UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

JULIANA TULIO

USO DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA E DO SEDIMENTO CONTAMINADOS POR EFLUENTES DE ESGOTO DOMÉSTICO

DISSERTAÇÃO

CURITIBA
2014

JULIANA TULIO

USO DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA E DO SEDIMENTO CONTAMINADOS POR EFLUENTES DE ESGOTO DOMÉSTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Curitiba, como requisito parcial para a obtenção do título de "Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental".
Área de concentração: Avaliação de Bacias Hidrográficas.

Orientadora: Profª Drª Wanessa Algarte Ramsdorf

Coorientadora: Profª Drª Lúcia R. R. Martins

CURITIBA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T917u
2014

Tulio, Juliana
Uso de invertebrados aquáticos na avaliação da toxicidade da água e do sedimento contaminados por efluentes de esgoto doméstico / Juliana Tulio.-- 2014.
130 f.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2014
Bibliografia: f. 111-123

1. Águas residuais - Purificação - Curitiba (PR). 2. Águas superficiais. 3. Sedimentos fluviais. 4. Invertebrados aquáticos. 5. Testes de toxicidade aguda. 6. Testes de toxicidade crônica. 7. Fluorescência de raio X. 8. Toxicologia ambiental. 9. Tecnologia ambiental - Dissertações. I. Ramsdorf, Wanessa Algarte, orient. II. Martins, Lúcia Regina Rocha, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD 22 -- 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA TULIO

USO DE INVERTEBRADOS AQUÁTICOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ÁGUA E DO SEDIMENTO CONTAMINADOS POR EFLUENTES DE ESGOTO DOMÉSTICO

Dissertação aprovada como requisito para a obtenção do grau de mestre no programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora:

_____

Profª. Drª. Wanessa Algarte Ramsdorf
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Membro:

_____

Profº. Drº. Willian Gerson Matias
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC

Membro:

_____

Profª. Drª. Josmaria Lopes de Morais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Curitiba, 12 de março de 2014.

- *Documento assinado está arquivado na UTFPR.*

AGRADECIMENTOS

Essa caminhada foi bastante difícil. Foi um conjunto de aprendizados de gêneros variados. Além de adquirir grande conhecimento técnico, adquiri autoconhecimento. Nessa jornada eu errei, aprendi, perdi e ganhei! Foi recompensador, descobri que tinha laços de amizade indissolúveis com pessoas que tiveram a sabedoria de apenas aceitar meu momento, novas amizades adentraram minha vida, e como foram importantes! Outras, que já dava como perdidas, foram resgatadas, pelos nós do amor. Descobri também como todos temos a capacidade de superação, de se reerguer. Shiva nos guia em sua contínua *Tandava* de destruição e reconstrução, de transformação do universo. Essa dança cósmica simboliza o eterno ritmo de vida e morte que se abre em ciclos intermináveis, com base na existência física. "*Om Namah Shivaya"!*

Agradeço a todos, que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação. Agradeço aos espíritos de luz, e aos meus ancestrais que me guiaram até aqui. Aos meus pais por todo o investimento de ordem econômica, cultural, afetiva, ao longo da minha vida. Agradeço as minhas amigas de uma vida: Sabrina Scott, Maria Cheren, Helen Valência, Cris Koslinski, Shely Pazzini, Ariane Bravo e Carol Scremin, que, mesmo com as adversidades da vida, me tem em seus pensamentos elevados.

Agradecimentos "super" especiais: para as grandes amigas e parceiras, que estiveram comigo nos momentos mais difíceis dessa caminhada, e que estão hoje sempre próximas, que contribuíram diretamente para o desenvolvimento desse projeto: Thalita Copelli, Larissa Lopes Endlich, Débora Andreatta e Maiara Soares de Carvalho, Clarissa Fleury - muito obrigada pelos nossos cafés científicos, por todos os momentos que compartilhamos, pelas discussões científicas ou não e pela amizade!

Agradecimentos para as minhas sempre queridas "mães ecotoxicológicas" Marcia T. Bosa, Elenize A. Ferraz e Ana Márcia A. Nieweglowski, por me ensinarem muitos mais do que os livros de ecotoxicologia, por me transmitirem o conhecimento de bancada, pelo enorme carinho, pelas conversas sobre tudo que diz respeito à Ecotoxicologia.

Agradecimentos aos colegas de mestrado que acabaram tornando-se amigos, companheiros nas descobertas, nos momentos de fúria e de comemoração: Thalita Copeli, Geni Portella, Tamires Oliveira de Melo, Alejandra Ortiz Rico, Orlando Assis, Thayse Rochele, Adelson Raimundo Angelo, Paulo Barros, Tamires Oliveira, Francielle Lima. Agradecimentos a amiga e colega Ecotoxicóloga Silvia Haluch, por todo o apoio técnico, de toda natureza, do início ao fim, agradeço pela amizade, carinho, atenção e por compartilhar seu enorme conhecimento técnico.

Agradecimentos a Marcela Tiboni pela atenção, carinho, força, incentivo e grande ajuda com os testes estatísticos.

Agradecimentos ao grande amigo e colega Vini Richardi e a Debora Rebechi, por compartilharem conhecimentos, pelos momentos de descontração e amizade.

Agradecimentos ao amigo Paulo Bairros pelas análises de sedimento com a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva e pela ajuda na compreensão da técnica e na interpretação dos dados.

Agradecimentos ao amigo querido, o Geógrafo mestrando Ricardo. M. Pinheiro, pela amizade e pela ajuda com os mapas dos pontos de coleta e carta pedológica.

Agradecimentos colegas queridos do laboratório de Ecotox-UTFPR que viraram grandes amigos: Robson Carlos Oroski Portes e Gabriela Vale Silva. Agradecimentos ao Luiz Schroeder e Camilla Peit, pela grande ajuda com os testes de DBO e DQO, e análises físico-químicas em geral. Vocês são um barato!

Agradecimentos ao Luis Onisante pelo abstract, pelas trocas científicas e companheirismo juntamente com a Morgana Andreatta.

Agradecimentos a Marlene Soares pelo convite, parte da orientação e carinho. Agradecimentos a equipe do João Turin, equipe de Ciências do CAICÃO, e do CAIC Portinari: Fabiana Caetano, Francini e Claudia Juliana, e a colega Kelly Aguiar, pela força e preocupação sempre!

Agradecimentos as Biólogas Ana Márcia A. Nieweglowski, Ana Carolina Wosiack e Maria Elisa Ribas pelas cartas de recomendação, atenção e confiança.

Agradecimentos às professoras Doutoras Josmaria L. Moraes e Cláudia Xavier, por todas as observações e críticas colocadas na qualificação e pelo tempo que dedicaram para que meu projeto se tornasse uma dissertação.

Agradecimento grandioso a minha orientadora Wanessa, que pacientemente me ajudou muito, muito mesmo, principalmente nas épocas de maior estresse, com as revisões e com palavras como “agora está muito bom”, quando eu me sentia esgotada e triste. Obrigada professora sempre! Cada incentivo teve uma importância enorme no desenvolvimento dessa dissertação.

"O meio ambiente é encarado como se tratasse de partes separadas a serem exploradas por diferentes grupos de interesses. A visão fragmentária estende-se a sociedade dividida em nações, raças, religiões e grupos políticos (Fritjof Capra, O Tao da física).

TULIO, Juliana. **Uso de invertebrados aquáticos na avaliação da toxicidade da água e do sedimento contaminados por efluentes de esgoto doméstico.** 2014,141 f. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

RESUMO

No Brasil a lei ambiental vigente estabelece que os efluentes não possam causar efeitos agudo ou crônico para a biota dos corpos hídricos. No presente estudo foram avaliados os efeitos toxicológicos de amostras de água superficial e sedimento integral, de três locais três locais próximos a uma estação de tratamento de esgotos domésticos, coletadas em um rio na região de Curitiba, Estado do Paraná. As amostras foram submetidas a testes de toxicidade aguda e crônica, com os invertebrados aquáticos *D. magna e C. sancticaroli*. Além dos testes ecotoxicológicos, foram mensurados DBO, DQO, Fósforo Total, Nitrogênio Amoniacal Total, e Coliformes termotolerantes, com as amostras de água superficial. A composição do sedimento integral foi avaliada com a Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF), para a determinação dos elementos químicos presentes nestas amostras. Os resultados das análises de DBO, DQO, Fósforo total, Nitrogênio amoniacal total, e Coliformes termotolerantes, demonstraram que possivelmente ocorreu a contaminação da água superficial por esgoto doméstico, para as amostras analisadas nas 3 campanhas. A composição dos sedimentos é compatível com os tipos de solos presentes nos respectivos locais, porém houve variação quantitativa de elementos como o silício, alumínio e ferro no decorrer das campanhas, parecendo não influenciar diretamente nos testes. Os resultados dos testes para toxicidade aguda com matriz água e sedimento não expressaram toxicidade para *D. magna* e *C. sancticaroli*. Para os testes de toxicidade crônica com água superficial, o efeito observado foi o acréscimo da reprodução em *D. magna*. Aspectos como letalidade e a ausência do desenvolvimento da maturidade sexual foram verificados em amostras puras, provenientes do ponto próximo da ETE em todas as campanhas, após 10 dias de teste para *D. magna*. As amostras de sedimento integral não promoveram letalidade nos Daphnideos, entretanto ocorreu o acréscimo da reprodução. Para *C. sancticaroli*, exposto ao sedimento integral, ocorreu o desenvolvimento anormal do comprimento dos organismos, emergindo em adultos até o 8º dia de teste crônico.

Palavras-chave: Água superficial. Sedimento integral. *Daphnia magna*. *Chironomus sancticaroli*. Toxicidade aguda. Toxicidade crônica.

TULIO, Juliana. **Use of *aquatic invertebrates* in toxicity assessment of water and sediment contamined by wastewater domestic sewage**. 2014. 141 f. Qualification for Dissertation (Master's degree in Environmental Science and Technology) – Post-Graduate Program in Environmental Science and Technology, Federal University of Technology - Paraná, 2014.

ABSTRACT

In Brazil the environmental law in force establishes that wastewaters can not cause acute or chronic effect to the water bodies' biota. In the present study were evaluated the ecotoxicological effects of surface water and whole sediment samples, from three sites located nearby a wastewater treatment plant, that were collected from a river in the region of Curitiba, state of Paraná. The samples were submitted to acute and chronic toxicity tests, utilizing the aquatic invertebrates *D. magna* and *C. sancticaroli*. Besides the ecotoxicological tests, BOD, COD, Total Phosphorus, Total Nitrogen Ammonia and Thermotolerant coliforms were measured from the surface water samples. The whole sediment composition was evaluated by Energy-dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry (EDXRF) to determine chemical elements present in these samples. The BOD, COD, Total Phosphorus, Total Nitrogen ammonia, and Thermotolerant coliforms analysis' results possibly demonstrated surface water contamination by domestic sewage, for the samples analyzed in 3 campaigns. The sediment composition is compatible with the kinds of soils present in the respective sites, however there were quantitative variation of chemical elements during the campaigns, such as silicon, aluminum and iron, not seeming to directly influence the tests. The test results for acute toxicity with water and sediment matrix have not expressed toxicity to *D. magna* and *C. sancticaroli*. For chronic toxicity tests with surface water, the observed effect was the reproduction increase in *D. magna*. Aspects such as lethality and the absence of sexual maturity development were observed in pure samples accruing from the nearest point of the WTP in all campaigns, after 10 test days for *D. magna*. The whole sediment samples have not promoted lethality in Daphnideos, although a reproduction increase occurred. For *C. sancticaroli*, exposed to the whole sediment, an abnormal length development of the organisms occurred, emerging in adults until the 8th chronic test day.

Keywords: Surface water. Whole sediment. *Daphnia magna*. *Chironomus sancticaroli*. Acute toxicity. Chronic toxicity.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - ENSAIOS, MÉTODOS E REFERÊNCIAS DAS ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS COM A MATRIZ ÁGUA. 40
QUADRO 2 - RESUMO DOS MÉTODOS, ORGANISMOS E REFERÊNCIAS UTILIZADOS NOS TESTES ECOTOXICOLÓGICOS. 43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - *D. MAGNA* ADULTA COM FILHOTES MADUROS NA CÂMARA INCUBATÓRIA. 31
FIGURA 2 – CICLO DE VIDA DOS CHIRONOMIDEOS. 35
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS AMOSTRAIS. 36
FIGURA 4 - COLETA DE ÁGUA REALIZADA COM BALDE INOX. 37
FIGURA 5 - DETERMINAÇÃO DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO, PH E TEMPERATURA. 37
FIGURA 6 - ARMAZENAGEM E REFRIGERAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS EM CAMPO. 38
FIGURA 7 - SEDIMENTO COLETADO NA DRAGA. 39
FIGURA 8 - COLETA DE SEDIMENTO COM DRAGA VAN-VEEN, NO PRIMEIRO PONTO DE COLETA. 39
FIGURA 9 - INCUBAÇÃO DO TESTE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES APÓS 48 HORAS. 41
FIGURA 10 - TESTE POSITIVO PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES E POSITIVO PARA *E. COLI* 41
FIGURA 11 - CULTIVO DE *D. MAGNA* EM INCUBADORA. 44
FIGURA 12 - TESTES COM ENSAIO CRÔNICO MANTIDOS EM INCUBADORA DE CULTIVO, SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TEMPERATURA E FOTOPERÍODO. 48
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENHO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS CRÔNICOS COM *D. MAGNA*, 10 RÉPLICAS COM UM GRUPO CONTROLE DE COMPARAÇÃO, E 10 RÉPLICAS COM AMOSTRAS DE ÁGUA, ONDE CADA ORGANISMO FOI INSERIDO INDIVIDUALMENTE. 49
FIGURA 14 - RENOVAÇÃO DO M4 E CONTAGEM DOS FILHOTES NO ENSAIO CRÔNICO COM O AUXÍLIO DA PIPETA E “PUMP”. 50
FIGURA 15 - ORGANIZAÇÃO DA BANDEJA DE CULTIVO DOS ORGANISMOS DESTINADOS À PRODUÇÃO DE ORGANISMOS PARA TESTES. 52
FIGURA 16 – DETALHE DAS MASSAS RETIRADAS DO CULTIVO NA BANDEJA PARA O DESENVOLVIMENTO DE ORGANISMOS TESTE. 52
FIGURA 17 - PREPARAÇÃO DOS TESTES CRÔNICOS COM O SEDIMENTO, À ESQUERDA O GRUPO CONTROLE E A DIREITA UM DOS SEDIMENTOS TESTADOS. 55
FIGURA 18 - CARTA PEDOLÓGICA DO ESTADO DO PARANÁ. 64
FIGURA 19 – ÉPOCAS ONDE OCORRERAM AS 1ªS POSTURAS EM CADA TESTE. 70
FIGURA 20- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA PONTO 1, CAMPANHA 1 NO VERÃO. OS ASTERISCOS REPRESENTAM OUTLIERS, VALORES ATÍPICOS PARA A RELAÇÃO DOS DIAS DAS 1ªS POSTURAS E DOS TRATAMENTOS DAS CONCENTRAÇÕES ANALISADAS. 73
FIGURA 21 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA A AMOSTRA 2, CAMPANHA 1 NO VERÃO. 74
FIGURA 22 - ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 3, CAMPANHA 1 NO VERÃO. 75

FIGURA 23 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 1, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO A DATA DA 1ª POSTURA E O TRATAMENTO DE 0%. 76
FIGURA 24 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 2, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO A DATA DA 1ª POSTURA E O TRATAMENTO DE 0%. 76
FIGURA 25- ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 3, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO A DATA DA 1ª POSTURA E O TRATAMENTO DE 0%. 77
FIGURA 26- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 1, CAMPANHA 3 NO INVERNO. 78
FIGURA 27- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 2, CAMPANHA 3 NO INVERNO. 78
FIGURA 28- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA REFERENTE À DATA DA PRIMEIRA POSTURA, TRATAMENTOS PARA O PONTO 3, CAMPANHA 3 NO INVERNO. 79
FIGURA 29- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO, O PONTO 1, CAMPANHA 1 NO VERÃO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E O TRATAMENTO DE 75%. 81
FIGURA 30 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 2, CAMPANHA 1 NO VERÃO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E O TRATAMENTO DE 50%. 82
FIGURA 31- GRÁFICO NA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 3, CAMPANHA 1 NO VERÃO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E AOS TRATAMENTOS DE 25 E 75%. 83
FIGURA 32- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 1, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E OS TRATAMENTOS DE 0, 25, 50 E 75%. 84
FIGURA 33- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 2, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E AOS TRATAMENTOS DE 0, 25 E 50%. 85
FIGURA 34 - GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 3, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E AOS TRATAMENTOS DE 0, 10, 25, 50 E 100%. 85
FIGURA 35 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 1, CAMPANHA 3 NO INVERNO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA UM VALOR DISCREPANTE EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURA E O TRATAMENTO DE 0%. 86

FIGURA 36 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 3, CAMPANHA 3 NO INVERNO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E AOS TRATAMENTOS DE 0,10, 75 E 100%. 87
FIGURA 37- GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS POSTURAS POR TRATAMENTO PARA O PONTO 2, CAMPANHA 3 NO INVERNO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E AOS TRATAMENTOS DE 0, 10, 25 E 50%. 87
FIGURA 38– GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 1, CAMPANHA 1 NO VERÃO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA UM VALOR DISCREPANTE EM RELAÇÃO AO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES PRODUZIDOS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO DE 25%. 89
FIGURA 39 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 3, CAMPANHA 1 NO VERÃO. .89
FIGURA 40 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 2, CAMPANHA 1 NO VERÃO. .90
FIGURA 41– GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 1, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA UM VALORE DISCREPANTE DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES PRODUZIDOS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO DE 100%. 91
FIGURA 42 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 3, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE FILHOTES PRODUZIDOS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO DE 25%. 91
FIGURA 43 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 2, CAMPANHA 2 NO OUTONO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA UM VALOR DISCREPANTE DO NÚMERO DE FILHOTES PRODUZIDOS EM RELAÇÃO AO TRATAMENTO DE 10%.....92
FIGURA 44 – GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 1, CAMPANHA 3 NO INVERNO 93
FIGURA 45– GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO 3, CAMPANHA 3 NO INVERNO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA UM VALOR DISCREPANTE EM RELAÇÃO AO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES PRODUZIDOS E O TRATAMENTO DE 100%....93
FIGURA 46– GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES POR TRATAMENTO PARA O PONTO PARA O PONTO 2, CAMPANHA 3 NO INVERNO. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES PRODUZIDOS EM RELAÇÃO AOS TRATAMENTOS DE 25 E 50%.....94
FIGURA 47– GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DA DATA DA 1ª POSTURA PARA OS 3 PONTOS E GRUPO CONTROLE. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO À DATA DA 1ª POSTURA EM RELAÇÃO AOS PONTOS 2 E 3. 100
FIGURA 48- ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE POSTURAS REALIZADAS PARA OS 3 PONTOS E GRUPO CONTROLE. O ASTERISCO (*) REPRESENTA

VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE POSTURAS E OS PONTOS 1 E 2. 101
FIGURA 49– GRÁFICO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO MÉDIO DE FILHOTES PARA OS 3 PONTOS DE COLETA E GRUPO CONTROLE. O ASTERISCO (*) REPRESENTA VALORES DISCREPANTES EM RELAÇÃO AO NÚMERO MÉDIO DOS FILHOTES PRODUZIDOS E OS PONTOS 1 E 2. 103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AVALIADOS *IN SITU*. 58
TABELA 2 - ENSAIOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO PONTO 1. 59
TABELA 3 - ENSAIOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO PONTO 2. 59
TABELA 4 -ENSAIOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO PONTO 3. 60
TABELA 5 - ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DE ÁGUA, PONTO DO SEDIMENTO REFERÊNCIA (P4). 61
TABELA 6 - ENSAIOS PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES E PRESENÇA DE *E. coli* NAS AMOSTRAS. 61
TABELA 7 - ANÁLISES DE SEDIMENTO QUALITATIVAS. 63
TABELA 8 - TOTAL DE FILHOTES E MÉDIA DE FILHOTES/INDIVÍDUO NOS ENSAIOS COM GRUPOS CONTROLES. 70

TABELA 9 - TESTES DESENVOLVIDOS COM O SEDIMENTO REFERÊNCIA PARA A VALIDAÇÃO DOS ENSAIOS CRÔNICOS COM AMOSTRAS DE SEDIMENTO COM O ORGANISMO *D. magna*. 71
TABELA 10 - RESUMO DOS RESULTADOS DOS TESTES DESENVOLVIDOS COM AS AMOSTRAS DE SEDIMENTO DAS TRÊS CAMPANHAS PARA *C. sancticaroli*. A MÉDIA REFERE-SE AO COMPRIMENTO.....106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo
CE(I)	Concentração efetiva inicial
CE50	Concentração derivada estatisticamente que causa efeito, em porcentagem de imobilidade, em 50% dos organismos
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CHU	Meio de cultura para algas clorófitas
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CV	Coeficiente de Variação
DBO_5	Demanda Bioquímica de Oxigênio medida após 5 dias de incubação
DP	Desvio-padrão
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETED	Estação de Tratamento de Esgoto Doméstico
FATMA	Fundação do Meio Ambiente
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental
FT	Fator de Toxicidade
FT_D	Fator de Toxicidade para *Daphnia magna*
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
INEMA	Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
M4	Água de cultivo artificial, com formulação conhecida e padronizada pela ABNT/NBR 127-13/2009, que subsidia as necessidades vitais das *D. magna* cultivas em laboratório.

