de 25 lagos do interior do Canadá.

Nas publicações relacionadas com sistemas aquáticos no Brasil, Racy et al. (2005) encontraram uma excelente correlação entre o índice de diversidade de tamanho das bactérias com a clorofila, mostrando-se ser um indicador significativo entre ambientes eutróficos e oligotróficos. Já num estudo da estrutura de tamanhos dos ciliados pertencentes a reservatórios de distintos graus de trofia no Estado do Paraná, descobriu-se que a biomassa (medida em  $\text{mg C. L}^{-1}$ ) era maior no sistema eutrófico do que no oligotrófico, além de apresentar maiores flutuações de densidade no primeiro (VELHO et al., 2005). Velho et al. (2005) também constataram que o tamanho médio de ciliados mostrou uma tendência inversa com o incremento das condições tróficas, o que nos leva outra vez a uma reta mais negativa de um espectro de tamanhos no caso do sistema alterado, isto é, eutrófico.

Neste mesmo contexto, num estudo levado a cabo em reservatórios da região de Catalunha na Espanha - onde a estrutura de tamanhos da comunidade fitoplanctônica foi comparada com o nível de estado trófico dos reservatórios (MOSCHINI et al., dados não publicados) - descobriu-se uma relação bastante convincente entre o valor das linhas de tendência dos espectros de tamanho com o grau de estado trófico quando relacionado de forma escalonada (Figura 9).

	a	p
<b>Oligotrófico</b>	-0,19	0,065
	-0,36	0,097
	-0,45	0,043
	-0,45	0,029
	-0,48	0,008
	-0,51	0,001
<b>Hipereutrófico</b>	-0,62	0,032

Figura 9: Valor das retas (a) da estrutura de tamanhos-abundância da comunidade fitoplanctônica de reservatórios em Catalunha (Espanha) junto com a significação estatística ( $p < 0,05$ ) de cada resultado, desde o sistema mais oligotrófico até o sistema hipereutrófico.

É altamente aconselhada a inclusão da comunidade críptica, especialmente de ciliados, no estudo da estrutura de tamanhos da comunidade microbiana como ferramenta indicadora do estado trófico de sistemas aquáticos. A seguir, é feito um breve resumo da propriedade desta comunidade como indicador de conservação dos ecossistemas, além da possibilidade de indicar a capacidade de autorrestauração dos mesmos.

## 2.2 O ESTUDO DAS ESPÉCIES CRÍPTICAS COMO INDICADOR DE CONSERVAÇÃO DOS ECOSISTEMAS E DA SUA CAPACIDADE DE AUTORRESTAURAÇÃO

Os produtos químicos associados à industrialização ou à agricultura intensiva causam impactos tanto em reservatórios de água para o consumo humano quanto em sistemas naturais. Um dos grandes problemas são as alterações causadas pelos fitossanitários, que como outros produtos químicos, levam a uma grande perda de biodiversidade no sistema. O teor deste impacto dependerá da toxicidade do produto que chega ao sistema, assim como sua persistência no meio e da quantidade liberada.

Embora os organismos da comunidade microbiana normalmente não façam parte das inspeções biológicas encaminhadas aos estudos de conservação, eles também se vêm alterados pelas contaminações. Normalmente, todas as comunidades alteradas por processos de contaminação reduzem sua riqueza específica e diversidade, sobrevivendo somente as espécies mais resistentes a

tal alteração. Isso supõe mudanças tanto na estrutura como no funcionamento do ecossistema (CLEMENTS; NEWMAN, 2002).

Esteban; Finlay (2010) aconselham a inclusão da comunidade críptica nas mencionadas inspeções na hora de determinar as condições biológicas para conservação de habitat. Nesse sentido, a diversidade críptica em forma de “seed-bank” ajuda os ecossistemas a recuperar-se das mudanças causadas por estas alterações antropogênicas, realizando seu papel ao encontrar o momento ótimo para eclodir e reproduzir-se, formando parte da diversidade potencial dos sistemas. Uma das comunidades mais afetadas, devido a seus requerimentos e sensibilidade aos contaminantes, é a dos ciliados. Por isso, também são muito úteis como indicadores biológicos nesses sistemas (CHEN et al., 2008), além de serem componentes integrais do funcionamento dos sistemas aquáticos (FINLAY; ESTEBAN, 1998). No entanto, se a contaminação fosse suficientemente forte, como mencionada anteriormente, podia ser que o banco de sementes sofresse uma alteração negativa ou irreversível a diversidade críptica diminuiria o suficiente para que o funcionamento do sistema fosse negativamente comprometido.

Para incorporar o estudo da comunidade críptica aos planos de gestão de ecossistemas aquáticos, fazendo um link entre pesquisa e estratégias de conservação, é necessário ter informação com relação às diferentes agressões e alterações que o ecossistema em questão poderia estar sofrendo e, por conseguinte, afetando a capacidade de manutenção e desenvolvimento da biodiversidade críptica.

O meio para ativar a eclosão do banco de sementes ocasionado por contaminações difusas é tão simples como reduzir a concentração do contaminante no meio. Neste caso, diluições consecutivas da amostra inicial (ESTEBAN; FINLAY, 2003), mantidas sob uma temperatura e luz aproximadamente semelhantes ao meio original, fazem com que voltem a serem detectados os organismos enquistados, que encontrem nessas diluições uma condição ótima para eclodirem e se reproduzirem.

A manipulação em laboratório de amostras originais de um ecossistema aquático é bastante útil para o uso de ferramentas bioestatísticas com o objetivo de correlacionar tipo e quantidade do produto contaminante com a capacidade de autorrestauração do ecossistema. Assim como o uso de mesocosmos onde a quantidade do contaminante adicionado é conhecida, é útil para o conhecimento da capacidade de alteração de cada produto sobre a comunidade críptica, individualmente (PARRA et al., dados não publicados).

No caso das mudanças ambientais ou mesmo em sistemas extremos, também é visto esse processo biológico de conservação de organismos por meio de enquistamento. Como já mencionado anteriormente, 92% de espécies crípticas foram encontrados na salina de Brujuelo (TSD 108 g L<sup>-1</sup>; GALOTTI et al., 2010) depois das amostras serem manipuladas em laboratório. A figura abaixo (Figura 10) mostra o aumento de número de espécies acumuladas de ciliados durante o tempo de análise das subamostras diluídas.

Por outro lado, Parra et al. (dados não publicados) encontraram uma diminuição na capacidade de eclosão das espécies do banco de sementes em mesocosmos utilizados como réplicas de sistemas aquáticos, sendo um para tratamento com nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) – substância ativa de muitos fitossanitários normalmente utilizados na agricultura intensiva - e outro para controle. Essa diminuição da eclosão é bastante visível após o segundo pulso de nitrato de amônio (Figura 11), confirmando o comentado anteriormente: a alteração do ecossistema por um produto químico pode se dar tanto pela capacidade contaminante deste, quanto pela quantidade de vezes que ele é capaz de alcançar o sistema.

### 3 CONCLUSÕES PARA O FUTURO

De forma resumida, faz-se abaixo uma descrição dos índices de estado tróficos mais utilizados no mundo da ciência ecológica. Eles são utilizados para estimar as condições biológicas de um corpo de água. Estado trófico é definido como o total de peso da biomassa em um dado corpo de água no momento que é medido. A quantidade de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes biologicamente utilizados são os determinantes primários dos índices de estado trófico.

O índice de estado trófico de Carlson é, seguramente, um dos mais utilizados, além de ser o usado pela agência de proteção meio-ambiental dos Estados Unidos. A relação entre seus valores e os de clorofila, fósforo e a profundidade do disco de Secchi são mostradas na tabela a seguir (Tabela 1).

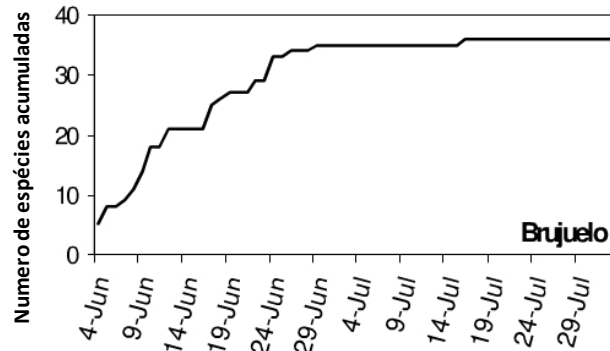


Figura 10: Número de espécies acumuladas de ciliados por tempo, após consecutivas diluições de amostras hipersalinas manipuladas em laboratório (modificado de GALOTTI et al.; 2010).