NAT	Nitrogênio amoniacal total
OD	Oxigênio Dissolvido
OECD	Organization for Economic Coperation and Devepolment
pH	Potencial Hidrogeniônico
PT	Fósforo Total
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
US.EPA	United States Enviromental Protection Agency
T	Temperatura
VC	Valor Crônico
VM	Valor Médio

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 11
1.1 OBJETIVO GERAL 12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12
2. REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1 ECOTOXICOLOGIA E TOXICOLOGIA AMBIENTAL 13
2.2 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES 14
2.3 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS 14
2.4 ESCOLHA DAS ANÁLISES TOXICOLÓGICAS E ORGANISMOS INDICADORES 16
2.5 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA NO ESTADO DO PARANÁ ... 16
2.6 LEGISLAÇÕES FEDERAIS E ESTADUAIS VOLTADAS À ECOTOXICOLOGIA 18
2.7 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS 20
2.8 TESTE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES 22
2.9 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) 22
2.10 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA COM ÁGUAS RECEPTORAS E DE EFLUENTES DE ETED 23
2.10.1 Caracterização dos organismos de interesse para este estudo 30
2.10.1.1 Família Daphniidae 30
2.10.1.2 Espécie *Daphnia magna* (Straus, 1820) 30
2.10.1.3 Família Chironomidae 33
2.10.1.4 *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981) 33
3 MATERIAIS E MÉTODOS 36
3.1 COLETAS 36
3.2 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS 40
3.3 ANÁLISE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES 40
3.4 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) COM A MATRIZ SEDIMENTO 42
3.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS 42
3.5.1 Cultivo de *D. magna* 43
3.5.1.1 Teste de sensibilidade com *D. magna* 45
3.5.1.2 Ensaio agudo com *D. magna* com a matriz água 46
3.5.1.3 Ensaio agudo com *D. magna* com a matriz sedimento 47
3.5.1.4 Ensaio crônico com *D. magna* com a matriz água 47
3.5.1.5 Ensaio crônico com *D. magna* com a matriz sedimento 50
3.5.2 Cultivo do *C. sancticaroli* 51
3.5.2.1 Teste de sensibilidade para *C. sancticaroli* 53
3.5.2.2 Ensaio agudo com *C. sancticaroli* com a matriz sedimento 53

3.5.2.3 Ensaio crônico com amostras de sedimento com *C. sancticaroli* 54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 56
4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REGIÃO ANALISADA 56
4.2 OD, TEMPERATURA DA ÁGUA E PH.....57
4.3 DQO, DBO_5, PT E NAT 59
4.3 COLIFORMES TERMOTOLERANTES 61
4.4 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) 62
4.5 TOXICIDADE AGUDA PARA *D. magna*.....65
4.5.1 Sensibilidade ao dicromato de potássio 65
4.5.2 Toxicidade aguda para a matriz água 66
4.5.2.1 Testes de toxicidade aguda com amostras de água preservadas por refrigeração e congelamento.....67
4.5.3 Toxicidade aguda para a matriz sedimento.....67
4.6 ENSAIOS CRÔNICOS COM *D. magna* 69
4.6.1 Validação do ensaio crônico com a matriz água 69
4.6.2 Validação do ensaio crônico com a matriz sedimento.....70
4.7 Resultados para toxicidade crônica com *D. magna* 71
4.7.1 Testes de normalidade 71
4.7.2 Testes de Kruskall-Walis com a matriz água.....72
4.7.2.1 Dia da primeira postura por tratamento 72
4.7.2.2 Número de posturas por tratamento.....80
4.7.2.3 Média (taxa) de filhotes produzidos por matriz em cada postura 88
4.7.3 Testes de Kruskall-Walis com a matriz sedimento 99
4.7.3.1 1ª Postura.....99
4.7.3.2 Número de posturas 100
4.7.3.3 Média (taxa) de número de filhotes produzidos.....102
4.8 TESTES COM *C. sancticaroli*.....103
4.8.2 Teste agudo com matriz sedimento com *C. sancticaroli* 104
4.8.3 Resultados para os testes crônicos com *C. sancticaroli*.....106
5 CONCLUSÕES 109
6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 111
REFERÊNCIAS.....112
APÊNDICE A 125
ANEXO A.....127
ANEXO B.....129
ANEXO C.....131

1 INTRODUÇÃO

O processamento industrial e o desenvolvimento urbano culminaram com a produção de fluxos ascendentes de poluentes de tipologias diversificadas. A disposição desse material nos ambientes terrestres e aquáticos, de forma bruta ou ineficientemente tratada, protagonizam um cenário de degradação do ar, solo, água e sedimentos. Dentre as fontes poluidoras, destacam-se os efluentes de esgoto doméstico, como representantes de grande parte dessa contaminação.

Esse tipo de efluente deveria ser captado por redes coletoras de esgoto e tratado em estações de tratamento de esgotos domésticos (ETED), porém, existem muitas instalações no município de Curitiba que não estão ligadas a rede coletora, gerando a contaminação das águas superficiais e sedimentos dos ecossistemas aquáticos.

Um grande contingente dos efluentes domésticos é constituído por matéria orgânica, nutrientes, metais, nano partículas e hormônios que ingressam nos sistemas de drenagem, e corroboram para a perda gradual da qualidade hídrica. Esse fato inviabiliza os processos naturais de autodepuração dos corpos receptores.

Devido à complexidade desses efluentes de esgotos domésticos, a caracterização dos aspectos físicos e químicos, de uma amostra de água superficial, muitas vezes é insuficiente para determinar a existência de um agente tóxico para um organismo ou um ecossistema. Os métodos físicos e químicos são incapazes de detectar todas as substâncias ou alterações nos ambientes límnicos, principalmente quando presentes em baixas concentrações. Nesse contexto, os testes ecotoxicológicos são indispensáveis para prevenir a degradação ambiental, pois os organismos utilizados nos testes, os bioindicadores, reagem à exposição, curta ou prolongada, às amostras de água superficial e sedimentos contaminados, denunciando a deterioração da qualidade ambiental através de alterações fisiológicas.

As publicações internacionais relacionando testes ecotoxicológicos e efluentes são crescentes. Contudo, há poucas referências que abordam diretamente a ecotoxicologia dos efluentes de esgoto domésticos e de ETED presentes em águas superficiais e nos sedimentos dos rios. Há pouco conhecimento a respeito

dos efeitos ecotoxicológicos crônicos da exposição de *D. magna* e *C. sancticaroli*, em relação aos efluentes de estações de esgoto doméstico.

Considerando a insuficiência de conhecimento da ação dos efluentes de esgoto domésticos frente aos corpos receptores de água superficial, e a necessidade do monitoramento da qualidade das águas superficiais, o presente estudo propõe a análise ecotoxicológica da água superficial e do sedimento integral de um trecho do rio Atuba, na região de Curitiba, empregando os bioindicadores *D. magna* e *C. sancticaroli*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma avaliação ecotoxicológica da água superficial e do sedimento integral, coletados no rio Atuba - PR, utilizando os organismos indicadores *Daphnia magna e Chironomus sancticaroli*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a toxicidade aguda e crônica com *Daphnia magna*, expostas a amostras de água superficial e sedimento integral;
2. Avaliar a toxicidade aguda e crônica com *Chironomus sancticaroli* expostos a amostras de sedimento integral;
3. Caracterizar amostras de água superficial quanto à Oxigênio Dissolvido, pH, Temperatura da água, Demanda Química de Oxigênio, Demanda Bioquímica de Oxigênio, Nitrogênio amoniacal total, Fósforo total e Coliformes termotolerantes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ECOTOXICOLOGIA E TOXICOLOGIA AMBIENTAL

Não há um consenso fechado entre os termos Ecotoxicologia e Toxicologia Ambiental. Existem vários conceitos que foram modificados com o passar do tempo, outros conceitos surgiram na tentativa de esclarecer e complementar pontos de vistas diferentes.

A Ecotoxicologia, originalmente definida por René Truhaut (1969), é o ramo da toxicologia que estuda o efeito de substâncias naturais ou sintéticas, nos organismos que constituem os ecossistemas (FORBES; FORBES, 1994, RAND, 1995), incluem-se nesse grupo vegetais, microorganismos e animais, inclusive os organismos humanos (FORBES; FORBES, 1994). Surgiram novas definições como a de estudo dos poluentes nos ecossistemas, estabelecida por Moriarty, em 1983, estudo dos efeitos dos poluentes no meio ambiente, e na biota que ali habita, estabelecida por Butler, em 1984 (FORBES; FORBES, 1994). Em 1991, Hayes tornou a discussão ainda mais confusa conceituando o termo Toxicologia Ambiental como todos os aspectos da Toxicologia voltados aos organismos, exceto aos organismos humanos e os animais domésticos, e Toxicologia Ecológica como o estudo de todos os toxicantes produzidos pelos organismos vivos, e as relações ecológicas possibilitadas por estes toxicantes. Também em 1991, Klaassen e Eaton incluiram a Ecotoxicologia como uma área da uma área especializada dentro da Toxicologia Ambiental, cujo enfoque são os impactos das substâncias nas dinâmicas das populações, dentro dos ecossistemas (FORBES; FORBES, 1994).

Chasin e Pedrozo (2004) assim como Fernicola et al. (2004) descrevem que a Toxicologia Ambiental e a Ecotoxicologia são termos utilizados para apresentar o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos por substâncias naturais ou sintéticas, liberadas no meio ambiente. Para estes autores, a Toxicologia Ambiental designa estudos voltados para organismos humanos, já a Ecotoxicologia contempla os efeitos frente às populações, comunidades, ecossistemas, e seus componentes, excluindo-se os humanos. Chasin e Pedrozo (2004) também ressaltam que os organismos humanos não estão isolados de seu

ambiente natural, há poucos ecossistemas em que não há a interação dos organismos humanos.

Independentemente do termo escolhido, ambos, Toxicologia Ambiental ou Ecotoxicologia, preocupam-se em estudar as ações e os efeitos nocivos de substâncias químicas, na maioria das vezes de origem antropogênica, nos ecossistemas (CHASIN;PEDROZO, 2004).

2.2 BIOINDICADORES E BIOMARCADORES

Organismos representativos, que podem ser utilizados como bioindicadores, são os principais receptores de contaminantes provenientes de descargas de efluentes industriais, emitidos no ar ou depositados nos solos (RAND, 1995; HOFFMAN et al., 2003; COSTA et al., 2008). Biomarcadores as são respostas moleculares, fisiológicas ou bioquímicas desses organismos, que foram induzidos por um ou uma combinação de xenobióticos (DEPLEDGE, 1993).

Bioindicadores são organismos ou comunidades de organismos que expressam reações detectáveis e quantificáveis, frente aos contaminantes físicos e químicos, gerando um panorama das condições gerais de um ambiente, ou como esse altera-se ao longo de um período específico. Um bom bioindicador deve dar uma resposta detectável frente a uma exposição (PIVETTA et al., 2001; BUSS et al., 2003; AZEVEDO; CHASIN, 2004; MENDONÇA et al., 2008; PARVEZ et al., 2006; HOLT; MILLER, 2013). Biomarcadores, ou *"end points*," podem ser consideradas como a reação, a resposta do organismo frente a um contaminante como um todo, expressando alterações no organismo, nas células, em seus componentes ou processos químicos (WALKER et al., 2004).

2.3 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

As análises toxicológicas são testes que utilizam respostas fisiológicas de um organismo, de forma padronizada, para a detecção de substâncias que atuam

como estressores específicos, produzindo tais respostas (BUSS et al., 2003; HOFFMAN et al., 2003; KNIE; LOPES, 2004; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; PARVEZ et al., 2006; ARAGÃO; ARAÚJO, 2008). Os testes são usados para avaliar as concentrações dos xenobióticos em uma duração definida da exposição requerida para causar um efeito danoso ao organismo. São desenvolvidos de forma controlada, e podem estar especificados em normas técnicas (AZEVEDO; CHASIN, 2004; ARAGÃO; ARAÚJO, 2008).

Através dessas metodologias é possível estimar a toxicidade aguda ou crônica, ou seja, se os efeitos ocorrem após curtos, médios e longos tempos de exposição (BURTON, 1992; BURTON, 2002; HOFFMAN et al., 2003; OECD, 2008).

O efeito agudo ocorre durante ou após a exposição de períodos curtos de tempo, o meio em que os organismos são expostos é o mesmo do início ao fim do teste, encerra-se geralmente após um período de 14 a 96 horas. O efeito crônico é observado após um período de exposição onde o organismo exposto passa por diferentes etapas do seu ciclo de vida, desenvolvendo-se dos momentos iniciais, fase adulta e reprodutiva. O meio em que os organismos são expostos pode ser trocado no decorrer do desenvolvimento dos testes (ADAMS; ROWLAND, 2003). Testes negativos de toxicidade aguda, de curta duração, não excluem que a amostra não seja tóxica, apenas atestam que naquele período o bioindicador não expressou os efeitos letais da toxicidade.

Não existem indicadores biológicos de igual significado para a avaliação da exposição aos diferentes xenobióticos ou um único teste sensível a todas as substâncias tóxicas (US.EPA, 1999; PIVETTA et al., 2001; HOFFMAN, 2003; REN; FRYMIER, 2003; NASCIMENTO, 2008). Sendo assim, existe a necessidade de se estabelecer indicadores ambientais apropriados para a avaliação de matrizes específicas. Os bioindicadores devem ser escolhidos sobre os critérios de relevância toxicológica e suscetibilidade aos agentes químicos estudados (HOFFMAN et al., 2003; KNIE; LOPES, 2004; WALKER et al., 2004; BLAISE; FÉRARD, 2005; COSTA et al., 2008).

2.4 ESCOLHA DAS ANÁLISES TOXICOLÓGICAS E ORGANISMOS INDICADORES

A seleção do tipo de teste toxicológico vai depender dos objetivos da análise, dos recursos disponíveis, das exigências dos organismos teste, e das características do efluente (RAND, 1995; US.EPA, 2002; HOFFMAN et al., 2003; KNIE; LOPES, 2004; WALKER et al.; 2004, MAGALHAES; FERRÃO FLHO, 2008). Uma bateria de análises toxicológicas incluem organismos de níveis tróficos distintos, de estados crescentes de organização biológica como bactérias, algas, crustáceos e peixes (REN; FRYMIER, 2003). Além da representatividade ecológica, outra importante correlação na seleção do tipo do teste é que os resultados devem ser complementares entre os indicadores (HOFFMAN et al., 2003; WALKER et al., 2004; REN; FRYMIER, 2003; BEKETOV; LIESS, 2012).

2.5 MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA NO ESTADO DO PARANÁ

No Brasil, a partir de 1975, foram desenvolvidas e adaptadas várias metodologias de ensaios de toxicidade aguda e crônica, baseadas especialmente nas normativas alemãs. Atualmente, são testes de rotina no monitoramento dos corpos hídricos utilizados pelos órgãos ambientais estaduais, como no Instituto Ambiental do Paraná (IAP); Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), no Rio Grande do Sul; Fundação do Meio Ambiente (FATMA), em Santa Catarina; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB); Instituto Estadual do Ambiente (INEA), no Rio de Janeiro e Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA), na Bahia.

No Paraná e em Santa Catarina, a partir de 1992, através de um convênio com a Agência Técnica Alemã (GTZ), foram implementados métodos de testes de toxicidade para a avaliação toxicológica de efluentes e águas superficiais. Na sequência, o monitoramento da qualidade das águas no Estado do Paraná, utilizando a avaliação integrada dos parâmetros físicos e químicos, microbiológicos associados aos ensaios toxicológicos, foi efetivamente inserido dentro do escopo de análises do programa de monitoramento das águas. Os resultados desse programa

de monitoramento geraram dados para que fosse desenvolvida uma proposta de lei, onde constassem os limites de toxicidade, baseados nos dados obtidos desde o início do programa de monitoramento da qualidade das águas (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Em 2002 a FATMA (Fundação do Meio Ambiente – SC) criou a Portaria nº 17 (FATMA, 2002) que estabeleceu limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens.

Apenas em 2006 o Paraná criou a Portaria n°19 (PARANÁ, 2006), onde estabeleceu-se o “Sistema de automonitoramento de efluentes das atividades poluidoras instaladas, ou que venham a ser instaladas”, no Estado do Paraná. Iniciaram-se o controle e acompanhamento periódicos dos sistemas de tratamento de efluentes líquidos, de acordo com cada tipo de empreendimento, através de coleta e análise do efluente final, considerando a relação de limites de toxicidade dos bioindicadores. Já a Resolução nº 81 (PARANÁ, 2010), apresenta-se como uma normativa mais específica, onde são relacionados os parâmetros físicos e químicos, microbiológicos e toxicológicos, com categorias de diversas tipologias de efluentes de uma forma mais clara, com fatores de toxicidade e bioindicadores, associados à periodicidade das coletas e análises. Os efluentes provenientes das ETES (Efluentes de Tratamento de Esgoto Sanitário) não foram categorizados, a própria Resolução propôs que fossem avaliados durante um período mínimo de dois anos, para que fossem definidos padrões e limites máximos de toxicidade, através de uma norma complementar. A competência dessa avaliação seria de responsabilidade do órgão ambiental vigente, que definiria os limites em conjunto com a operadora de saneamento, e por fim, seriam apresentados os resultados para o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA-PR), em um ciclo de 6 meses a cada dois anos, concluindo com a definição dos limites.

Em 2011 foi desenvolvida a Resolução nº 430 (BRASIL, 2011), que modificou a Resolução nº 357 (BRASIL, 2005), no sentido de complementá-la e alterá-la, além de dispor sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Ambas as Resoluções propõe que o órgão ambiental local use dos seus critérios toxicológicos, ou, na inexistência desses, utilize as diretrizes da própria Resolução nº 430 (BRASIL, 2011).

Atualmente no Paraná, através da Resolução nº81 (PARANÁ, 2010), recomenda-se o uso do *Vibrio fischeri* - ABNT/NBR15411: 2006, da *Desmodesmus*

subspicatus - ABNT/NBR 12648:2011, - e da *Ceriodaphnia sp*. e *Daphnia magna* - ABNT/NBR 12713:2009. Ambos apresentam a biologia bem conhecida, e são comprovadamente excelentes bioindicadores para várias tipologias de efluentes e para o monitoramento das águas superficiais (PIVETTA et al., 2001; AMORIM, 2003; HOFFMAN et al., 2003; KNIE; LOPES, 2004; WALKER et al., 2004; AZEVEDO; CHASIN, 2004; BLAISE; FÉRARD, 2005). Todos estes testes utilizam as normas técnicas brasileiras em vigor para o monitoramento das águas continentais no Brasil. Mesmo não havendo organismos indicados para o monitoramento de sedimentos das águas continentais na Resolução nº 81 (PARANÁ, 2010), o artigo nº 18, do capítulo 3º, institui que outros testes podem ser utilizados, desde que sejam indicados por uma entidade normalizadora, reconhecida e aprovada ou indicados pelo órgão gestor. Portanto, testes ainda não normatizados no Brasil, como o teste crônico com *D. magna* para a avaliação da qualidade das águas continentais e os testes com organismos da família Chironomidae, poderiam ser utilizados no biomonitoramento de sedimentos de águas continentais.