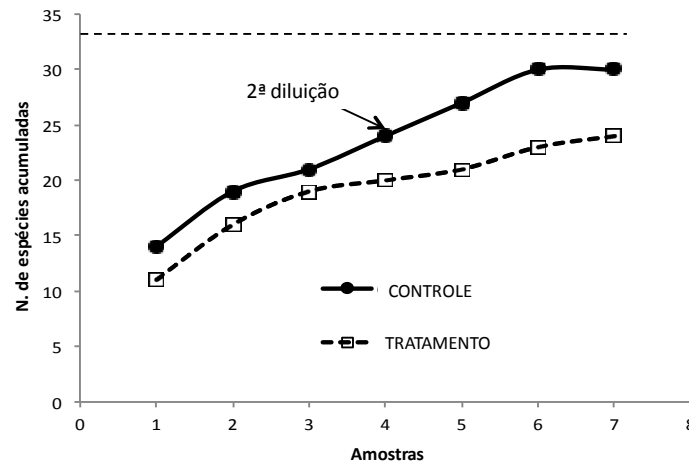


Figura 11: Número de espécies acumuladas de ciliados após o segundo pulso de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e sua respectiva diluição sinalizada com uma flecha. (modificado de PARRA et al., dados não publicados).

Tabela 1: Relação entre índice de estado trófico e três variáveis usadas para o cálculo do mesmo: Clorofila, Fósforo e/ou profundidade do disco de Secchi (fonte: Wikipedia)

Índice Trófico	Clorofila (mg L-1)	Fósforo (mg L-1)	Prof. Secchi (metros)	Classe Trófica (Carlson, 1977)
<30—40	0—2.6	0—12	>8—4	Oligotrófico
40—50	2.6—20	12—24	4—2	Mesotrófico
50—70	20—56	24—96	2—0.5	Eutrófico
70—100+	56—155+	96—384+	0,5—<0,25	Hipereutrófico

Outros índices menos utilizados no meio científico são aqueles que relacionam tipo/número de espécies de diferentes grupos de organismos com o estado biológico do corpo de água estudado. Entre eles está o índice de Thunmark (1949; ver MARGALEF, 1983), o qual utiliza dados do número de espécies clorococales pelo número de espécies de desmidiáceas e tem uma correlação positiva com o pH e com o grau de eutrofia. Por outro lado, o mesmo autor sugeriu uma relação

entre ordens de diatomáceas - neste caso, centrais e penais - para interpretar restos conservados de sedimentos, que também têm uma correlação positiva com o grau de trofia.

O índice composto, proposto por Nygaard (1949; ver RAWSON, 1956), também utiliza dados de espécies clorococales e centrais, acrescentando, além destas, o número de espécies de cianofitas e euglenofitas, todas somadas e logo divididas entre o número de espécies de desmidiáceas. Tal índice deve ser cuidadosamente aplicado e, em qualquer caso, evitado seu uso para lagos de zonas temperadas e tropicais. O índice de estado trófico de Karabin (1996) consiste no resultado da contagem de rotíferos em amostras originais. Quando o número de rotíferos fosse menor que 400 indivíduos por litro o sistema baixo análise seria denominado mesotrófico, enquanto entre 400 e 2000 seria eutrófico e mais de 2000 indivíduos por litro, hipereutrófico. Por último, o índice de Sladeczek (1998) utiliza a relação entre gêneros da família Brachionidae, mais concretamente, entre o número de espécies diferentes de Brachionuss e Trichocercas.

Exceto Sladeczek, todos os outros índices propostos obrigam ao pesquisador à identificação em nível de espécies de suas amostras. Esta tarefa pode acarretar não só muitas horas de trabalho em laboratório, mas também anos para alcançar os resultados previstos. Fica patente, outra vez, a necessidade de técnicas automatizadas para a maior rapidez nos resultados, já que as contaminações antrópicas podem acontecer de forma muito rápida. Além disso, faz-se necessária a proposta de um índice mais completo, isto é, que incorpore uma comunidade indispensável para o funcionamento de toda a cadeia trófica, como é a comunidade microbiana.