2.6 LEGISLAÇÕES FEDERAIS E ESTADUAIS VOLTADAS À ECOTOXICOLOGIA

No Brasil, a Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), estabelece condições e padrões de emissão, adotados para o controle de lançamentos de efluentes no corpo receptor. Estabelece também que os órgãos ambientais competentes podem tornar as condições supracitadas mais restritivas tendo em vista as condições locais, mediante fundamentação técnica.

Com relação à ecotoxicologia, o Capítulo III da Seção I, Artigo 8º, § 4º, trata das condições de padrões de qualidade das águas.

> "As possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos" (BRASIL, 2005).

O Capítulo III, Seção II, Artigo 14, item I, trata das condições da qualidade das águas doces de classe 1. Uma das condições observadas é a execução dos testes ecotoxicológicos e o resultado negativo para efeitos crônicos (BRASIL, 2005).

Para águas doces de classe 2, no que tange ao resultado negativo para efeitos crônicos, aplicam-se as mesmas condições e padrões da classe 1 (BRASIL, 2005).

O Capítulo III, Seção II, Artigo nº16, item I, fala sobre as águas doces de classe 3, onde também não se admitem efeitos ecotoxicológicos (BRASIL, 2005).

O Capítulo IV aborda as condições e padrões de lançamentos de efluentes. O Artigo nº 34, § 1º e 2 º , menciona que efluentes de qualquer fonte poluidora, poderão ser lançados nos corpos hídricos, direta ou indiretamente, desde que obedeça a condição de não promover efeito tóxico aos organismos aquáticos do corpo receptor. Os critérios de ecotoxicidade e toxicidade devem ser estabelecidos pelo órgão ambiental competente ou embasar-se em ensaios padronizados aplicados entre organismos aquáticos e o efluente em questão (BRASIL, 2005).

A resolução CONAMA nº 430, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357. A Seção III, Artigo 23, define que os órgãos ambientais competentes podem estabelecer critérios para realizar testes ecotoxicológicos em efluentes de sistemas de tratamento de esgotos sanitários, caso esses interfiram no corpo receptor. No inciso 1º consta que o objetivo dos testes é também subsidiar ações de gestão na bacia contribuinte, com a intenção de controlar as fontes poluidoras. O Artigo 24 determina a necessidade de um sistema de automonitoramento para controle e acompanhamento periódico dos efluentes (BRASIL, 2011). Dessa forma, os testes ecotoxicológicos são fundamentais como mecanismos de monitoramento das fontes poluidoras, da qualidade das águas superficiais e também do grau do impacto que uma bacia pode sofrer.

Nas esferas estaduais, existem normativas específicas que estabelecem ensaios toxicológicos nos diferentes estados da União, como a: NT 213 R-4 (PRONOL, 1990), RESOLUÇÃO nº 03/2000 da SMA (SÃO PAULO, 2000), PORTARIA nº 017/2002 da FATMA (SANTA CATARINA, 2002); RESOLUÇÃO nº 129/2006 da CONSEMA (RIO GRANDE DO SUL, 2006) e COPAM nº 1/2008 (MINAS GERAIS, 2008).

No Paraná, a SEMA (Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos) e o IAP (Instituto Ambiental do Paraná) desenvolveram inicialmente a PORTARIA nº 19 (PARANÁ, 2006), onde foi estabelecido um sistema de automonitoramento de atividades poluidoras no Estado do Paraná, sendo que nessa Portaria, a toxicidade é um dos parâmetros avaliados. Nesta também constam as categorias e subcategorias de efluentes, bem como os organismos recomendados para o monitoramento desses efluentes e o limite do Fator de Toxicidade (FT) para cada categoria. O efluente de ETED não foi categorizado, entretanto, há um trecho do item nº8, sob o título: "Critérios para avaliação da toxicidade de efluentes líquidos", que menciona que:

> "A avaliação dos efeitos tóxicos do efluente sobre o corpo receptor é estabelecida de acordo com a relação que determina a concentração máxima permissível do efluente no corpo receptor, de modo que a mesma não venha causar efeito tóxico nos termos da Resolução CONAMA nº 357/2005, não excedendo Fator de Toxicidade 8 (oito)" (PARANÁ, 2006).

Em 2010 foi aprovada a RESOLUÇÃO CEMA nº 81 (PARANÁ, 2010), que dispõe sobre Critérios e Padrões de Ecotoxicidade para o Controle de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais, no Estado do Paraná. Nessa Resolução os efluentes também aparecem categorizados e relacionados aos tipos de organismos para testes agudos e crônicos. A seção II das estações de tratamento de esgoto sanitário, inciso 1º, define que as ETEs domésticas serão avaliadas durante um período mínimo de 2 anos, para posterior fixação dos padrões e limites máximos de ecotoxicidade, por meio de norma complementar.

2.7 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

O Oxigênio Dissolvido (OD) corresponde a determinação da concentração da saturação do oxigênio dissolvido na amostra. A concentração do oxigênio é um fator limitante para as espécies aeróbias. Para rios de classe 2, como o rio em análise, o OD, em qualquer amostra, não pode ser inferior a 5 mg O_2 /L (BRASIL, 2005).

A medida de pH demonstra o caráter ácido ou básico de uma amostra. Os valores de pH para rios de classe 2 variam entre 6 a 9 (BRASIL, 2005).

A temperatura é um parâmetro que possui relação com o oxigênio dissolvido, e é um dos fatores que influenciam a cinética dos processos metabólicos oxidativos vitais. O aumento da temperatura está diretamente relacionado à velocidade das reações no ambiente aquático, principalmente nas de decomposição de compostos orgânicos (ESTEVES, 1998; QUEIROZ, 2003).

A DQO é a quantidade de oxigênio necessária para que um corpo d'água realize o processo de autodepuração de forma eficiente. A DQO indica quantidade de matéria orgânica presente em águas residuais e superficiais (AQUINO et al., 2006). Não há limites de DQO para águas superficiais.

A DBO é a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação bioquímica da matéria orgânica presente na amostra, nas condições do ensaio. Ocorre uma estabilização dessa matéria pela ação de bactérias, em condições aeróbias. É um teste empírico que mede a diferença entre as concentrações de oxigênio no início e no fim do período de incubação (ABNT, 1992). Seguindo a RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, Artigo nº 10, §1º, os limites de DBO estabelecidos para as águas doces de classes 2 e 3, poderão ser elevados, caso o estudo da capacidade de autodepuração do corpo receptor demonstre que as concentrações mínimas de oxigênio dissolvido previstas não serão desobedecidas, nas condições de vazão de referência, com exceção da zona de mistura. No Artigo nº 15, que contempla as características das águas de classe 2, item nº 5, a DBO pode chegar até 5 mgO_2/L (BRASIL, 2005).

O Fósforo total (PT) é o conjunto de várias formas de fosfato. O fósforo no meio ambiente pode provir da dissolução dos solos e decomposição de matéria orgânica, em ambientes antropizados. Origina-se do uso de fertilizantes, despejos domésticos e industriais, detergentes e excrementos animais (DANELLON; NETTO; RODRIGUES, 2012). Índices acentuados de fósforo podem indicar fontes de poluição originadas de despejos domésticos e industriais (SPERLING, 2005). A Resolução CONAMA nº357 (BRASIL, 2005), prevê que para os rios de classe 2, classificados como ambientes lóticos, o limite para o PT é 0,1 mg/L.

O Nitrogênio amoniacal total (NAT) é a soma da amônia nas formas ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3). O Nitrogênio pode ser encontrado no meio aquático nas formas de nitrogênio molecular, nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal

(amônia), nitrato e nitrito. No ambiente natural, o nitrogênio compõe proteínas e pode ser proveniente da composição celular de microorganismos (SPERLING, 2005). A amônia é um elemento comum nos efluentes, resultado de descargas de efluentes domésticos e industriais, da hidrólise da ureia e da degradação biológica de aminoácidos e outros compostos orgânicos nitrogenados. Nas soluções aquosas, a amônia pode apresentar-se sob a forma ionizada (NH_4^+) (METCALF; EDY, 2003). Conforme a Resolução CONAMA nº357 (BRASIL, 2005), para rios de classe 2, o limite do NAT varia de acordo com o valor do pH, se o pH é menor ou igual a 7,5, o limite para o NAT é de 13,3mg/L; e se o pH varia de 8 a 8,5, o limite para o NAT é de 2,2mg/L.

2.8 TESTE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

O teste de coliformes permite que seja estimada a densidade bacteriana em uma amostra, calculada a partir da combinação de resultados positivos e negativos. Essa estimativa é para o grupo de coliformes totais e para termotolerantes. Não é possível estabelecer especificamente o número de bactérias da espécie *Escherichia coli* na amostra com esse método, apenas se a bactéria está presente na amostra (CETESB, 2007). Para rios de classe 2, o valor de coliformes termotolerantes não deve ser exceder 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros (BRASIL, 2005). A *E. coli* é a única espécie do grupo dos coliformes termotolerantes cujo habitat exclusivo é o intestino humano e de animais endotérmicos, onde ocorre em densidades elevadas (BRASIL, 2005). Desta forma, a presença de *E. coli* é o indicador mais seguro de contaminação fecal (MARQUEZI et al., 2010), e que pode ser relacionada com a contaminação por esgotos domésticos.

2.9 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF)

Os sedimentos lacustres atuam como reservatórios de contaminantes (BURTON et al., 2003), e podem ser analisados pela técnica de EDXRF, que é

aplicada para determinar a concentração de elementos químicos minoritários em materiais sólidos, como metais pesados, em amostras de sedimento (SILVA et al., 2004).

2.10 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA COM ÁGUAS RECEPTORAS E DE EFLUENTES DE ETED

Para corpos receptores de classe 2, não há especificamente um fator, grau ou limite definido de toxicidade. Para a Resolução CONAMA nº 430 (BRASIL, 2011), nenhum efluente pode gerar efeito tóxico agudo ou crônico em organismos aquáticos. Tampouco as águas receptoras, onde os efluentes encontram-se diluídos. Dessa forma, os testes toxicológicos com amostras de águas superficiais, possibilitam estabelecer critérios de qualidades de águas e sedimentos, para proteção da biota (BURTON, 1992; RAND, 1995; US.EPA, 2002; HOFFMAN et al., 2003; WALKER et al., 2004; BLAISE; FÉRARD, 2005; SÄAR, 2011).

Estes testes, com amostras ambientais, são requisitos em processos de licenciamento ambiental, fiscalização ambiental e investigações especiais (US.EPA, 2002), viabilizam a classificação dos corpos hídricos (BRASIL, 2005), estabelecem limites máximos de lançamentos no monitoramento de efluentes, auxiliam a gerenciar as metas progressivas para o enquadramento dos rios (PARANÁ, 2010). E também são uma das premissas na avaliação dos riscos ecológicos e ecotoxicológicos, ferramentas elementares em processo de gerenciamento ambiental (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

O objetivo principal dos testes é identificar as descargas de efluentes em quantidades tóxicas (VILLEGAS et al., 1999, TISLER et al., 1999; RICHARD et al., 2000; US.EPA, 2002; MOHAVDIEM, 2005; SUNGRA, 2008). Secundariamente, também possuem o objetivo de reduzir o risco potencial dos contaminantes para os organismos dos ecossistemas aquáticos, prever impactos causados na biota e produção de dados para propor melhorias técnicas que permitam o estabelecimento de metas em relação aos programas de tratamento (ZAGATTO et al., 1992; FERNANDEZ et al., 1995; ARAÚJO et al. 2005; MENDONÇA et al., 2008; EINSCHLAG, 2013).

Os testes de toxicidade aguda são elaborados para fornecer a dose/resposta em relação ao agente tóxico. Essa informação é expressa através do percentual da concentração de efluentes que é letal para 50% dos organismos-teste (CE_{50}), em um prazo de tempo fixado ou a maior concentração de efluentes em que a sobrevivência não difere estatisticamente do ensaio controle (US.EPA, 2002; OECD, 2008; ABNT, 2009).

Porém, um resultado negativo para toxicidade aguda não exclui a presença da toxicidade crônica na amostra. Isso porque dentro da variabilidade temporal/espacial na toxicidade dos efluentes, um resultado negativo, com uma amostra em particular, não exclui a possibilidade de que amostras coletadas em algum outro momento possam apresentar toxicidade aguda ou crônica. Respostas a concentrações mais elevadas do agente tóxico ocorrem em testes agudos, e respostas em concentrações mais baixas, ocorrem em testes crônicos. Um único agente tóxico, também pode produzir respostas múltiplas (US.EPA, 2002).

Ensaios agudos são rápidos, de custo acessível, entretanto, não são ecologicamente representativos. Os ensaios crônicos apresentam um custo mais elevado, são mais demorados, ecologicamente representativos, expressam toxicidade em concentrações inferiores de xenobióticos e avaliam o efeito de substâncias na reprodução de um organismo teste (OECD, 2008).

Dentre os indicadores de poluição, para águas superficiais e efluentes, bactérias, algas e crustáceos são organismos amplamente utilizados nas análises de ambientes aquáticos continentais (US.EPA, 2002; HOFFMAN et al., 2003; WALKER et al., 2004; BLAISE; FÉRARD, 2005; COSTA et al., 2008).

A *D. magna* é o zooplâncton preferencial em ensaios toxicológicos com águas residuais. Isso deve-se ao curto tempo de duração do teste, a expressiva sensibilidade e a uma metodologia simples de ser reproduzida (US.EPA, 2002; APHA, AWWA, 2005).

Poucos trabalhos foram publicados envolvendo toxicidade aguda ou crônica de águas receptoras contaminadas por efluentes de esgoto, relacionando *D. magna*, ou algum outro cladócero bioindicador, entretanto, merecem destaque os trabalhos de Marzio et al. (2005), Maluf (2008), Hamada (2008), Santos (2008) e Henrique (2010).

Marzio et al. (2005) coletou amostras de águas superficiais, efluentes líquidos e sedimento do Rio Luja'n, em Buenos Aires, Argentina. O experimento foi

desenvolvido em 2003, foram realizadas 4 campanhas com duração de 15 dias em seis pontos de amostragem, com intervalos de amostragem de 2 meses. O cladócero utilizado nos testes de toxicidade aguda com amostras de água foi a *Daphnia spinula*, nativo da Argentina, e para a avaliação do sedimento foi utilizado o teste de toxicidade crônica de dez dias com o anfípoda *Hyalella curvispina*. Na maioria dos testes a imobilidade não foi observada, ou era inferior a 15%. Dentre um total 24 experimentos, apenas em cinco experimentos a imobilidade foi de 100% após 48 h de exposição, tendo a maioria das amostras não apresentado efeito tóxico. Esses resultados apresentam-se relacionados positivamente com altos valores de condutividade e salinidade e baixos valores de OD. Este estudo indicou que a toxicidade das amostras de água e os possíveis processos de eutrofização, foram localizados principalmente na parte inferior do rio, devido ao lançamento de efluentes industriais e esgoto. Já para as análises de toxicidade de amostras de sedimento com a *H. curvispina*, foi detectada toxicidade em locais próximos a descargas industriais e municipais. Essa toxicidade foi atribuída a valores elevados de amônio intersticial, e possivelmente ao fato do sedimento ter se transformado em um reservatório natural de produtos químicos.

Maluf (2008) avaliou a qualidade da água em três pontos, da Bacia do Campus, em Santa Catarina, utilizando *D. magna*. As amostras foram coletadas na nascente, e em outras duas áreas com influência de efluentes domésticos e industriais. Os testes com toxicidade crônica foram realizados apenas para o último ponto, nas concentrações de 100%, 50%, 33,33% e 25%, sendo que não foi observada toxicidade aguda ou crônica aos organismos-teste, sendo média de filhotes gerados no ensaio crônico, bastante semelhante ao controle. A época de 1ª postura foi no 9º dia para o grupo controle e nos testes. Analisando a relação da concentração das amostras e o percentual de filhotes, ocorreu um aumento da produção de filhotes com o aumento das diluições das amostras até a diluição de 33,33%, onde foram produzidos 1053 filhotes. Ocorreu a redução de mais da metade dos filhotes na concentração de 25%. O controle produziu 714 filhotes. Devido aos resultados das análises físicas e químicas não atenderem as exigências da classificação do rio analisado, o autor ressalta que a não observância de efeito tóxico agudo ou crônico, não garantiu que as amostras fossem enquadradas nos padrões de qualidade de um rio Classe 1, segundo a Resolução nº 357 (CONAMA, 2005).

Hamada (2008) avaliou a carga tóxica que chegava na ETE Suzano, a eficiência do tratamento biológico, e a influência da estação no rio Tietê (foi analisando um ponto a montante e outro a jusante), receptor do efluente final tratado da ETE. Os organismos utilizados foram *Daphnia similis* para toxicidade aguda, e *Ceriodaphnia dubia* para toxicidade crônica. Sobre a toxicidade aguda, empregando *D. similis*, os resultados demonstraram que no ponto a montante da ETE não houve efeito em todas as amostragens, a jusante ocorreu o efeito em 50% das amostragens. A exposição dos organismos ao efluente tratado gerou resultado positivo na maioria das vezes. Com relação as amostras do rio a jusante e a toxicidade crônica, a média de posturas foi inferior ao controle quando os organismos foram expostos às concentrações de 75% e 100%. Já nas concentrações de 50% e 25% a média de filhotes foi bastante semelhante ao grupo controle. As amostras provenientes do ponto a montante obtiveram média semelhante ao grupo controle. No que se refere às análises de toxicidade crônica com o efluente tratado, *C. dubia* exposta a amostra com concentração de 25% não realizou postura. As posturas ocorreram apenas em concentrações inferiores a 25%, de forma bastante reduzida, chegando a 50% da média do número de filhotes em relação ao controle.

Santos (2008) analisou vários pontos do rio Corumbataí (São Paulo) através de testes ecotoxicológicos com amostras de água e elutriato[1], com *D. magna*. O rio atua como receptor de esgotos de origem doméstica e industrial. Os municípios de Rio Claro, Piracicaba e Analândia captam água do rio. Os resultados demonstraram que dos sete pontos amostrados durante oito meses, seis amostras de água foram tóxicas. A CE50 para o elutriato foi menor, indicando maior toxicidade para essas amostras, em maior quantidade, em relação às amostras de água.

Henrique (2010) estudou a toxicidade aguda para *D. magna* do rio Papaquara. Trata-se de um rio de classe 1, porém há grande ocupação no entorno do rio e contaminação por efluentes domésticos. Foram realizados testes com três coletas, advindas de três pontos. O resultado da toxicidade aguda foi negativo para todos os testes, porém, o autor recomendou a realização de ensaios crônicos.

---

[1] Elutriato: Mistura de água não contaminada com certa quantidade de sedimento, sob agitação, por determinado período de tempo. Após esse tempo a mistura é decantada ou centrifugada, para uso em teste de toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008 p. 458).

Dentre os trabalhos que analisam ecotoxicidade aguda e /ou crônica de efluentes de ETEs domésticas e *D. magna*, destacam-se as publicações de Hernando et al. (2005), Mohavdiem et al. (2005), Costa (2008), Mendonça et al. (2008), Mendonça et al. (2009), Amaral (2012) e Leal et al. (2012).

Hernando et al. (2005) realizou testes de toxicidade aguda aplicados ao efluente de ETEs com *D. magna*, *V. fischeri* e *Selenastrum capricornotum*. Os efluentes eram provenientes de nove estações de tratamento, advindas de diferentes países europeus, durante cinco meses. Ao mesmo tempo, também realizou comparações com outras substâncias, verificando o grau de sensibilidade dos organismos a determinadas concentrações. Constatou que os organismos testados exibem alto grau de sensibilidade para detectar concentrações de poluentes em amostras ambientais tão baixas como 1ng/L. Efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos foram avaliados indicando a capacidade desses testes para avaliar a toxicidade combinada dos efeitos de substâncias químicas em águas residuárias. Os testes desenvolvidos foram de toxicidade aguda.

Mohavdiem et al. (2005) conduziram um estudo com toxicidade aguda envolvendo *D. magna* durante sete meses, com amostras de efluentes provenientes de diferentes ETEs em Isfahan, no Irã. Os efluentes foram classificados em bruto, de tratamento preliminar, primário e secundário. A realização dos testes ocorreu em diferentes concentrações das amostras, com 13 repetições de cada um. Os resultados apontaram grande toxicidade nas primeiras concentrações, onde ocorreu uma maior imobilidade, em todas as classes de efluentes. Esse fato foi reduzido com o aumento da diluição dos efluentes. O autor concluiu que o teste de toxicidade aguda com *D. magna* pode ser uma ferramenta analítica útil para um sistema de alerta inicial, afim de monitorar as diferentes unidades operacionais de estações de tratamento de águas residuárias. Com base na grande imobilidade nas primeiras concentrações, o autor concluiu que é necessário considerar políticas de qualidade da água mais rigorosas para a avaliação monitoramento da toxicidade.

Costa (2007) avaliou efluentes de tratamento secundário de esgoto sanitário, após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta, empregando testes de toxicidade aguda com Daphnideos. Uma das conclusões foi a detecção da toxicidade do efluente da ETE, indicando que o tratamento utilizado pela ETE foi ineficiente no sentido de não remover substâncias com efeito tóxico, presentes nas águas residuárias de Araraquara. Esse fato, segundo a autora, é um

indicativo de que esse tipo de efluente pode contribuir para a degradação do corpo hídrico receptor, dependendo da quantidade liberada de efluente para o rio e sua vazão.

Mendonça et al. (2008) desenvolveu um projeto, aplicando ensaios agudos e crônicos com *D. magna* e outras espécies, testando dezessete tipos de amostras. Das dezessete amostras, seis provinham de rios, e o restante de rios receptores, de empresas localizadas na bacia do Rio Trancão em Portugal, coletadas durante quatro campanhas entre maio de 2003 e setembro de 2004. Foi observado o efeito crônico em duas amostras de rios e em uma amostra de um receptor com concentrações bastante reduzidas, tendo sido este um resultado particularmente relevante, uma vez que as amostras não mostraram-se tóxicas em nível agudo para nenhum dos daphnideos testados.

Mendonça et al. (2009) estudou amostras de águas residuais de dois sistemas de rede de esgoto. Estes sistemas recebiam efluentes domésticos e industriais relacionados a indústria química, alimentos, metal - mecânica, papel , impressão e reciclagem. Não houve expressão de efeito agudo para *D. magna*. Para o teste crônico, não houve nenhuma mortalidade das matrizes e ocorreu reprodução nos tratamentos com menor concentrações de amostra. Concentrações elevadas de 100% promoveram mortalidade, enquanto que em concentrações abaixo de 20% obtiveram como resultado a produção de filhotes inferior, quando comparado ao controle.

Amaral (2012) analisou a correlação entre parâmetros físicos e químicos associados a toxicidade aguda, de amostras coletadas em quatro campanhas, entre a Calha Parshall e o corpo receptor de uma ETE de efluentes domésticos, na região de Curitiba, Paraná. Os resultados para as análises físico-químicas permaneceram dentro do limite tolerado pelas legislações. As amostras do efluente tratado por lodo ativado, indicaram toxicidade aguda em duas campanhas para *Vibrio fischeri e D. magna.* A toxicidade para a *D. magna* foi negativamente correlacionada com o pH (-0,89) e a DBO_5 (-0,95). *D. magna* apresentou-se mais sensível aos parâmetros de pH e OD. Os resultados foram FTD 2, 4 e 4 para todas as amostras coletadas entre a Calha Parshall e o corpo receptor. Nesse estudo não ocorreu correlação positiva entre toxicidade e valores de parâmetros físicos e químicos.

Leal et al. (2012) desenvolveram um estudo em Sneek, Holanda, onde o objetivo foi comparar a ecotoxicidade da água cinza após o tratamento

exclusivamente aeróbio, tratamento aeróbio/anaeróbio, aeróbio com carbono ativado, e aeróbio com ozônio. Os organismos testados foram *D. magna,* para testar a toxicidade aguda e crônica, e *Chironomus riparius*, para testar a toxicidade aguda, onde avaliou-se imobilidade e comprimento corporal. Nos testes com *D. magna*, de toxicidade aguda e crônica, com diferentes concentrações do efluente, foi avaliada a imobilidade e reprodução em vinte e um dias. Em paralelo, foram analisados DQO, COT, série de metais, série de nitrogênio, cloretos e fosfatos. As análises do efluente gerado, pós-tratamento aeróbio/anaeróbio, demonstraram elevada toxicidade crônica, afetando 47% dos daphnideos, além disso, promoveu o atraso no início da reprodução, além de ser letal para 50% dos organismos expostos. O tratamento aeróbio foi o que proporcionou efluente com menor toxicidade, gerando efeito em apenas 9% dos daphnideos. Para as amostras de águas cinza sem tratamento, apenas 20% das larvas de *C. riparius* sobreviveram ao teste agudo, enquanto para *D. magna* a exposição foi letal para 100% dos organismos testados. Para a água cinza tratada com processos aeróbio e ozônio, anaeróbio/aeróbio e com carvão ativado, não houve expressão da toxicidade para organismos testados. Diferenças entre fosfato, nitrato e nitrito não explicaram a toxicidade.

No que se refere a estudos voltados para a toxicidade de sedimento integral e *D. magna*, Terra et al. (2008) descreveram resultados crônicos ao longo de 21 dias para amostras coletadas em oito pontos do rio Sinos, durante 24 meses. O rio recebe influência de efluentes domésticos e industriais. Nas primeiras 48 horas não ocorreram efeitos tóxicos para todas as amostras, porém todas as amostras expressaram efeito crônico na reprodução, ocorrendo uma redução da produção dos recém-natos em comparação ao grupo controle, fato relacionado à contaminação ambiental.

Trabalhos com Chironomidaes voltados à toxicidade aguda ou crônica de águas receptoras são extremamente escassos. No Brasil existe um trabalho bem direcionado a análise de sedimento e de água com Chironomidaes, o de Dornfeld (2006). Na esfera internacional, há o trabalho de Leal et al. (2012) já citado e o trabalho de Baldan (2012).

Dornfeld (2006) avaliou a qualidade dos sedimentos em relação a metais, com amostras provenientes de quatorze pontos amostrais, da nascente a foz do rio Monjolinho (MG, Brasil), utilizando *Chironomus riparius* e *Chironomus xanthus*. Alguns dos trechos desempenhavam função de receptores de esgoto. Os ensaios

laboratoriais apontaram toxicidade aguda em dois pontos amostrais. Foram realizados ensaios *in situ*, onde foi detectado um grau bastante superior de respostas agudas, com maior percentual de letalidade frente aos ensaios laboratoriais. Ocorreram também efeitos letais nos ensaios crônicos.

Baldan (2012) coletou *C. xanthus*, sinônimo júnior de *C. sancticaroli,* no rio Iguaçu, no Paraná, em 2007. Esse organismo foi cultivado artificialmente em laboratório, e foi estudada a possibilidade de utilizá-lo como bioindicador para diferentes xenobióticos. Foi determinada sua eficiência no uso de ensaios de toxicidade aguda, expondo o organismo a concentrações letais de alfa-cipermetrina, malation e esgoto bruto doméstico, após ter passado pelo desarenador, sem nenhum tratamento químico, proveniente de uma ETED de Curitiba, Paraná.

2.10.1 Caracterização dos organismos de interesse para este estudo

2.10.1.1 Família Daphniidae

A família Daphniidae pertence filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, subordem Cladócera, classe Branchiopoda, caracterizada por apêndices do tronco que tem uma estrutura achatada e foliácea. Apresenta distribuição cosmopolita nos ambientes límnicos. Tem como características a alimentação por filtração, antênulas pequenas e cilíndricas, pseudoabdômen mais ou menos comprimido, sempre com espinhos anais, cinco pares de patas, o quinto par tem uma grande seta recurvada, estendendo-se ao saco branquial (LOURDES; LOUREIRO; 1997).

2.10.1.2 Espécie *Daphnia magna* (Straus, 1820)

A *Daphnia magna* (Figura 1) é uma espécie límnica, o comprimento médio de uma matriz é de 5 a 6 milímetros (KNIE; LOPES, 2004). É um organismo de fácil padronização em cultivos de laboratório, tem como atrativo o tamanho do corpo,

maior em relação a outros cladóceros, como a *Ceriodaphnia dubia*, por exemplo, (JONCYK; GILRON, 2005).

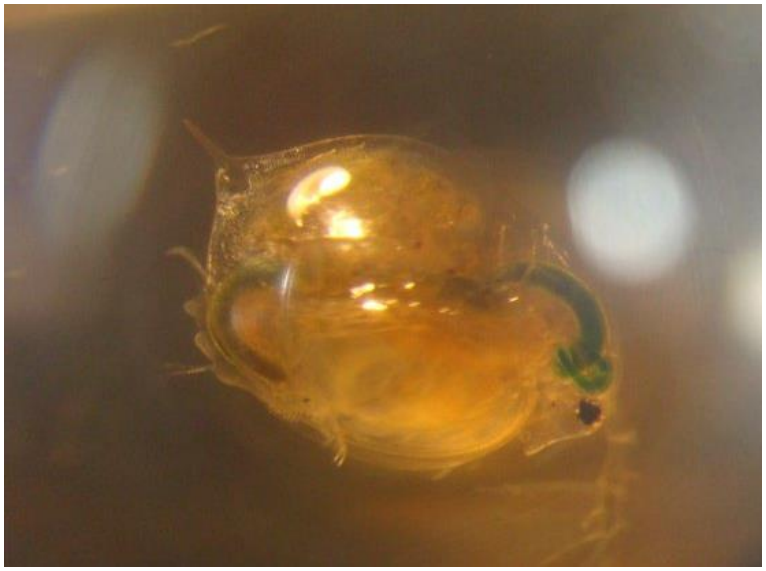


Figura 1 - *D. magna* adulta com filhotes maduros na câmara incubatória.
Fonte: Autoria própria.

Locomove-se através de saltos (LOURDES; LOUREIRO*,* 1997), sendo a movimentação predominante a vertical (RUPPERT*;* BARNES, 1996). É um consumidor primário, alimenta-se pela filtração promovida pelas cerdas das patas, sendo o alimento constituído de algas, protozoários, detritos orgânicos e bactérias (LOURDES; LOUREIRO, 1997). Em condições naturais, alimenta-se preferencialmente em uma proporção maior de bactérias, mas também alimenta-se de algas (HADAS et al., 1983; BLAISE; FÉRARD, 2005). *D. magna* ingere e digere a bactéria *E. coli* (HADAS et al., 1983), também a inativa em águas receptoras de esgoto (SHINY et al., 2005, citado por PAU et al., 2013). Em cultivos artificiais a alimentação com algas unicelulares é suficiente, principalmente quando utiliza-se a água artificial, o M4, uma água enriquecida com nutrientes e padronizada pela ABNT/NBR (12713, 2009). Recomenda-se um volume de 500 µL em uma densidade de 10^6 a 10^7 cel/mL, fornecida diariamente (KNIE; LOPES, 2004).

Durante a maior parte do tempo, as populações de cladóceros são constituídas apenas por fêmeas, que reproduzem-se por partenogênese, gerando organismos 2n, fêmeas geneticamente idênticas às quais a geraram (RUPPERT ; BARNES; 1996; LOURDES; LOUREIRO, 1997; US.EPA, 2002). A reprodução sexuada apenas ocorre quando o ambiente torna-se desfavorável. Em locais que

apresentam condições constantes, a reprodução segue da forma assexuada por partenogênese (LOURDES; LOUREIRO, 1997; US.EPA, 2002). O desenvolvimento é direto e os jovens são liberados da câmara incubatória através de flexão ventral do pós-abdômen. Quando um jovem deixa a câmara por baixo da carapaça, muda-se o exoesqueleto, sendo liberado um novo grupo de ovos no interior da câmara (RUPPERT; BARNES; 1996; LOURDES; LOUREIRO, 1997).

Existem quatro estágios de vida distintos para os daphnideos: ovo, juvenil, adolescente e adulto. O tempo de vida depende das condições ambientais, estando muito relacionado à variação da temperatura. Vivem 56 dias a temperatura de 20°C, podendo chegar até 90 dias em cultivos artificiais, com a temperatura estável de 20°C. A ninhada varia de 6 a 10 ovos. Na muda do estágio adolescente para o 1º instar adulto, ocorre a primeira postura de ovos, que são depositados na câmara de incubação. A cada instar são liberados os jovens e uma nova ninhada entra na câmara de incubadora. Após a eclosão dos ovos na câmara incubadora, os jovens nascem a aproximadamente após 2 a 3 dias, durante a muda da fêmea matriz. Os daphnideos amadurecem em média entre 7 a 10 dias, o tempo até ocorrer o amadurecimento sexual depende basicamente do tamanho do corpo. A maior taxa de crescimento ocorre durante os primeiros estágios do ciclo de vida. Cada instar é terminado por uma muda, e pela ocorrência do crescimento imediato, seguindo com um novo exoesqueleto (LOURDES; LOUREIRO, 1997; BLAISE; FÉRARD, 2005).

A escolha desse organismo, em testes ecotoxicológicos, fundamenta-se principalmente na produção de descendentes geneticamente idênticos, o que gera certa uniformidade de respostas nos ensaios. A cultura em laboratório é fácil, o ciclo de vida é curto, o tamanho dos organismos é relativamente grande em comparação com outros microcrustáceos. A espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos, mostra-se apropriada para desenvolvimento de testes estáticos, semiestatísticos ou de fluxo contínuo, e é internacionalmente reconhecida como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos (KNIE; LOPES, 2004; BLAISE; FÉRARD, 2005).

2.10.1.3 Família Chironomidae

O interesse ecológico nos Chironomidaes decorre da sua ampla distribuição em comunidades bentônicas, em especial, nos hábitats límnicos (PÉRY, MONS; GARRIC, 2005). No sedimento podem ser encontradas as larvas de Chironomidae, insetos considerados os mais abundantes e com maior distribuição nos corpos hídricos (TRIVINHO-STRIXINO, 2011). São cosmopolitas, habitando inclusive a região da Antártida (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Atuam em diferentes nichos ecológicos como presas, predadores, herbívoros, onívoros, coletores, trituradores, filtradores, interagindo, assim, com vários níveis tróficos (BURTTON, 1992). Estão atrelados à decomposição da matéria orgânica (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1995), desempenham a maior conexão entre produtores e consumidores secundários (TOKESHI, 1995).

São insetos de água doce, pertencem a um dos mais abundantes grupos taxonômicos em espécies e ecologicamente relevantes. Chironomidaes são organismos com uma grande importância na dinâmica ciclagem de energia nos ambientes aquáticos. Devido ao seu comportamento alimentar variado e ciclo de vida planctônico e bentônico, são excelentes indicadores da qualidade dos sedimentos, pois apresentam um contato íntimo com ambas as matrizes ecológicas (ROSENBERG; 1992; ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995; SILVEIRA, 2006).

2.10.1.4 *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981)

Chironomus sancticaroli constitui uma espécie nativa do Brasil, abundante na bacia do Iguaçu, Estado do Paraná. Pertence a subfamília Chironomidae (Ordem Diptera). Essa espécie é considerada um sinônimo júnior de *Chironomus xanthus* Rempel 1939 (CORREIA, 2004).

O ciclo de vida dos Chironomidaes (Figura 2) é holometábulo, divide-se em quatro estágios larvais distintos, conhecidos como instar. Após a postura, a fêmea adulta deposita 500 a 1045 ovos agrupados em uma massa ovígera mucilaginosa, com aspecto tubular recurvado (TRIVINHO - STRIXINO; STRIXINO, 1982). Em

laboratório, um pequeno percentual pode realizar até três posturas (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1989). Com a temperatura entre 10 a 26°C, o período de incubação é de aproximadamente 44 horas, onde as larvas incolores, que estão no I instar, rompem o cório e permanecem em uma massa gelatinosa durante aproximadamente 12 horas. A partir daí nadam ativamente e iniciam a construção dos tubos. A duração do I instar é de quatro dias (TRIVINHO - STRIXINO; STRIXINO, 1982). Já o II e III instar, duram dois dias cada. Nessa fase as larvas aumentam ainda mais seu comprimento e o tamanho dos tubos, até atingirem o IV instar, com duração de seis dias, sendo o mais longo (TRIVINHO - STRIXINO; STRIXINO, 1982). Nas fases larvais o organismo adquire toda energia para o seu desenvolvimento. No final do IV instar ocorre o empupamento, metamorfisando-se em mosquito, mas ainda na pupa. Após a metamorfose completar-se o organismo nada até a superfície, e tona-se adulto em fase reprodutiva. A fase adulta é bastante curta e não ocorre nenhum tipo de alimentação, ocorre de dois a três dias (FONSECA; ROCHA, 2004; VIVEIROS, 2012).

A metamorfisação desse organismo está muito relacionada às condições de temperatura, o ciclo de vida pode fechar-se em 12 a 15 dias (FONSECA; ROCHA, 2004). A identificação dos ínstares é baseada na contagem dos dias, a partir do surgimento da massa (FONSECA, 1997).

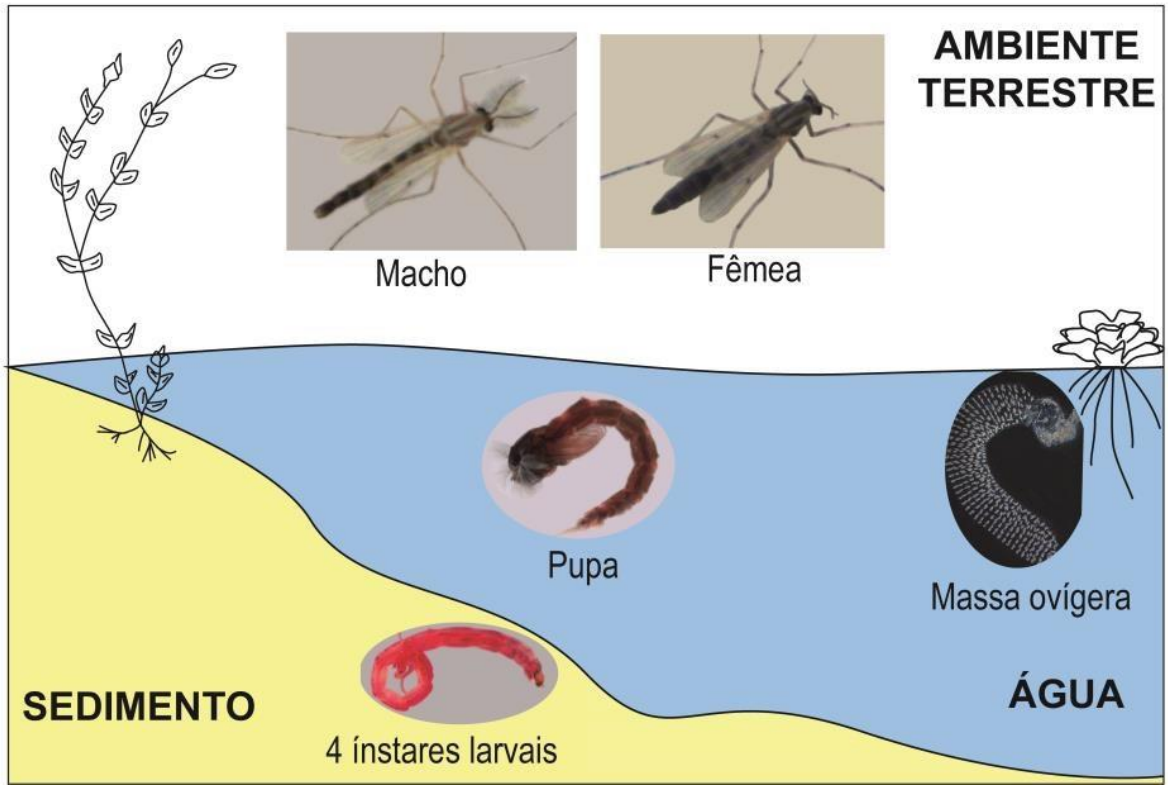


Figura 2 – Ciclo de vida dos Chironomideos.
Fonte: RCHARDI (2013, p. 6).