Com isso, propõe-se um maior esforço por parte da comunidade científica dedicada ao estudo de sistemas aquáticos visando à criação de um novo sistema de identificação do estado trófico das águas, baseado no espectro de tamanhos da comunidade microbiana, mas especificamente no valor da reta do espectro, já que, teoricamente esta sofre alterações do tipo mostrado na Figura 12.

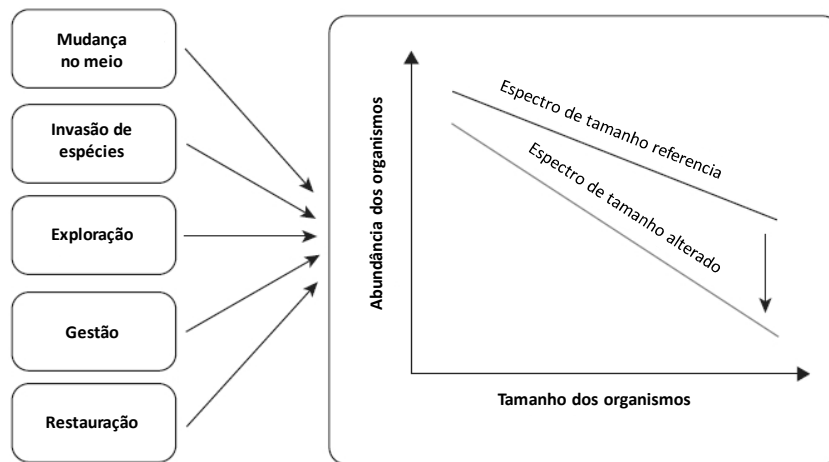


Figura 12: Gráfico publicado em 2010 por Petchey; Belgrano (modificada) onde mostram como a linha de tendência (reta) de um espectro de tamanhos pode alterar-se devido a mudanças ambientais, invasão de espécies, exploração, gestão e/ou restauração dos sistemas, bem como a forma de medir esta alteração segundo a medida quantitativa do desvio a partir do estado de referência.

Dar a conhecer um sistema de classificação de valores de retas dos espectros de tamanhos para cada tipo de sistema aquático, com o objetivo de identificar o estado trófico a partir do intervalo de valores destas pode ser uma tarefa árdua, mas que traria à luz um novo sistema de detecção de problemas ambientais muito mais profético e abrangente do que os que existem hoje.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente aos comentários oferecidos pelo Dr. F. Jiménez Gómez sobre a versão final deste capítulo. Alguns dos dados empregados neste capítulo foram apoiados financeiramente



por: John Ray Trust (Reino Unido); Ministerio de Innovación y Tecnología (Espanha); ajuda financeira à Dra. Gema Parra da Junta de Andalucía Modalidad Individual DGITE\_SV.PAI/IAC\_3/2011/11/13/mmel; e projeto de pesquisa REN2001-3441-CO2-01/HID (Espanha).