A exposição de Chironomideos para a avaliação tanto da água como do sedimento é relevante (OECD, 2009). Trivinho-Strixino; Strixino (1982), Trivinho-Strixino; Strixino (1989), Fonseca (1997), Dornfeld (2006) e Viveiros (2012) reforçam o uso desse gênero, já padronizado pela OECD, no monitoramento do sedimento e da água. Ainda são ensaios experimentais, onde elementos como a temperatura do cultivo, tipo de alimentação, volume da amostra e composição da água artificial utilizada para cultivo e testes, apresentam-se de forma diferenciada nas pesquisas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETAS

As amostras foram coletadas em três pontos dentro da bacia do rio Atuba (Figura 3): O primeiro ponto (P1) foi a montante da ETE, coordenadas: 25.464650S/ 49.190.255W, o segundo (P2) na saída do efluente da ETE, coordenadas: 25.473848S/ 49.18548W, e o terceiro (P3) a jusante da ETE, na confluência do rio Atuba com o rio Iguaçu, coordenadas: 25.484535S/49.190165W. O sedimento de referência (P4), para a elaboração dos testes controle com sedimento, foi coletado em um ponto a montante de P1, P2 e P3, ainda no rio Atuba, no município de Colombo, coordenadas: 25.350091S/ 49.230543W.

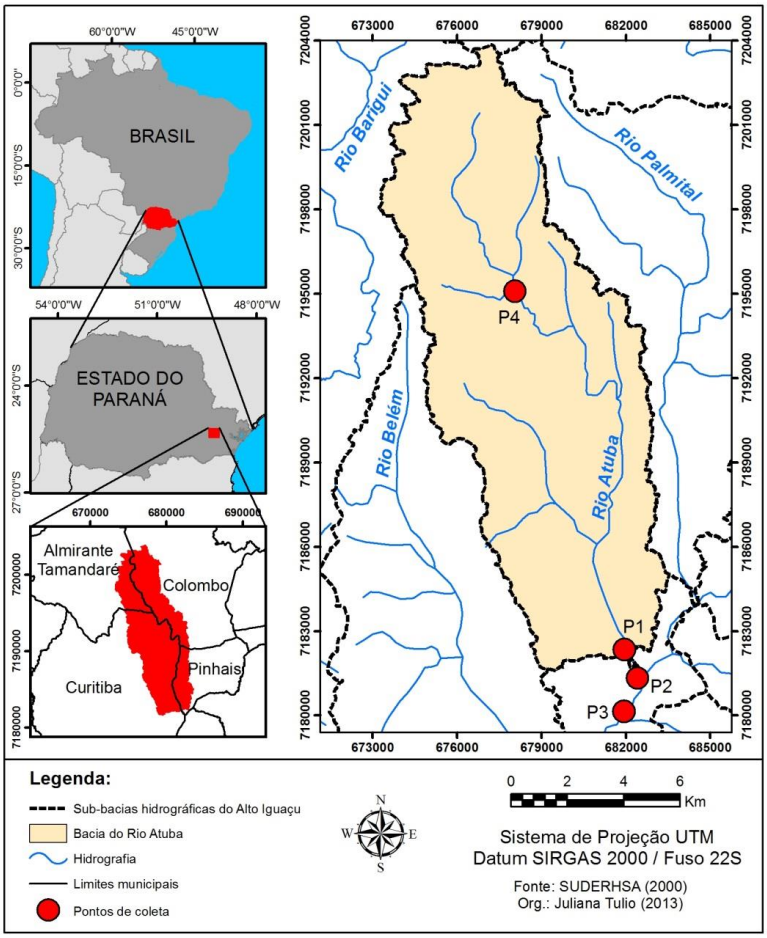


Figura 3 – Localização dos pontos amostrais.
Fonte: Autoria própria.

Para coletar as amostras de água foi utilizado um balde de aço inox (Figura 4). Foram desenvolvidas 3 investidas a campo, uma no verão, outra de outono, e a última no inverno.

A determinação das variáveis de Oxigênio Dissolvido, pH e temperatura da água foram realizadas *in situ* (Figura 5).

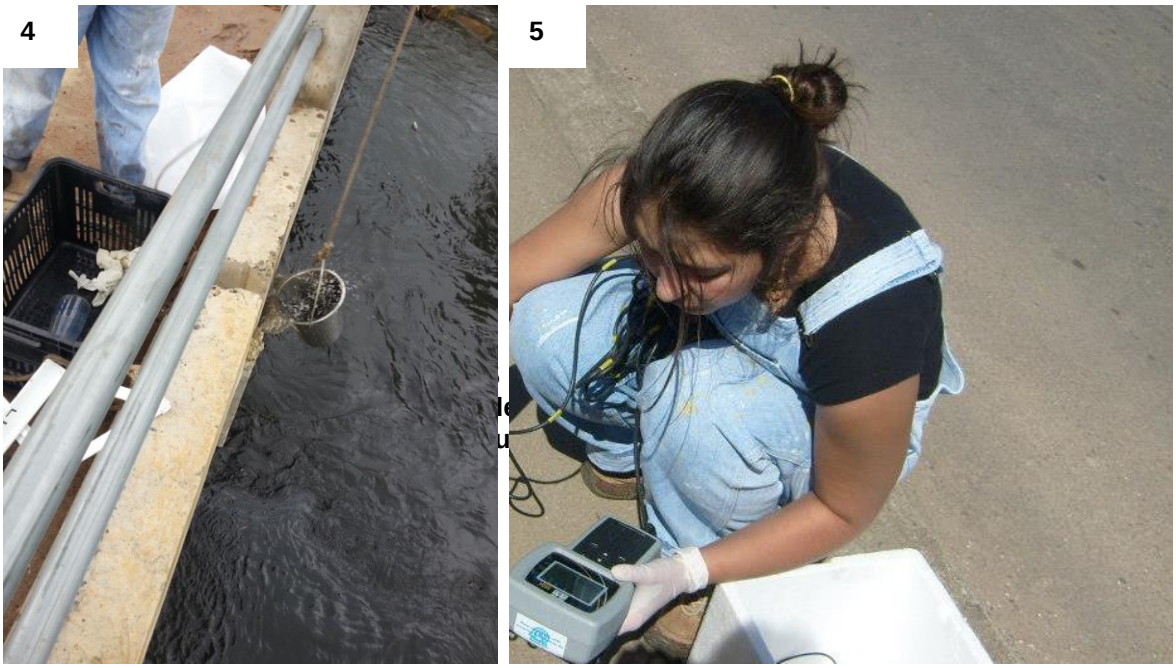


Figura 4 - Coleta de água realizada com balde inox.
Figura 5 - Determinação do Oxigênio Dissolvido, pH e temperatura.
Fonte: Autoria própria.

As amostras coletadas para a determinação do PT e NAT, foram armazenadas em frascos de polipropileno e refrigeradas em caixas térmicas com temperatura entre 2 a 6°C, por até 6 horas (Figura 6). Foram então congeladas mantidas a temperatura de -18 a -20°C.

Figura 6 - Armazenagem e refrigeração das amostras coletadas em campo.
Fonte: Autoria própria.

Para a coleta das amostras destinadas aos ensaios microbiológicos, utilizou-se um frasco de vidro autoclavável preparado conforme o Guidelines: Regulatory monitoring and testing *water and wastewater sampling* (US.EPA; 2007, p.15-16). A coleta da água foi realizada utilizando um balde de inox, gerando uma corrente artificial, conforme mencionado no guia.

As amostras foram identificadas e acondicionadas em caixa térmica com temperatura entre 2 a 6°C, posteriormente conduzidas até o laboratório de Limnologia/Ecotoxicologia da UTFPR, onde permaneceram refrigeradas com temperatura entre 2 a 6°C. As análises foram realizadas nas primeiras 24 horas decorridas da coleta.

Para a coleta das amostras destinadas a DBO e DQO, foram coletados 2L de amostra, transferidas para os frascos de 1L de polipropileno. As amostras para a determinação de DQO foram acidificadas com 1mL H_2SO_4/L, e preservadas com temperatura entre 2 a 6°C, conforme Standard Methods (APHA, 2005).

Os frascos foram identificados e acondicionados em caixas térmicas e posteriormente, conduzidos até o laboratório de Limnologia/Ecotoxicologia da UTFPR, onde permaneceram refrigeradas com temperatura entre 2 a 6°C. As amostras para a análise da DQO foram analisadas até 7 dias após a coleta, e as amostras de DBO foram processadas nas primeiras 24 horas decorridas da coleta.

Para a realização de testes ecotoxicológicos, a água foi transferida do balde de coleta para os frascos de polipropileno. Foram coletados 7L de amostra por ponto. Os frascos foram identificados e acondicionados em caixas térmicas,

com temperatura entre 2 a 6°C. No laboratório, parte das amostras de cada ponto foram aliquotadas em frascos de 500 mL e congeladas com temperatura entre -18 a -20°C, com viabilidade de uso de até 60 dias. O restante foi utilizado para as amostragens frescas, em até 48 horas preservadas refrigeradas com temperatura entre 2 a 6°C de acordo com ABNT/NBR 12713 (2009).

Para as amostras para a realização dos testes ecotoxicológicas de sedimento, a coleta foi realizada com Draga Van-Veen, na margem de melhor acesso do rio, sendo coletadas amostras em triplicatas, compostas a partir de volumes iguais de cada réplica, conforme Brandão (2011) (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Sedimento coletado na Draga.
Figura 8 - Coleta de sedimento com Draga Van-Veen, no primeiro ponto de coleta.
Fonte: Autoria própria.

As amostras de sedimento foram homogeneizadas e armazenadas em frascos de polipropileno, identificadas, acondicionadas em caixas térmicas com temperatura entre 2 a 6°C. O volume coletado foi de 500g por ponto amostral.

Para as análises ecotoxicológicas de sedimento, foi necessário coletar uma amostra de sedimento em um ponto de referência (P4) para obter-se uma amostra de comparação com os outros sedimentos P1, P2 e P3, de forma a ser utilizado como controle. O sedimento referência foi coletado dentro da mesma bacia dos pontos P1, P2 e P3, de acordo com o proposto por Brandão (2011), em uma região a montante, na divisa de Curitiba com o município de Colombo.

No laboratório de Limnologia/Ecotoxicologia, a preservação foi por refrigeração com temperatura entre 5 a 9°C, com validade de 60 dias (BRANDÃO, 2011).

3.2 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

O OD, pH e temperatura da água foram medidos em campo, inserindo-se o eletrodo dentro da água coletada, no instante da coleta. A sonda utilizada foi a YSI 550A. Todos os seus parâmetros foram calibrados antes do uso, de acordo com o manual de operação do equipamento (YSI ENVIRONMENTAL, 2006).

Para a determinação das outras análises físicas e químicas com a matriz água, foram utilizados os ensaios, métodos e referências citadas no Quadro 1. Todas estas metodologias seguiram os protocolos recomendados pela *Standard Methods* (APHA, 2005).

Ensaio	**Método de determinação**	**Referência**
DQO	Refluxo Aberto	APHA, 2005 Método 5220 -B p.15-16
DBO_5	Titulométrico de Winkler modificado pela Azida Sódica	APHA, 2005 Método 5210 - B ,p.2-7
PT	Persulfato de Potássio	APHA, 2005 Método, 4500 - B p.153-155
NAT	Fenato	APHA, 2005 Método, 4500 - F p. 114

Quadro 1 - Ensaios, métodos e referências das análises físicas e químicas com a matriz água.
Fonte: Autoria própria.

3.3 ANÁLISE DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

Para a determinação da presença do grupo Coliformes Termotolerantes, foi utilizado o método dos Tubos Múltiplos - Número Mais Provável – NMP (APHA, 2005, 9221 p. 49-55). O substrato enzimático utilizado para confeccionar o caldo de cultura foi o Rapid HiColiform Broth, um meio seletivo para coliformes (HIMEDIA, 2009, p. 795).

Para os procedimentos de quantificação microbiana, todos os materiais (tubos, ponteiras, etc), as soluções de diluição e os meios de cultivo foram

esterilizados em autoclave a 1,1 atm por 15 minutos (antes dos experimentos) e 30 minutos (ao término destes).

Os tubos foram previamente preparados com 9 mL de caldo de cultura. Cada um dos frascos foi identificado com a série de volumes inoculados e número da amostra.

As amostras foram diluídas em 9 mL de solução salina 1% estéril, após essa diluição, as mesmas foram inoculadas em volumes decrescentes de diluição, em uma série de tubos com caldo de cultura, sendo os volumes diluídos e inoculados de 10^{-1} mL até 10^{-12} mL. Foram preparadas 5 réplicas de cada série de diluições, que posteriormente foram incubados por 48 horas a 35 °C.

A determinação do resultado positivo (Figura 9) para o grupo Coliformes Termotolerantes ocorre com a mudança da coloração de creme amarelado homogêneo para azul, após a incubação a 35°C por 48 horas (HIMEDIA; 2009).

A confirmação da presença de *E. coli* seguiu o método do manual HIMEDIA (2009, p.795). Após as 48 horas, nos tubos em que ocorreu a mudança para coloração azul, foi adicionado o reagente de Kovac´s. Nos ensaios com resultado positivo para *E. coli*, formou-se um halo arroxeado na linha do menisco (Figura 10).

Figura 9 - Incubação do teste de Coliformes termotolerantes após 48 horas.
Figura 10 - Teste positivo para Coliformes termotolerantes e positivo para *E. coli*
Fonte: Autoria própria

3.4 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF) COM A MATRIZ SEDIMENTO

Para a análise dos espectros de fluorescência de raios-X de energia dispersiva, as amostras de sedimento integral foram moídas manualmente em gral com pistilo, para que fosse reduzida ao máximo a granulometria do sedimento, diminuindo os desvios do feixe de Raios-X e, assim, não influenciando na eficiência das determinações. Em seguida, as amostras foram peneiradas em peneira Tamis de inox com malha de 2 mm. Posteriormente, as análises foram realizadas utilizando um Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva, do modelo Shimadzu EDX-720/8Hs, do Laboratório de Análise e Pesquisa em Química Analítica (LAPAQ), da Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciências Agronômicas e Ambientais, do Centro de Educação Superior Norte do Rio Grande do Sul.

As seguintes condições de operação do equipamento foram selecionadas: tubo de raios-X de Lítio, tensão de 15 kV para os elementos mais leves (sódio – escândio) e 50 kV para os elementos mais pesados (titânio – urânio). A corrente foi de 20μA, o colimador de 10 mm. O tempo de irradiação utilizado foi 200 segundos. A corrente de 100 μA; colimador de 10 mm; detector de silício - lítio; O tempo de irradiação utilizado foi 400 segundos (PATACA et al., 2005). O equipamento gerou um relatório semiqualitativo e quantitativo para cada amostra de sedimento analisado, constando dentro do percentual de amostra lida pelo equipamento, quais substâncias existem, e qual a concentração na amostra, em partes por milhão (ppm).

3.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Para o desenvolvimento dos testes ecotoxicológicos, foram utilizados os organismos, métodos, critérios de avaliação, duração dos ensaios e referências citadas no Quadro 2.

Organismos	Métodos	Critérios de avaliação	Duração dos testes (dias)	Referências
D. magna	Toxicidade aguda Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustáceo Cladocera).	Imobilidade	2	ABNT NBR 12713/2009
D. magna	Toxicidade crônica	Média de filhotes produzidos	21	OECD 211/2008
C. sacticaroli	Toxicidade aguda Método experimental	Imobilidade	4	SANTIAGO 2012
C. sancticaroli	Toxicidade crônica Método experimental	Imobilidade e crescimento	8	SANTIAGO 2012

Quadro 2 - Resumo dos Métodos, organismos e referências utilizados nos testes ecotoxicológicos.
Fonte: Autoria própria.

3.5.1 Cultivo de *D. magna*

Para o desenvolvimento dos testes, foi necessário preparar e manter um cultivo de *D. magna* em condições padronizadas pelo método da ABNT/NBR12713 (2009).

Lotes de organismos, em número de 45 indivíduos, foram mantidos em béqueres de vidro com 2.000 mL de volume, contendo M4, a água de cultivo (ANEXO A, Tabela A1 e Tabela A2). A manutenção do cultivo consistiu em realizar trocas totais do volume de M4 nas 2ª e 6ªas feiras, e trocas parciais, de 50% do volume do M4, entre 3ª e 5ª feira. Durante todas as trocas do M4 as matrizes foram retidas, delicadamente, em peneiras, os recém-natos separados. A água de cultivo utilizada foi o M4 (ABNT/NBR 12713, 2009), com pH mantido entre 7,6 a 8, dureza de 175 a 225 mg de $CaCO_3$/L. O M4 foi armazenado em barrilete de PVC, sob aeração contínua.

A temperatura para o cultivo variou entre 18 a 20ºC, em incubadora com fotoperíodo regulado para 16 horas de luz e 8 horas de escuro (Figura 11).

Figura 11 - Cultivo de *D. magna* em incubadora.
Fonte: Autoria própria.

Cada lote de cultivo teve um tempo máximo de manutenção de 45 dias, quando novos lotes foram iniciados, a cada 15 dias. Para iniciar um novo lote, foram adicionados cerca de 50 recém-natos em um béquer, contendo 2L de M4. O início de produção dos novos lotes para testes foi considerado a partir do 15º dia de vida dos recém-natos, período em que as Daphnias já iniciaram suas posturas e estão bem desenvolvidas.

A alimentação foi realizada no momento da troca de água, sendo ofertada suspensão algácea de *D. subspicatus* com densidade algal de 10^6 a 10^7cel/mL, em um volume de 500µL indivíduo/dia. As algas foram provenientes do cultivo mantido no laboratório de Limnologia/Ecotoxicologia da UTFPR, conforme ABNT/NBR 12713 (2011). Para o cultivo da alga foi utilizado o meio CHU (ANEXO B, Tabela B1 e Tabela B2).

3.5.1.1 Teste de sensibilidade com *D. magna*

Este teste permitiu avaliar a sensibilidade das culturas de *D. magna* em relação a uma substância de referência, garantindo que os organismos jovens estivessem em condições aceitáveis de sensibilidade para serem submetidos aos testes de toxicidade aguda com amostras ambientais. O método é padronizado pela ABNT/NBR 12713 (2009). Nesse teste indivíduos recém-natos foram expostos a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (ABNT/NBR 12713, 2009). A partir da diluição (ANEXO A, Tabela A3) da solução estoque de 100 mg/L de dicromato de potássio na água de diluição, confeccionada de acordo com a ABNT/NBR 12713 (2009), foram desenvolvidas as seguintes concentrações para os testes: 0,94, 0,85; 0,76; 0,68; 0,61; 0,55; 0,50 e 0,40 mg/L. O tempo de duração da exposição ao dicromato de potássio foi de 1 dia, sem fotoperíodo ou alimentação, sendo um ensaio estático.

Avaliando-se a imobilidade obteve-se a CE_{50}: a concentração efetiva média da amostra que representa um valor médio, na qual o efeito letal pode ser matematicamente estimado em 50% dos organismos-teste (KNIE; LOPES, 2004). A faixa de aceitabilidade para a CE_{50}, ou seja, a faixa de sensibilidade aceita para a substância de referência dicromato de potássio é qualquer valor entre 0,6 mg/L a 1,7 mg/L (ISO 6341, 1996; citado por KNIE; LOPES, 2004).

Foram realizados ensaios quinzenais, em triplicata, com cinco diluições, no período de janeiro até julho de 2013. A partir dos resultados dos ensaios, os dados foram transpostos em tabelas, sendo o eixo x representante das concentrações testadas de dicromato de potássio, e o eixo y representante do efeito observado em porcentagem de imobilidade. Dessa forma, através do cálculo da regressão linear, obteve-se o valor da CE_{50} de cada um dos testes de sensibilidade. Com todos os resultados das $CE_{50,}$ foi calculada a média da $CE_{50,}$ o desvio padrão, os limites superior e inferior de confiabilidade (a média somada a dois desvios padrões e a média subtraída de dois desvios padrões), com intervalo de confiança de 95%. Para o cálculo da regressão linear da CE_{50}, foi utilizado o software Excel®, versão 2010, conforme ABNT/NBR 12713 (2009). Os resultados foram inseridos em uma carta controle de sensibilidade (APÊNDICE A, Figura A 1).

3.5.1.2 Ensaio agudo com *D. magna* com a matriz água

O teste consistiu na exposição de indivíduos jovens de *Daphnia magna,* recém-natos de até 24 horas, a cinco diluições da amostra por um período de 48 horas, com o efeito tóxico agudo sendo determinado através da perda da capacidade natatória dos organismos (imobilidade). A série de diluições foi de 100, 75, 50, 25 e 10%, ou seja, a amostra de água foi diluída na água de diluição, gerando os percentuais de concentração da amostra citados. O ensaio é considerado válido quando o percentual de imobilidade dos organismos no controle não excede 10% (ABNT/NBR 12713, 2009).

O resultado é expresso como FT, e deve ser determinado através da observação direta da mobilidade dos organismos na série de soluções teste, esse resultado é expresso em número inteiro (ABNT 12713, 2009), e é igual ao fator de diluição da solução-teste (KNIE;LOPES, 2004).

O Fator Diluição para Daphnias - FT_D - é a primeira diluição da série do teste, onde pelo menos 90% dos organismos mantiveram sua capacidade natatória (mobilidade), ou seja, de 30 organismos expostos nas três réplicas, se 27 permanecerem com mobilidade o FT_D =1. Esse FT_D corresponde a menor diluição da amostra onde não ocorreu imobilidade superior a 10% dos organismos testados (KNIE; LOPES, 2004).

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizados recém-natos provenientes de um mesmo lote de matrizes com tempo de vida inferior a 45 dias. O ensaio ocorreu em triplicata com 10 organismos adicionados em cada béquer, além de um controle, também organizado em triplicata.

O volume de solução teste utilizado para os testes com a matriz água foi de 50 mL. Para o início do teste, os recém-natos foram separados das matrizes e alimentados com 10 mL de *D. subspicatus*, a uma densidade algal de 10^6 a 10^7 células/mL, uma hora antes de seu uso para o teste. Os organismos foram inseridos nos testes, da maior para a menor diluição, com o auxílio de uma peneira. Os béqueres foram colocados aleatoriamente na bandeja de teste, cobertos com tampa transparente e incubados sem fotoperíodo por 48 horas, e a temperatura entre 18 a 22°C.

3.5.1.3 Ensaio agudo com *D. magna* com a matriz sedimento

Para os testes com as amostras de sedimento, foi utilizada a proporção de 1:4 (v:v), de 10 mL de sedimento, aferindo-se com água de diluição, preparada conforme ABNT/NBR12713 (2009), para 50 mL. Para o grupo controle foi utilizado o sedimento proveniente do ponto referência (P4), que de acordo com Brandão (2011) corresponde a um tipo de amostra o menos impactado possível em relação aos pontos em análise. Ainda citando Brandão (2011), a coleta do sedimento referência deveria ser realizada dentro da área de estudo, ou ainda, coletada dentro da mesma bacia de onde provieram as amostras analisadas.

As características desse teste agudo com a matriz sedimento, relacionadas a temperatura, fotoperíodo, ausência de alimentação e tempo de duração, foram idênticas as do teste agudo com água (ABNT/NBR12713, 2009).

3.5.1.4 Ensaio crônico com *D. magna* com a matriz água

A metodologia utilizada foi segundo os protocolos apresentados por Jonczyk e Giron; (2005) e OECD (2008), com adaptações com relação ao período de troca da amostra, a cada dois dias, M4 como água de diluição, e com o volume de alimentação ofertada, 500µL/dia de *D. subspicatus,* a uma densidade algal de 10^6 a 10^7 células/mL.

O objetivo do teste foi avaliar se uma determinada amostra gera efeito na reprodução (multi-geracional) do organismo em análise por um período de 21 dias.

As variáveis analisadas nos ensaios crônicos foram: longevidade, número de posturas e número de filhotes produzidos por fêmea. A longevidade é o tempo de vida do organismo no curso do ensaio.

Foram utilizados filhotes provenientes de um mesmo lote, portanto, com mesma idade e condições de cultivo. Esses organismos não provinham da primeira ninhada do lote progenitor. As condições diárias de teste foram com fotoperíodo, sendo 16 horas de claro e 8 horas de escuro, e a temperatura

variando de 18 a 22 °C (JONCZYK; GIRON, 2005; OECD, 2008), mantido em incubadora (Figura 12).

Figura 12 - Testes com ensaio crônico mantidos em incubadora de cultivo, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo.
Fonte: Autoria própria.

As amostras da matriz água, nos testes crônicos, foram testadas nas diluições: 100%, 75%, 50%, 25% e 10%. Para as diluições de 75%, 50%, 25% e 10%, a amostra foi diluída em M4 (JONCZYK; GIRON, 2005; OECD, 2008). Como existiu um número elevado de réplicas por campanha, e o laboratório não dispunha de espaço físico na incubadora de testes para que todos os ensaios ocorressem de uma só vez, os testes foram desenvolvidos em duas etapas. Na primeira etapa foram desenvolvidos os testes com as amostras a 100%, 75% e 50%, e na segunda etapa foram desenvolvidos os testes com a 25% e 10%. O desenvolvimento desses testes ocorreu em paralelo com os controles. Como houve duas etapas para cada série de testes, existiram também dois controles, cada um acompanhando cada uma destas etapas. Em cada uma das dez réplicas foi exposto um organismo recém-nato a 50 mL de volume de amostra nas diluições testadas (Figura 13). Os béqueres foram dispostos em bandejas de teste, aleatoriamente.

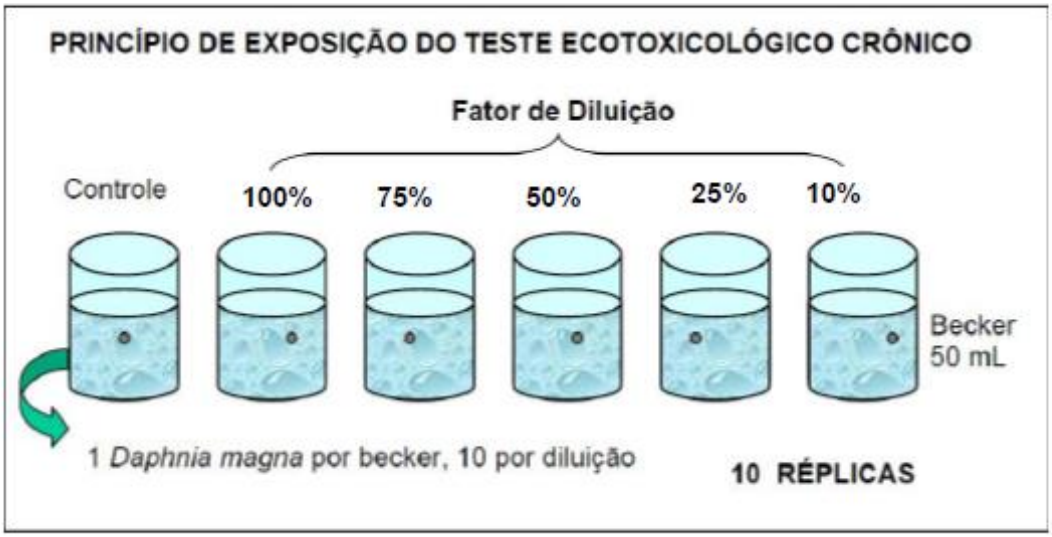


Figura 13 - Representação esquemática do desenho experimental dos ensaios crônicos com *D. magna*, 10 réplicas com um grupo controle de comparação, e 10 réplicas com amostras de água, onde cada organismo foi inserido individualmente. Fonte: Bertrano, 2009 (adaptado).

O desenvolvimento dos testes foi semiestático com renovação da amostra a cada 48 horas. A temperatura da amostra a ser substituída não diferia mais do que ±2°C em relação à temperatura da incubadora de teste. O lugar de cada béquer na bandeja também foi trocado de forma aleatória a cada troca. Para essa renovação da amostra teste ou do M4 (no caso do grupo controle), o organismo foi momentaneamente trocado de béquer, sendo retirado com uma pipeta de vidro encaixada em um “Pump” foi inserido no béquer com a nova amostra teste ou M4 novo (Figura 14). Nesse instante os filhotes foram retirados e contados, a amostra antiga descartada, era realizada a limpeza do béquer, com uma gaze embebida em água destilada, e imediatamente o organismo era devolvido ao béquer original. A cada 24 horas foi ofertado como alimento uma solução de 500µL de alga *Desmodesmus subspicatus* em Meio CHU, na densidade algal de 10^6 a 10^7 células/mL. A bandeja de testes foi fechada com uma tampa que permitia a passagem de luz, e então colocada novamente na incubadora.

Figura 14 - Renovação do M4 e contagem dos filhotes no ensaio crônico com o auxílio da pipeta e "Pump".
Fonte: Autoria própria

3.5.1.5 Ensaio crônico com *D. magna* com a matriz sedimento

Os testes com sedimento integral seguiram o método desenvolvido por Terra et al. (2008). O sedimento foi utilizado na proporção de 1:4 (v:v), sendo 10 mL de sedimento, aferindo-se com M4 para 50 mL. Não foram realizadas diluições, e o sedimento não foi renovado, apenas o M4 a cada dois dias. Tomou-se o cuidado de no momento da troca causar a menor perturbação possível no sedimento para não ressuspendê-lo.

O processo de renovação do M4, contagem dos organismos gerados, limpeza do béquer e alimentação seguiram os mesmos detalhes já mencionados para o teste crônico com as amostras de água. Não há norma técnica para teste crônico com sedimento integral.

Para o registro da primeira postura, tanto do teste com as amostras de água como com as amostras de sedimento, os organismos foram observados diariamente, a partir do início do teste. Após o registro da primeira postura, as observações foram realizadas a cada 48 horas, onde foram registradas sobrevivência, número de posturas e número de prole gerado por fêmea. Os registros foram realizados nos momentos da renovação das amostras de água e/ou M4 (no caso dos testes com o sedimento).

Os juvenis produzidos por adultos que morreram durante o ensaio foram excluídos dos cálculos, o número de posturas é a quantidade de posturas

realizada por uma fêmea no período de 21 dias, e o número de filhotes é a contagem de filhotes produzidos por fêmeas, que permaneceram vivos ao término do ensaio.

3.5.2 Cultivo do *C. sancticaroli*

Os organismos *C. sancticaroli* foram cultivados em uma sala da UTFPR sem climatização, sendo utilizada a metodologia de Fonseca e Rocha (2004) com algumas adaptações, como o uso de termostato para o aquecimento da água e a alimentação exclusivamente com ração Tetramim ® moída na proporção de 0,04 mg/mL a cada 2 dias para todos os instares. O meio de cultivo utilizado (ANEXO C, Tabela C1) é o de Dornfeld (2002), bastante semelhante ao de Fonseca e Rocha (2004).

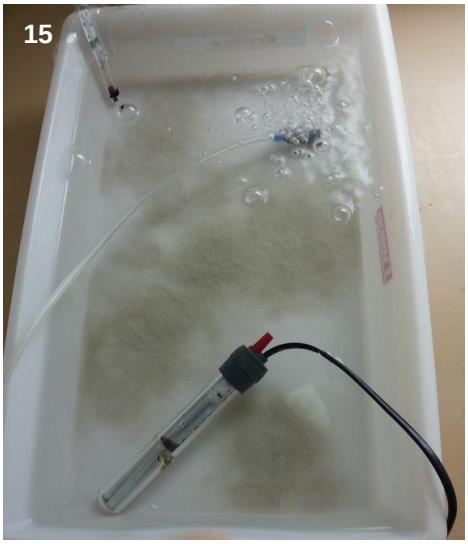
O cultivo foi iniciado em março de 2013 com uma quantidade pequena de massas ovígeras doadas pelo Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Essas massas foram depositadas em um aquário, com volume de 27L, cerca de 2 cm de areia para substrato de aquário autoclavada. Foram adicionados 18L de água de cultivo, preparada conforme Dornfeld (2013). O aquário foi coberto por uma rede de voal com zíper para evitar a fuga dos indivíduos adultos alados. Uma vez por mês foi realizada a troca parcial da água de cultivo do aquário.

Desse aquário foram retiradas massas com até 24 horas de vida, colocadas em bandejas plásticas de 45x35x6 cm contendo 4L de água de cultivo e uma camada areia de sílica (Sigma Aldrich®), com medida o suficiente para cobrir parte do fundo da bandeja (Figura 15 e 16). Foi colocada uma gaiola entomológica sobre o cultivo para evitar a fuga dos indivíduos adultos alados. A cada dois dias, cada bandeja recebeu um volume de 2 litros de água de cultivo, devido a vaporização da água de cultivo.

Após a postura dos mosquitos, duas massas foram colocadas em uma nova bandeja com uma quantidade de areia suficiente para cobrir o fundo, facilitando o controle da seleção das larvas para os testes. A partir da data de postura dessa massa eram contados os dias para determinar o instar da larva e

obter o período de vida desejada para as larvas destinadas aos testes agudos e crônicos.

Em todas as bandejas e no aquário foram controladas as condições de pH e oxigênio. O pH da água de cultivo é de aproximadamente 7,6 e oxigênio dissolvido acima de 80%.



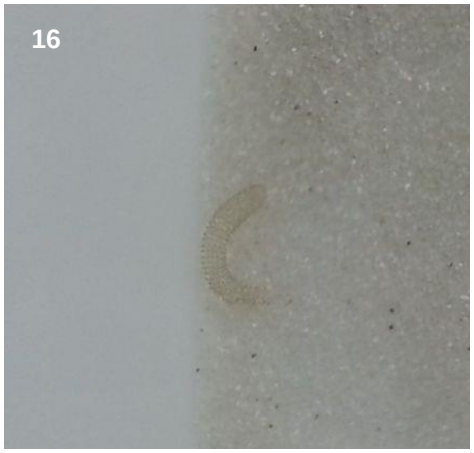


Figura 15 - Organização da bandeja de cultivo dos organismos destinados à produção de organismos para testes.
Figura 16 – Detalhe das massas retiradas do cultivo na bandeja para o desenvolvimento de organismos teste.
Fonte: Autoria própria.

As condições de temperatura, aeração, fotoperíodo e alimentação foram as mesmas para o aquário e as bandejas. A temperatura do aquário e bandejas foi mantida entre 23 a 26°C, controlada com um com termostato modelo HT 1900 - Roxin. A aeração foi branda, mantida com um compressor de ar Big Air A320 – Atman, a água de cultivo foi estocada em barrilete de PVC, também com aeração constante, e o fotoperíodo foi de 12 horas. Para a alimentação foi ofertada ração Tetramim ® moída, na proporção de 0,04 mg/mL, a cada 2 dias, em todos os instares.

3.5.2.1 Teste de sensibilidade para *C. sancticaroli*

Este teste permitiu avaliar a sensibilidade das culturas de *C..sancticaroli* em relação a uma substância de referência, gerando informações sobre a qualidade das culturas em relação à resposta frente aos toxicantes. O método não é padronizado no Brasil, o protocolo utilizado para o desenvolvimento desse teste foi o descrito por Dornfeld (2006) com água de cultivo sendo utilizada também como água de diluição, onde foram expostos 6 organismos por réplica em um volume de 200 mL de solução teste de cloreto de potássio (KCl), totalizando três réplicas por concentração de solução teste. As concentrações utilizadas foram: 1,5; 2,25; 3,5; 5; e 7,5 mg/L (FONSECA, 1997). Os organismos utilizados correspondiam ao IV instar e foram inseridos individualmente com o auxílio de uma pipeta pasteur nos béqueres, contendo um volume de solução teste. Foram realizados um total de dez ensaios entre março e agosto de 2013. O tempo de exposição à substância referência foi de 4 dias e não foi ofertada alimentação, além disso, também não foi adicionado o sedimento, apenas a solução teste. O ensaio foi mantido em câmara incubadora com fotoperíodo de 12 horas e temperatura entre 23 a 27°C. Os resultados de imobilidade são gerados em CE_{50}.

Após os resultados de ensaios, a CE_{50} média foi calculada através do mesmo método apresentado para *D. magna*. Foram calculados a média da $CE_{50,}$ o desvio padrão, os limites superior e inferior de confiabilidade (a média somada a dois desvios padrões e a média subtraída de dois desvios padrões), com intervalo de confiança de 95%, sendo que no cálculo da regressão linear da CE_{50}, foi utilizado o software Excel ®, versão 2010, (APÊNDICE A, Figura A2).

3.5.2.2 Ensaio agudo com *C. sancticaroli* com a matriz sedimento

Nesse teste foi avaliada apenas a imobilidade dos organismos testados em relação aos três sedimentos teste e um sedimento controle, composto por sedimento de areia de sílica (Sigma-Aldrich ®). A proporção dos sedimentos teste (v:v) foi de 10 mL de sedimento para 40 mL de água de cultivo, essa água é a

mesma já descrita para o cultivo dos organismos. O desenho experimental utilizado foi proposto Santiago (2012), sendo constituído por dez réplicas no IV instar, com oferta de alimentação a cada 2 dias, composta por ração Tetramim ® moída na proporção de 0,04 mg/mL e tempo de duração de 4 dias. Não houve aeração, o teste foi desenvolvido dentro de uma incubadora com temperatura variando de 23 a 27°C e fotoperíodo de 12 horas.

3.5.2.3 Ensaio crônico com amostras de sedimento com *C. sancticaroli*

Nesse teste foi avaliada (Figura 17) a imobilidade e o desenvolvimento dos organismos, através da medida total do comprimento do corpo, para os três sedimentos teste em comparação a um sedimento controle, composto por sedimento de areia de sílica. A proporção dos sedimentos teste (v:v) foi de 10 mL de sedimento para 40 mL de água de cultivo, essa água é a mesma já descrita para o cultivo dos organismos. O desenho experimental utilizado foi o mesmo proposto Santiago (2012) já mencionado nos ensaios agudos, sendo constituído por dez réplicas de organismos no II instar, com oferta de alimentação a cada 2 dias, composta por ração (Tetramim ®) moída na proporção de 0,04 mg/mL e tempo de duração de 8 dias. Não houve aeração, o teste foi desenvolvido dentro de uma incubadora com temperatura variando de 23 a 27°C, e fotoperíodo de 12 horas.

A expressão dos resultados foi realizada através da determinação da ocorrência da letalidade e comparação das médias do crescimento entre os organismos nos sedimentos teste em relação ao do grupo controle.

Figura 17 - Preparação dos testes crônicos com o sedimento, à esquerda o grupo controle e a direita um dos sedimentos testados. Fonte: Autoria própria.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A REGIÃO ANALISADA

As amostras de água e sedimento analisadas são provenientes de três pontos de coleta localizados no Rio Atuba. Trata-se de um rio de drenagem urbana, que é utilizado em parte como assimilador de esgoto industrial, recebendo efluentes tratados de uma estação de tratamento de esgotos domésticos e como elemento integrador da harmonia paisagística (MARIN et al., 2007). O processo de tratamento do esgoto utilizado pela ETED é o de biodegradação anaeróbica pelo Reator Anaeróbico de Manto de Lodo e Fluxo Ascendente – RALF (FRANCO, 2010). Outro fator que agrega ainda mais à contaminação do rio por efluentes domésticos é o fato de que há várias ocupações irregulares nas margens, contribuindo com a descarga de esgoto doméstico bruto no rio (HELLER, 2002). Além desses elementos, é uma região que apresenta inexistência de mata ciliar. Havendo, inclusive, pontos ao longo das margens onde não ocorre coleta de lixo. É um local totalmente descaracterizado no que tange ao solo, flora, fauna, qualidade e volume de água (RACHWAL; CAMATI, 2001). Tanto as ocupações irregulares, como a falta de mata ciliar são elementos presentes nos três pontos amostrais do desenvolvimento do presente estudo.

O rio Atuba pertence à bacia do Atuba, localizada no primeiro planalto paranaense, na porção nordeste do município de Curitiba, estendendo-se por Colombo, Pinhais e São José dos Pinhais. Essa bacia é considerada a segunda mais urbanizada de Curitiba, com uma intensa densificação urbana e degradação ambiental nos últimos trinta anos. O rio pertence à bacia hidrográfica do Rio Iguaçu (NUNES, 2007), que apresenta 32 km de extensão, sendo sua área de drenagem de 126 Km^2.

O Rio Atuba é classificado pela Portaria nº 20 (1992) da SUREHMA, atual Instituto das Águas do Paraná, como rio de classe 2. Segundo ÁGUAS PARANÁ (2012), há uma proposta para reenquadramento de todo o rio e seus afluentes, da

sua nascente até a sua foz, para classe 4. Inclusive na região da confluência dos rios Irai e Atuba, onde “nasce” o Iguaçu, também seria classificado como classe 4.

O IAP-PR realiza o monitoramento de dois pontos ao longo de todo o rio Atuba, a jusante do córrego Monjolo, em Colombo, e no terminal Afonso Camargo, em Curitiba. No último relatório divulgado, com o período de monitoramento entre abril de 2005 a fevereiro de 2009, foram avaliados Oxigênio Dissolvido (OD), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO) Fósforo Total (PT), Nitrogênio Amoniacal (NAT), *Escherichia coli* e toxicidade aguda para *D. magna*. Como resultado do AIQA (Avaliação Integrada da Qualidade de Água), a sub-bacia oscila entre poluída e muito poluída, o que indica que os pontos monitoradas estão fora da classe 2, enquadrando-se na classe 4 (IAP, 2009). A preponderância da classe 4 para esses pontos, já foi detectada em 1992 (IAP, 2009).