## REFERÊNCIAS

- ALONGI, D. Flagellates of benthic communities: characteristics and methods of study. In PATTERSON, D.; LARSEN, J. (Eds.). **The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates**. Oxford: Clarendon Press, 1991. p. 57-75.
- AZOVSKY, A. I. Size-dependent species-area relationships in benthos: is the world more diverse for microbes? **Ecography**, v. 25, p. 273–282. 2002.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends Ecol. Evol.**, v. 22, p. 148-155. 2007.
- CARLSON, R. E. A trophic state index for lakes. **Limnol Oceanogr.**, v. 22, p. 361-369. 1977.
- CARON, D. A.; GAST, R. J.; LIM, E. L.; DENNETT, M. R. Protistan community structure: molecular approaches for answering ecological questions. **Hydrobiologia**, v. 401, p. 215-227. 1999.
- CHEN, Q.; XU, R.; TAM, N.; CHEUNG, S.; SHIN, P. K. S. Use of ciliates (Protozoa: Ciliophora) as bioindicator to assess sediment quality of two constructed mangrove sewage treatment belts in Southern China. **Mar. Poll. Bull.**, v. 57, p. 689–694. 2008.
- CLEMENTS, W.; NEWMAN, M. C. **Community Ecotoxicology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.
- CUCCI, T. L.; SIERACKI, M. E. Effects of mismatched refractive indices in aquatic flow cytometry. **Cytometry**, v. 44, p. 173-178. 2001.
- DAWSON, S. C.; PACE, N. R. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 99, p. 8324–8329. 2002.
- EPSTEIN, S.; LÓPEZ-GARCÍA, P. Missing protists: A molecular prospective. **Biodiversity Conserv.**, v. 17, p. 261–276. 2008.
- ESTEBAN, G.; FINLAY, B. J. Conservation work is incomplete without cryptic biodiversity. **Nature**, v. 463, p. 293. 2010.
- ESTEBAN, G. F.; FINLAY, B. J. Cryptic freshwater ciliates in a hypersaline lagoon. **Protist.**, v. 154, p. 411-418. 2003.
- FENCHEL, T.; ESTEBAN, G. F.; FINLAY, B. J. Local versus global diversity of microorganisms: cryptic diversity of ciliated protozoa. **Oikos**, v. 80, p. 220-225. 1997.
- FENCHEL, T. Crystal ball. Where are all the species? **Environ. Microbiol.**, v. 7, p. 473-475. 2007.
- FENCHEL, T. **Ecology of Protozoa**. Berlin: Springer-Verlag, 1987.
- FINLAY, B. J.; ESTEBAN, G. F. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. **Biodivers Conserv.**, v. 7, p. 1163-1186. 1998.
- GADD, G. M.; GRIFFITHS, A. J. Microorganisms and heavy metal toxicity. **Microbial. Ecol**, v. 4, p. 303-317. 1997.
- GALOTTI, A. **Seasonal variation of the structure and function of the microbial communities in the Alto Guadalquivir hypersaline systems (Spain)**. 2010. Ph.D. (Dissertation), Universidad de Jaén, Jaén, 2010.
- GALOTTI, A.; ESTEBAN, G.; FINLAY, B.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, F.; GUERRERO, F. Riqueza específica de protozoos ciliados em las salinas de interior del alto Guadalquivir (Jaén, España). **El Alfolí**, v. 7, p. 18-20. 2010.
- GALOTTI, A.; FINLAY, B.; JIMÉNEZ-GÓMEZ, F.; GUERRERO, F.; ESTEBAN, G. Most ciliated protozoa in extreme environments are cryptic in the seed-bank. **Aquat Microb Ecol**, v. 72, p. 187-193. 2014.

- GONZÁLEZ, A. M.; BOMIQUEL, S.; DÍAZ, S.; ORTEGA, R.; GUTIÉRREZ, J. C. Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. **Cell Biol. Int.**, v. 29, p. 119-126. 2005.
- GUERRERO, F.; ORTEGA, F.; PARRA, G.; CANO, E.; CANO, A.; GARCÍA, R.; CARREIRA, J. A. Efectos ecológicos de la intensificación del cultivo del olivar en la comarca del Alto Guadalquivir: repercusiones sobre la diversidad. In: ANTA, J. L.; PALACIOS, J. (Eds.). **La cultura del aceite en Andalucía. La tradición frente a la modernidad**. Jaén: Fundación Machado, 2003. p. 53- 63.
- HAMMER, U. T. The saline lakes of Sakkatchewan. III. Chemical characterization. **Internationale Revue der Gesamten Hydrologie**, v. 63, p. 311-335. 1978.
- HAPPEY-WOOD, C. M. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: SANDGREN, C. D. (Ed.) **Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 175–226.
- HUBER, W. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p. 1865–1881. 1993.
- JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **Brit. Med. Bull.**, v. 68, p. 167–182. 2003.
- JENNINGS, S.; BLANCHARD, J. L. Fish abundance with no fishing: predictions based on macroecological theory. **J. Anim. Ecol.**, v. 73, p. 632–642. 2004.
- JENNINGS, S.; PINNEGAR, J. K.; POLUNIN, N. V. C.; WARR, K. J. Linking size-based and trophic analyses of benthic community structure. **Mar. Ecol.-Prog. Ser.**, v. 226, p. 77-85. 2002.
- KERR, S. R. A simulation model of Lake Trout growth. **J. Fisher Resear. Board Canada**, v. 28, p. 815-819. 1971.
- KERR, S. R.; DICKIE, L. M. **The biomass spectrum: a predator prey theory of aquatic production**. New York: Columbia University Press, 2001.
- LI, W. K. W. Phytoplankton biomass and chlorophyll concentration across the North Atlantic. **Scientia Marina**, v. 58, p. 67-79. 1994.
- MARGALEF, R. **Limnología**. Barcelona: Omega, 1983.
- MULDER, C.; ELSER, J. Soil acidity, ecological stoichiometry and allometric scaling in grassland food webs. **Global Change Biol**, v. 15, p. 2730–2738. 2009.
- NAGATA, T. et al. Autotrophic picoplankton in southern Lake Baikal: abundance, growth and grazing mortality during summer. **J. Plankton Res.**, v. 16, p. 945–959. 1994.
- NAUMANN, E. Nagra synpunkter angående limnoplanktons okologi med sarskild hansyn till fytoplankton. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 13, p. 129–163. 1919.
- NRIAGU, J. O. History of global metal pollution. **Science**, v. 272, p. 223–224. 1996.
- PETCHEY, O. L.; BELGRANO, A. Body-size distributions and size-spectra: universal indicators of ecological status? **Biol. Lett.**, 05 May 2010. Disponível em: <<http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/early/2010/04/30/rsbl.2010.0240.full.pdf+html>>. Acesso em: 01 out. 2014.
- PLATT, T. Flow cytometry in Oceanography. **Cytometry**, v. 10, p. 500. 1989.
- POR, F. D. A classification of hypersaline waters based on trophic criteria. **Marine Ecology**, v. 1, p. 121-131. 1980.
- RACY, F.; GODINHO, M. J. L.; REGALI-SELEGHIM, M. H.; BOSSOLAN, N. R. S.; FERRARI, A. C.; LUCCA, J. V. Assessment of the applicability of morphological and size diversity indices to bacterial populations of reservoirs in different trophic states. **Acta Limnol. Bras.**, v. 17, p. 395-408. 2005.
- RAWSON, D. Algal indicators of trophic lake types. **Limnol. Oceanogr.**, v. 1, p. 18-25. 1956.
- ROCHA-OLIVARES, A.; FLEEGER, J. W.; FOLTZ, D. W. Differential tolerance among cryptic species: a potential cause of pollutant-related reductions in genetic diversity. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 23, p. 2132-2137. 2004.

- RODRÍGUEZ, J.; LI, W. K. W. **The size structure and metabolism of the pelagic ecosystem**. Barcelona: Scientia Marina, 1994.
- ROJO, C.; RODRÍGUEZ, J. Seasonal variability of phytoplankton size structure in a hypertrophic lake. **J. Plankton Res.**, v. 16, p. 317-335. 1994.
- SEMOVSKI, S. V.; MOGILEV, N. Y. U.; SHERSTYANKIN, P. P. Lake Baikal ice: analysis of AVHRR imagery and simulation of under-ice phytoplankton bloom. **J. Mar. Sys.**, v. 27, p. 117–130. 2000.
- SHELDON, R. W.; PRAKASH, A.; SUTCLIFFE, W. H. Jr. The size distribution of particles in the ocean. **Limnol. Oceanogr.**, v. 17, p. 327-340. 1972.
- SHIN, Y. J.; ROCHET, M. J.; JENNINGS, S.; FIELD, J. G.; GISLASON, H. Using size-based indicators to evaluate the ecosystem effects of fishing. **ICES J. Mar. Sci.**, v. 62, p. 384–396. 2005.
- SIEBURTH, J. M.; SMETACEK, V.; LENZ, J. Pelagic Ecosystem Structure: Heterotrophic Compartments of the Plankton and Their Relationship to Plankton Size Fractions. **Limnol. Oceanogr.**, v. 23, p. 1256-1263. 1978.
- SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.
- SOROKIN, Y. I. **Aquatic Microbial Ecology: a textbook for students in environmental sciences**. Leiden: Backhuys Publishers, 1999.
- SPRULES, W. G.; MUNAWAR, M. Plankton size spectra in relation to ecosystem productivity, size and perturbation. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 43, p. 1789-1794. 1986.
- STOECK, T.; STOCK, A. The protistan gap in the eukaryotic tree of life. **Palaeodiversity**, v. 3, p. 151-154. 2010.
- VELHO, L. F. M.; PEREIRA, D. G.; PAGIORO, T. A.; SANTOS, V. D.; PERENHA, M. C. Z.; LANSAC-TÖHA, F. A. Abundance, biomass and size structure of planktonic ciliates in reservoirs with distinct trophic states. **Acta Limnol. Bras.**, v. 17, p. 361-371. 2005.