4.2 OD, TEMPERATURA DA ÁGUA E pH

Os resultados dos parâmetros avaliados *in situ* do pH, OD e temperatura t em ^{o}C, para cada ponto de coleta (Pc), em cada uma das campanhas (Cp), assim como suas médias e desvios padrões, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos avaliados *in situ*.

Pc	Cp	pH	OD (mg/L)	Temperatura (°C)
1	1	8,51	3,79	27,8
1	2*	7,16	2,94	17,5
1	3	6,67	2,74	14,7
Média		7,45	3,16	20
DP		1,35	0,46	5,63
2	1	8	1,83	25
2	2*	6,62	1,53	18
2	3	6,5	1,27	15,3
Média		7,04	1,54	19,4
DP		0,68	0,23	0,41
3	1	6,28	1,29	25
3	2*	6,93	1,39	18,2
3	3	7,12	2,65	11,4
Média		6,777	1,7767	18,2
DP		0,36	0,61	5,56

Legendas: Pc: ponto de coleta; Cp: campanha; 1: verão; 2: outono; 3: inverno;
***: chuva no momento da coleta.**

A concentração de oxigênio dissolvido apresentou-se bastante reduzida em todas as amostras, com valor mais elevado de 3,79 mg/L, no ponto 1 – na primeira campanha, e o mais baixo de 1,27mg/L, no ponto 2 – na segunda campanha. A variação do nível de OD ocorreu tanto em épocas da estação quente quanto fria. Segundo Esteves (1988), Fernandes e Rantin (1989); Cunha e Ferreira (2006) e Froehner e Martins (2008) as substâncias orgânicas provenientes de esgotos domésticos brutos ou efluentes insuficientemente tratados, lançados em ambientes aquáticos, promovem modificações na qualidade da água. A redução do oxigênio dissolvido decorre da oxidação da matéria orgânica pelos decompositores. Outra questão a ser considerada é que o rio Atuba, no período de desenvolvimento das duas primeiras coletas (verão e outono), sofreu processos de dragagem no ponto 2, o que implica em ressuspensão do material depositado no sedimento, promovendo sua decomposição e consequente redução do oxigênio dissolvido na água.

O pH variou entre 6,28 no verão – ponto 3 a 8,51,verão – ponto 1. Também não foi verificada relação entre as variáveis temperatura e pH. As maiores variações de pH foram registradas na mesma época sazonal, em uma mesma campanha, em pontos amostrais diferentes, com um intervalo de tempo pequeno.

4.3 DQO, DBO_5, PT E NAT

Os resultados dos ensaios para DQO, DBO_5, PT e NAT estão apresentados na Tabela 2, 3 e 4, sendo que cada uma das tabelas apresenta um ponto amostral.

Tabela 2 - Ensaios físicos e químicos do ponto 1.

Pc	Cp	pH	OD (mg/L)	T (C°)	DQO (mg O_2/L)	DBO5 (mg O_2/L)	PT (mg/L)	NAT (mg /L)
1	1	8,51	3,79	27,8	89	41	0,38	9,20
1	2*	7,16	2,94	17,5	193	85	2,4	24,60
1	3	6,67	2,74	14,7	134	63	2,02	14,30
Média		7,45	3,16	20	139	63	1,6	16,03
DP		1,35	0,46	5,63	42,53	17,96	0,876	6,40

Legendas: Pc: ponto de coleta; Cp: campanha; 1: verão; 2: outono; 3: inverno;
***: chuva no momento da coleta, DP: Desvio Padrão.**
coleta

Tabela 3 - Ensaios físicos e químicos do ponto 2.

Pc	Cp	pH	OD (mg/L)	T (°C)	DQO (mgO2/L)	DBO_5 (mg O2/L)	PT (mg/L)	NAT (mg /L)
2	1	8	1,83	25	206	55	0,44	9,4
2	2*	6,62	1,53	18	242	66,5	2,2	42,4
2	3	6,5	1,27	15,3	956	102	0,59	15,4
Média		7,04	1,54	19,43	468	74,5	1,08	22,4
DP		0,68	0,23	0,41	345,38	20	0,97	14,35

Legendas: Pc: ponto de coleta; Cp: campanha; 1: verão; 2: outono; 3: inverno;
***: chuva no momento da coleta, DP: Desvio Padrão**

Tabela 4 -Ensaios físicos e químicos do ponto 3.

Pc	Cp	pH	OD (mg/L)	T (°C)	DQO (mg O2/L)	DBO_5 (mg O2/L)	PT (mg/L)	NAT (mg /L)
3	1	6,28	1,29	25	33	13	0,32	7,6
3	2*	6,93	1,39	18,2	113	50	0,67	38,4
3	3	7,12	2,65	11,39	58	21	0,4	8,3
Média		6,77	1,77	18,196	68	28	0,463	18,1
DP		0,36	0,61	5,56	33,42	16	0,15	14,36

Legendas: Pc: ponto de coleta; Cp: campanha; 1: verão; 2: outono; 3: inverno; *: chuva no momento da coleta, DP: Desvio Padrão.

Para o parâmetro DQO não há limite previsto pela Resolução CONAMA nº 357 (2005). A maior concentração de DQO foi 956 mgO_2/L no ponto 3 (Tabela 4) – outono, e a menor foi de 33 mgO_2/L no ponto 1- inverno. Considerando o trabalho de Amaral (2012), onde o maior valor de DBO_5 para efluente tratado de ETE doméstica foi 9,7 mgO_2/L e DQO 47 mgO_2/L, os valores obtidos pelo presente trabalho são elevados, o que confirma a contaminação dos trechos amostrados por efluentes domésticos. A DBO_5 mais elevada foi de 102 mg O_2/L, ponto 3 (Tabela 4) - outono, com chuva nas 24 horas que antecederam a coleta, e a menos elevada foi 13 mgO_2/L, ponto 1(Tabela 2) - inverno. Esses resultados indicam que pode ter ocorrido um teor elevado de despejos de origem orgânica, esgotos sem tratamento ou insuficientemente tratados no rio. O valor mais elevado da DBO_5 em um período de chuva, ponto 2 (Tabela 3) pode estar relacionado ao arraste promovido pela chuva dos materiais orgânicos e inorgânicos em suspensão ou solúveis para os mananciais (BOLLMAN; MARQUES, 2006). A Resolução CONAMA nº 357 (2005) estabelece um limite máximo de DBO_5 de 5 mgO_2/L para rios de classe 2.

Em todos os pontos amostrados (Tabelas 2, 3 e 4), em todas as campanhas, os valores determinado para PT excedem o estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357 (2005), que determina que a concentração deve ser até 0,15 mg/L. O NAT apresentou valores elevados em relação aos limites permitidos pela Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005), que determina para amostras com pH variando entre 8 a 8,5, o limite de 2,2 mg/L N. Para as amostras com pH menor igual a 7,5 o limite é de 13,3 mg/L N, tanto para as amostras com pH variando entre 8 a 8,5, como em amostras com pH menor igual

a 7,5, os limites foram violados. Os valores elevados de PT e de NAT em associação com a redução do OD podem estar atrelados à poluição por esgotos domésticos (ESTEVES, 1988; VON-SPERLING, 1996).

Foi realizada uma bateria de testes com amostras de água provenientes do ponto utilizado como sedimento referência (P4), para caracterizar o ponto como uma área que pudesse ser utilizada como referência, no sentido de apresentar baixos índices de DQO, DBO_5, PT e NAT (Tabela 5). O PT e NAT estão dentro dos limites estabelecidos para rios da classe 2. Como o pH é inferior a 7,5 o limite é de 13,3 mg/L N para NAT, esse parâmetro está dentro dos limites para rios de classe 2.

Tabela 5 - Análises físicas e químicas de água, ponto do sedimento referência (P4).

Pc	pH	OD (mg/L)	T (°C)	DQO (mgO_2/L)	DBO_5 (mg O_2/L)	PT (mg/L)	NAT (mg /L)
4	7,2	6,00	28	21	3	0,05	3,7

Legendas: Pc: ponto de coleta 4: ponto do sedimento referência.

4.3 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

Os resultados dos ensaios microbiológicos para Coliformes termotolerantes e para a presença de *E. coli*, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Ensaios para Coliformes Termotolerantes e presença de *E. coli* nas amostras.

Campanha	Ponto Amostral	Temperatura da água (°C)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)	Presença de *E. coli*
1	1	27,8	3.300.000	SIM
1	2	25	7.900.000	SIM
1	3	25	7.900.000	SIM
2*	1	17,5	70.000.000	SIM
2*	2	18	70.000.000	SIM
2*	3	18,2	540.000.000	SIM
3	1	14,7	310.000	SIM
3	2	15,3	4.600.000	SIM
3	3	11,39	4.900.000	SIM

Legenda: * Chuva Recente.

As análises para o número mais provável da concentração de bactérias do grupo termotolerantes obteve os maiores índices na coleta do outono, onde ocorreu chuva nas últimas 24 horas que antecederam a coleta. O NMP foi de 7 $X10^7$NMP/100mL a montante e no ponto da ETE, e 5,4 $X10^8$, no rio Iguaçu. Os menores valores foram na coleta realizada no inverno, 3,1$X10^5$ a montante e 4,9 X 10^6 observados no rio Iguaçu. No verão os valores do ponto da ETE igualaram-se aos do rio Iguaçu em 7,9$X10^6$. Os valores citados são bastante elevados. Para Esteves (1988), Fernandes e Rantin (1989); Cunha e Ferreira (2006), Froehner e Martins (2008) e Duarte (2011), valores elevados de coliformes termotolerantes como os apresentados nesse trabalho representam indicativos de contaminação por descargas de esgoto bruto ou insuficientemente tratado.

Foi realizado um teste de Coliformes termotolerantes no ponto do sedimento referência, o resultado do NMP foi de 1$X10^3$/100mL, foi confirmada a presença da *E. coli* pelo reativo de Kovac´s. Esse resultado indica um valor baixo de bactérias termotolerantes presentes na água, e um baixo índice de contaminação por coliformes.

4.4 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDXRF)

Foi realizada a EDXFR com os sedimentos dos pontos coleta, com as amostras da segunda e terceira campanha. Para o sedimento referência foi realizada a análise apenas com a amostra da última campanha. Durante o teste de EDXFR foram gerados relatórios que apresentam quais os elementos químicos identificados, sua concentração na amostra, e um percentual que refere-se aos óxidos, todo e qualquer elemento que o equipamento não identifica no sedimento analisado. Os resultados qualitativos, que referem-se aos elementos químicos encontrados em todos os pontos, estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7 - Análises de sedimento qualitativas.

PC	Campanha	Elementos químicos encontrados
P4	3	Al, Si, P, S, Rh, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn
P1	2	Al, Si, P, S, Rh, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Co
P1	3	Al, Si, P, S, Rh, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Ge
P2	2	Al, Si, P, S, Rh, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Sm, Cu
P2	3	Al, Si, P, S, Rh, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Sm
P3	2	Al, Si, P, S, Rh, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn
P3	3	Al, Si, P, S, Rh, K , Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Ge, Sm

Legendas: Pc: Ponto de coleta, Al: alumínio, Si: silício, P: fósforo, S: enxofre, Rh: ródio, K: potássio, Ca: cálcio, Ti: Telúrio, Cr: cromo, Mn: manganês, Fe: ferro, Zn: zinco, Co: cobalto, Ge: germano, Sm: samário, Cu: cobre.

Os elementos relacionados na Tabela 7 são aqueles que aparecem de forma majoritária, o que não significa que as amostras não contenham outros elementos químicos, mas sim que houve um percentual que não pode ser identificado através da técnica. Não é possível obter, através do EDXR, concentrações de elementos traço.

Como pode ser observado na Tabela 7, todos os pontos possuem similaridades na composição química de seus sedimentos, sendo os elementos Co detectado apenas na campanha 3 do sedimento no P1, o Ge detectado na campanha 3, no ponto 1 e 3, samário sendo detectado nas campanhas 2 e 3 no ponto 2 e campanha 2 no P3, o Cobalto foi detectado apenas na campanha 2 , P2. O samário, segundo Licht (2001) existe naturalmente na bacia de Curitiba na forma de óxido de samário (Sm_2O_3). Não é possível inferir se esse elemento proveio de fontes antrópicas.

Através da carta de solos do Estado do Paraná (Figura 18), foi possível definir quais eram os tipos de solos presentes nos pontos amostrados. Os elementos químicos caracterizados em P4, como ferro que forma os óxidos de ferro, alumínio, que forma a caulinita e gibsita, são típicos dos argissolos vermelho-amarelo. Os pontos P1, P2 e P3 apresentam organossolo háplico, sendo constituído de material orgânico de coloração preta, resultantes de

acumulação de restos vegetais, em graus variáveis de decomposição (EMBRAPA, 1999). A composição química dos sedimentos P4, P1, P2 e P3 é bastante semelhante.

A composição de uma amostra de sedimento de drenagem é bastante variada e depende de fatores como a composição geológica e pedológica da área fonte, da topografia, dos perfis de solo, do tipo de clima predominante, do tipo e da intensidade da cobertura vegetal da bacia e do tempo de atuação dos processos físicos, químicos e biológicos (LICHT, 2001). Não existem estudos que apresentam uma completa caracterização mineralógica dos solos do Paraná. O intuito da análise de EDXR foi apenas demonstrar que os sedimentos analisados apresentavam composições químicas semelhantes.

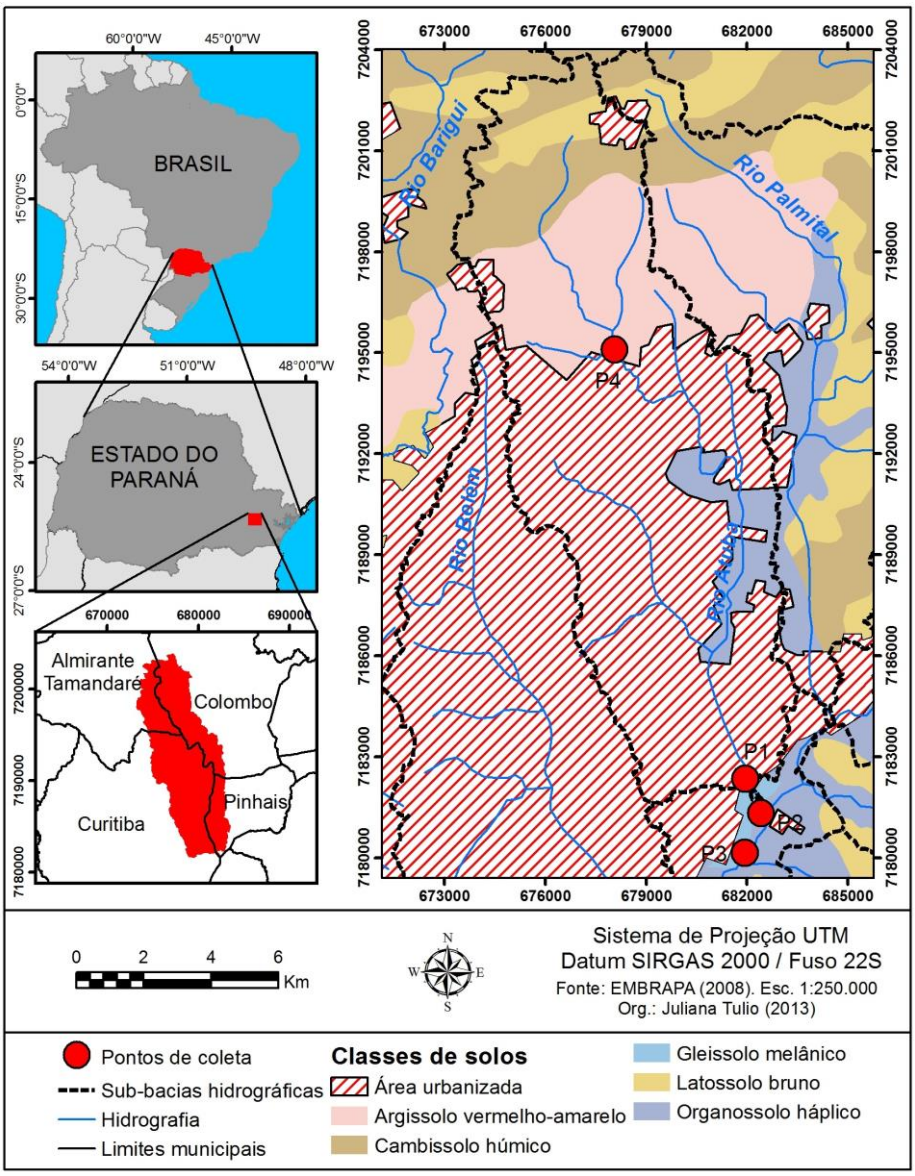


Figura 18 - Carta pedológica do Estado do Paraná.
Fonte: MINEROPAR (2013) adaptado.

4.5 TOXICIDADE AGUDA PARA *D. magna*

4.5.1 Sensibilidade ao dicromato de potássio

As concentrações teste para o teste de sensibilidade com a substância de referência dicromato de potássio foram: 0,94; 0,85; 0,76; 0,68; 0,55; 0,50 e 0,40 mg/L. O valor médio da CE_{50} foi de 0,95 mg/L e o desvio padrão foi de 0,085. Esse resultado enquadra-se na faixa recomendada pela ISO 6341, entre 0,6 e 1,7 mg/L, o que garantiu que os recém-natos utilizados estavam em condições aceitáveis de sensibilidade para o desenvolvimento dos testes, gerando, portanto resultados aceitáveis. O pH do M4 foi mantido entre 7,6 a 8, a dureza de 175 a 225 mg/L de $CaCO_3$, a água de diluição manteve o pH entre 7,8 e 8, a dureza de 250 a 275 mg/L de $CaCO_3$, e alimentação de 500µ/L de solução algácea de *D. subspicatus* em uma densidade algal de 10^6 a 10^7 cel/mL.

O resultado apresentado para CE_{50} média é uma estimativa, e está associado aos valores de pH e concentração de $CaCO_3$ na água de diluição e no meio de cultivo, assim como o volume e tipo de dieta ofertada. O valor pode variar conforme variam essas condições.

Maranho e Nieweglowski (1995) constataram que várias fontes de alimentos e diversos meios de cultura promoveram influência na variabilidade da sensibilidade e consequentemente dos resultados dos testes interlaboratoriais de toxicidade com *D. magna*, ou seja, a sensibilidade foi alterada em decorrência da variação dos tipos de dieta e da qualidade e do meio de cultura.

Seco-Gordillo et al. (1998, citado por BEATRICI et al., 2006) concluíram que a natureza do meio utilizado para o ensaio, tipo de água, pH, índice de $CaCO_3$, influenciam na condutividade, e as condições de cultivo, como causas da obtenção de diferentes respostas de *D. magna* para alguns metais pesados, do dicromato de potássio.

Da Cunha et al. (2003) desenvolveram análises de sensibilidade com o dicromato de potássio no período de 2000, 2001 e 2002, constatando uma variação entre 1,08 mg/L, 0,95mg/L e 0,90 mg/L, para os respectivos anos. A interpretação inicial dos resultados dos testes de sensibilidade indicaram que a

sensibilidade estava aumentando ao longo do tempo, porém quando foi aplicada a análise de variância, ANOVA, foi constatado que não houve diferenças significativas nos resultados com nível de significância p=0,05. Não foi registrado no desenvolvimento das análises o pH e o índice de dureza.

Beatrici et al. (2006) concluíram que diferentes condições de cultivo podem influenciar a produtividade e sensibilidade da *D. magna*. Foi testada a sensibilidade quando cultivada em M4 e em meio ISO, as variações foram de 1,10 mg/L a 1,68 mg/L em M4 e 0,43 mg/L a 1,22 mg/L, sendo mais resistente quando cultivada em M4.Também foi demonstrado que a alimentação influenciou a sensibilidade, pois foram ofertadas dietas de *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de 1,5X10 céls.mL/L, *Scenedesmus subspicatus* na concentração de 10^6 céls/mL, uma combinação das duas algas mencionadas, *S. subspicatus* com o alimento composto de truta fermentada, e combinação de *S. subspicatus* com artemia fermentada. A dieta com *S. subspicatus* influenciou, gerando faixas de sensibilidade de 0,43 a 0,87, quando combinadas ao meio ISO.

4.5.2 Toxicidade aguda para a matriz água

Todos as amostras de água, em todas as campanhas, obtiveram o mesmo resultado para análise de água para todas as concentrações testadas, o FT_D foi 1, ou seja, as amostras não apresentaram toxicidade para *D. magna*. Esses resultados estão de acordo com Mendonça et al. (2008), porém, testando amostras de águas residuais. O controle, exposto apenas a água de diluição, obteve 0% de imobilidade, o que garantiu a validade do teste.

Os resultados estão de acordo com os de Marzio (2005), Maluf (2008) e Henrique (2010) que também não encontraram toxicidade aguda para *D. magna* de amostras sob influência de efluentes domésticos. Em uma comparação com os resultados de Hamada (2008), os resultados podem ser considerados bastante semelhantes, pois, no trabalho de 2008 com efluente tratado, Hamada (2008) observou amostras com indícios de toxicidade, ou sem toxicidade aguda para *D. similis*. Considerando os trabalhos de Hernando et al. (2005), Mohavdien et al. (2005) e Costa (2007), trabalhos realizados com efluentes tratados, o resultado

diverge. Ambos encontraram toxicidade aguda, porém trabalharam com amostras de efluente puro e não dissolvido no corpo receptor. O mesmo resultado foi observado nos resultados de Amaral (2012), nos quais foram detectadas ecotoxicidade aguda em três coletas realizadas com o efluente.

4.5.2.1 Testes de toxicidade aguda com amostras de água preservadas por refrigeração e congelamento

Foram desenvolvidos testes comparativos de toxicidade aguda entre amostras de água preservadas por congelamento por 15, 30 e 45 dias e amostras refrigeradas. Todos os testes desenvolvidos, com os dois métodos de preservação, geraram o mesmo resultado, FT_D = 1. Dessa forma, para as amostras de água superficial contaminadas com esgoto bruto ou efluente de ETED, não houve influência dos métodos de preservação em relação à toxicidade das amostras testadas. Esse resultado está em concordância com o trabalho de Aragão e Bertoletti (2006), que também testaram a toxicidade de amostras preservadas por refrigeração e congelamento com *Ceriodaphnia dubia*, porém as amostras testadas provinham de água superficial, não sendo mencionado se eram contaminadas com esgotos ou outros tipos de efluentes.

4.5.3 Toxicidade aguda para a matriz sedimento

Para o sedimento foi testada apenas uma proporção de sedimento para cada amostra, que não expressou efeito tóxico em 48 horas. Todos as amostras de sedimento, em todas as coletas, obtiveram o mesmo resultado para análise de água, o FT_D foi 1. O controle, realizado com o sedimento proveniente do ponto referência (P4), não apresentou toxicidade aguda para *D. magna*, com 0% de imobilidade, o que garantiu a validade do teste.

Os resultados apresentados demonstram que em 48 horas, as amostras não causaram efeito nos organismos.

O resultado encontrado contraria, em parte, o trabalho de Santos (2008), no qual algumas das amostras dos elutriatos promoveram efeito tóxico em 48 horas de exposição para *D. magna*. Porém, os resultados do presente estudo concordam com os obtidos por Terra et al. (2008) que apontam que o sedimento integral não promoveu efeito tóxico em 48 horas para todas as amostras, permanecendo essa maioria em um limite de 80% de sobrevivência, após as 48 horas. Para Terra et al. (2008), das oito amostras, apenas duas foram tóxicas. Tratavam-se de amostras sob influência de esgoto sanitário e industrial, lixo, refinaria, mineração de areia e navegação. Os resultados do presente estudo não concordam com os resultados apresentados por Marzio et al. (2005), no que se refere aos testes de toxicidade com sedimento, onde o organismo testado foi a *H. curvispina.* Ocorreu expressão da toxicidade para as amostras de sedimento, porém trata-se de um Amphipoda e não um Cladócero, como a *D. magna*. Geralmente espécies do mesmo grupo apresentam sensibilidade semelhante, organismos de níveis tróficos diferentes, apresentam díspares sensibilidades. Por tratar-se de ordens diferentes de organismos, torna-se difícil uma comparação entre qual é mais ou menos sensível a uma amostra, pois cada gênero tem seu grau de sensibilidade favorável a determinados tipos de amostras (ARAGÃO, ARAÚJO, 2008). Também é inviável comparar qual organismo é mais ou menos sensível a uma substância de referência, pois foi observado que os testes com substâncias químicas forneceram o mínimo sobre as reais condições de organismos teste, utilizados para indicar toxicidade, a sensibilidade é apenas um dos critérios a serem observados (Mc. NULTY et al.,1999). Mesmo com uma mesma espécie exposta a uma substância de referência, onde foi variada a dureza da água de cultivo (MARANHO; NIEWEGLOWSKI, 1995), ou ainda variando-se a composição da água de diluição (BURATINI, 2002), e a composição da água de diluição e alimentação (BEATRICI et al., 2006) foram detectados diferentes resultados para a sensibilidade de um organismo.

4.6 ENSAIOS CRÔNICOS COM *D. magna*

4.6.1 Validação do ensaio crônico com a matriz água

Para Blaise e Férard (2005) e para a OECD (2008), um ensaio crônico com daphnideos é válido quando no controle a mortalidade das matrizes não excede a 20%, ao final do teste. O valor da descendência produzida por matriz viva do controle deve ser superior a 60 indivíduos. A validação dos ensaios foi baseada na norma técnica supracitada, avaliando os critérios de longevidade e reprodução (número de posturas e média de filhotes por matriz). Adicionalmente, a época da 1ª postura também foi avaliada.

Como cada batelada de testes de cada uma das três campanhas foi desenvolvida em duas etapas, devido ao espaço físico disponível na incubadora do laboratório, foram realizados 6 ensaios controle, cada um acompanhando uma série de ensaios crônicos, totalizando as análises de 3 campanhas. Na primeira etapa foram desenvolvidos os testes com as diluições de 100%, 75% e 50% das amostras em M4. Na segunda etapa foram desenvolvidos os testes com as diluições de 25% e 10% das amostras em M4.

Todos os organismos controle apresentaram longevidade de 21 dias. A época da 1ª postura, nesses indivíduos controle, variou em todos os testes. Das 60 réplicas, 31,7% realizaram a postura durante o 6º dia de vida, 40% no 7º dia, 25% no 8º dia e apenas 3,3% no 9º dia. A maioria das posturas concentrou-se entre o 6º e 7º dia. Não ocorreu diferença significativa entre o dia da 1ª postura e estação do ano, sendo provável que esse fato derive de que o cultivo e ensaios ocorreram em câmara incubadora com temperatura e fotoperíodo iguais em todas as três estações do ano, durante a execução de todos os ensaios crônicos (Figura 19).

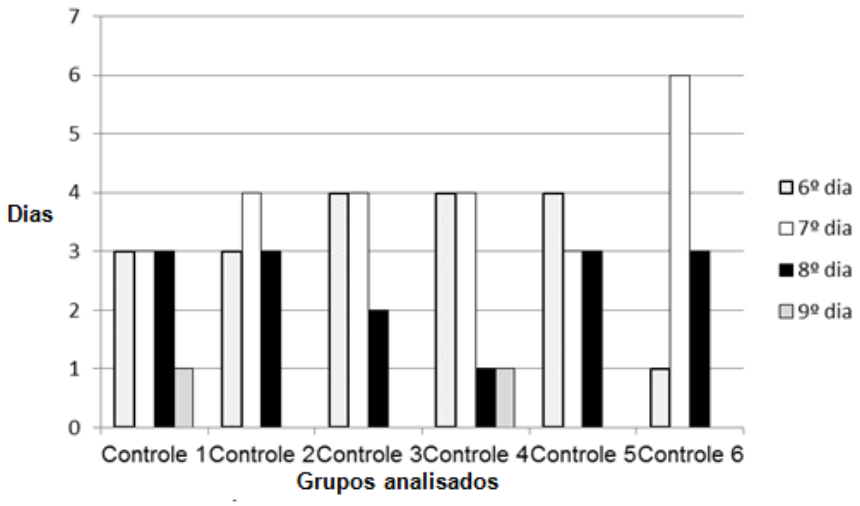


Figura 19 – Épocas onde ocorreram as 1ªs posturas em cada teste.

Os organismos controle produziram um número médio de organismos satisfatório (Tabela 9), dentro do estabelecido por Blaise e Férad (2005) e pela OECD (2008). O número médio da descendência produzida por matriz viva do controle foi superior a 60 organismos e a média por teste, avaliando-se as 10 réplicas, também foi superior a 60 organismos. Esses fatores, agregados a sobrevivência de mais de 80% dos organismos controle, tornam os testes realizados válidos, de acordo com a norma técnica da OECD (2008).

Tabela 8 - Total de filhotes e média de filhotes/indivíduo nos ensaios com grupos controles.

	Total de filhotes	Média de filhotes/indivíduo
Teste 1	1012	101,2
Teste 2	1115	111,5
Teste 3	1165	111,6
Teste 4	1145	114,5
Teste 5	1078	107,8
Teste 6	1224	122,4

4.6.2 Validação do ensaio crônico com a matriz sedimento

A validação dos ensaios foi baseada no trabalho de Blaise e Férad (2005) e na norma da OECD (2008). O desenvolvimento desse tipo de ensaio foi

baseado no trabalho de Terra et al. (2008), que utiliza uma proporção de 10 mL de sedimento teste para 40 mL de M4.

Foram realizados três testes com o sedimento referência, o qual foi comparado com os sedimentos teste. Esse sedimento referência foi coletado em um ponto do rio a montante dos três pontos analisados. A área de onde foi extraído o sedimento referência é uma área com vegetação ripária preservada, onde ocorrem apenas chácaras e não há descarga de origem industrial no rio.

Cada um dos grupos controles acompanhou uma batelada de testes com os sedimentos em análise. Não ocorreram diluições das amostras de sedimento, portanto, cada batelada foi desenvolvida em uma etapa.

Todos os organismos controle sobreviveram ao final de 21 dias, cada organismo teste produziu mais de 60 organismos ao longo de 21 dias, tornando os testes com a matriz sedimento válidos (Tabela 10).

Tabela 9 - Testes desenvolvidos com o sedimento referência para a validação dos ensaios crônicos com amostras de sedimento com o organismo *D. magna*.

	Total de filhotes	Número médio de filhotes/ indivíduo
Teste 1	855	85,5
Teste 2	878	87,8
Teste 3	1235	123,5

4.7 Resultados para toxicidade crônica com *D. magna*

4.7.1 Testes de normalidade

Os dados gerados através da análise dos *end points*: dia da 1ª postura, número de posturas, números de filhotes por réplica e média de filhotes por matriz, obtidos através dos testes crônicos, foram submetidos aos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors para a investigação da normalidade da distribuição dos dados, ou seja, se assumiam características

paramétricas ou não paramétricas. Para essas análises foi utilizado o software estatístico Statistica versão 10.

Através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors foram gerados os valores de “p”, inferiores a 0,01, portanto indicando que os dados seguem uma distribuição anormal, sendo considerados como não paramétricos.

Como a hipótese nula da ANOVA foi rejeitada para todos os *end points*, em todas as campanhas e pontos amostrais, ou seja, houveram diferenças entre as médias dos *end points* obtidas nos diferentes tratamentos em relação ao controle experimental, assumiu-se que os dados eram não paramétricos, o método estatístico escolhido para a comparação das médias de cada grupo, com as médias dos demais grupos foi o de Kruskall-Walis (BURATINI; BERTOLETTI, 2008), também indicado pela OECD(2008).

4.7.2 Testes não paramétricos para comparações múltiplas

Foram utilizados testes com o Kruskall-Walis para comparar as distribuições dos indicadores nos diferentes grupos, seguido por testes de comparações múltiplas, foi utilizado o software R Development Core Team versão 3.0.2 (2013). O intervalo de confiança foi no nível de 95% em cada um dos testes.

4.7.2 Testes de Kruskall-Walis com a matriz água

4.7.2.1 Dia da primeira postura por tratamento

Para as comparações entre o controle e tratamentos, da campanha 1, ponto 1 o valor de “p” foi 0,6632, no ponto 2 foi 0,3861, e no ponto 3 foi de 0,8227, todos esses valores não foram significativos.

Inicialmente foi comparado o 1º dia de postura dos organismos expostos as diferentes amostras e aos diferentes percentuais de tratamentos de amostras,

com os grupos controle, na primeira campanha (Figura 20), onde ocorreu uma pequena assimetria. Todos os controles apresentaram como mediana o 7º dia, sendo que 25% dos organismos desse grupo realizaram a 1ª postura no intervalo no 8º dia, e 25% no 6º dia. Para os tratamentos com a amostra do ponto 1, a mediana concentrou-se entre o 7º e 8º dia. Com os tratamentos nas concentrações de 100%, 75% e 25%, a mediana manteve-se no 8º dia. O tratamento 50% apresentou como mediana o 7º dia, porém, ocorreu a reprodução no 6º dia. Para a concentração de 10%, o valor obtido foi o de 7,5, o que foi considerado como 8º dia.

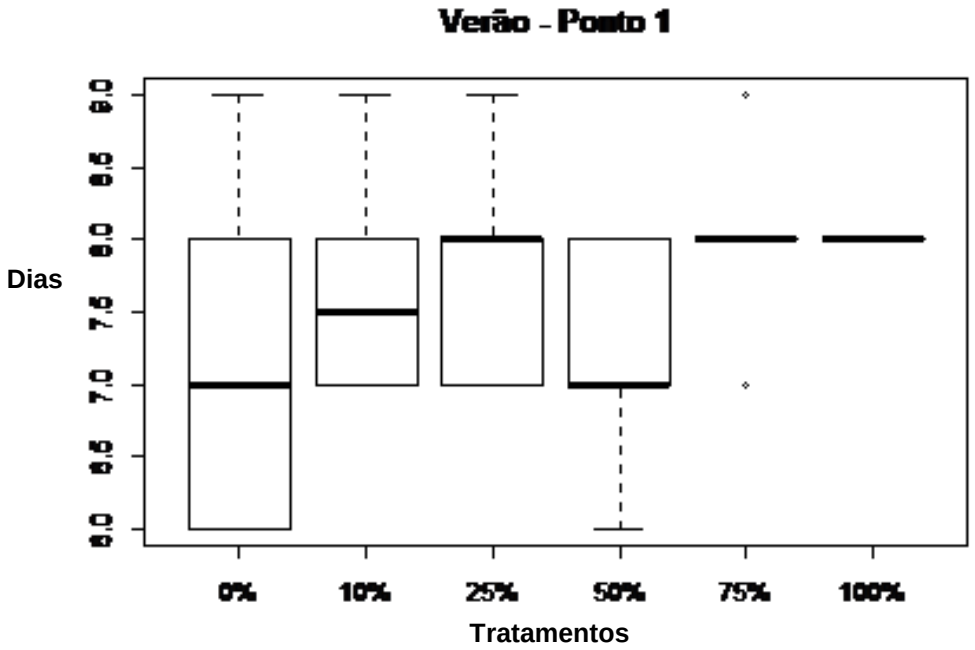


Figura 20- Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para ponto 1, campanha 1 no verão. Os asteriscos representam Outliers, valores atípicos para a relação dos dias das 1ªs posturas e dos tratamentos das concentrações analisadas.

Já para os tratamentos com as amostras do ponto 2 (Figura 21), a mediana variou pouco no ponto 1. Para os tratamentos 10 e 25%, a mediana foi de 7,5, sendo que 25% dos organismos realizaram a primeira postura no 8º dia, e25% no 7º dia. No tratamento 50% a mediana foi 7, e 25% dos organismos realizaram postura no 8º dia. Para todos os tratamentos avaliados, o valor máximo de dia da primeira postura foi o 9º dia, em menor número. Não há medianas para os tratamentos de 100 e 70%, pois o teste crônico foi letal nessas concentrações, após 10 dias de exposição. Não ocorreu amadurecimento sexual

e não houve desenvolvimento corporal dos filhotes expostos a essas duas concentrações. Não ocorreram *outliers.*

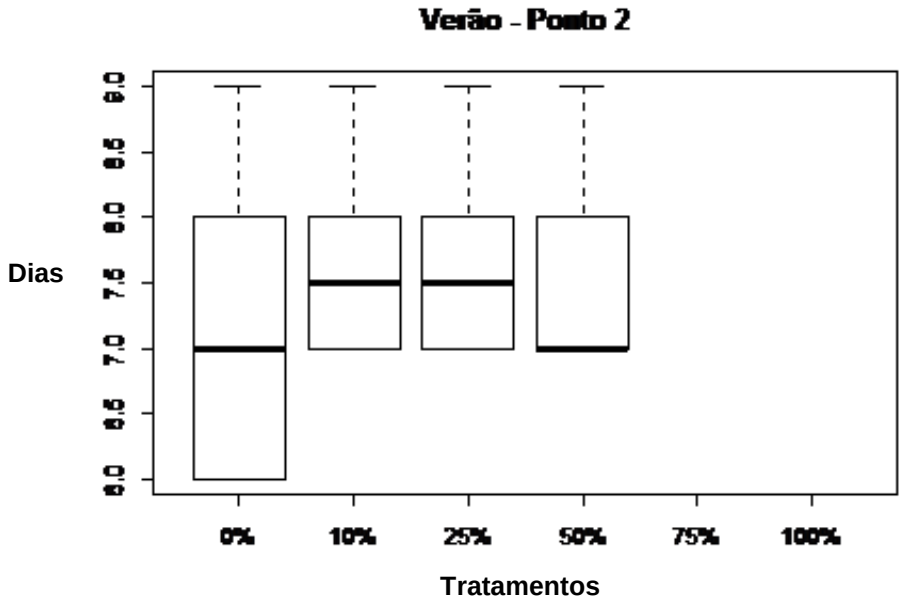


Figura 21 – Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para a amostra 2, campanha 1 no verão.

No ponto 3 (Figura 22) ocorreu assimetria leve, no tratamento 10% a mediana foi 7,5, 25% das primeiras posturas ocorreram no 8º dia, e 25% ocorreram no 7º dia. Nos tratamentos 25 a 75%, a mediana permaneceu no 8º dia, sendo que 25% dos organismos realizaram a primeira postura no 7º dia. Nos tratamentos de 50 e 75%, ocorreu variação máxima da postura ocorrer no 9º dia. Para a concentração 100% a mediana foi 7, houve 25% das posturas ocorrendo até o 8º dia, e valores mínimos indicando o 6º dia.

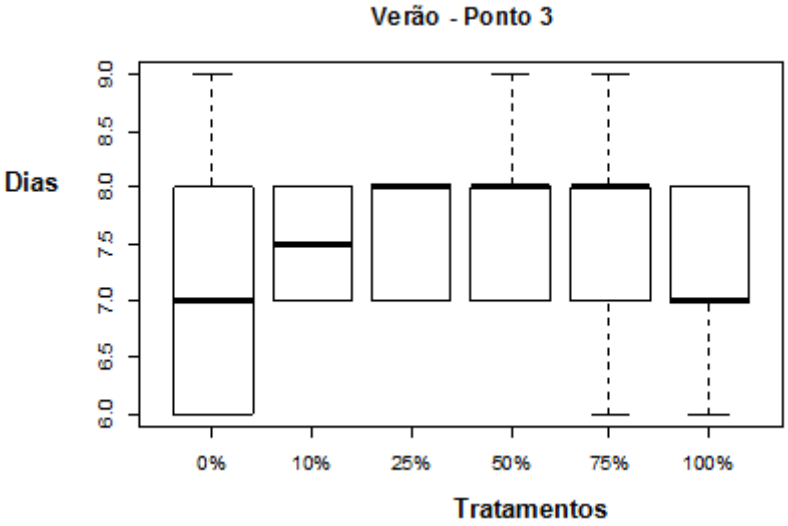


Figura 22 - Análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 3, campanha 1 no verão.

Para as comparações entre o controle e tratamentos, da campanha 2, ponto 1 o valor de “p” foi 0,0278, no ponto 2 foi de 0,0001033, e no ponto 3 foi de 0.01082, todos esses valores não foram significativos.

Na segunda campanha, no ponto 1 (Figura 23) as medianas oscilaram entre o 7º dia e o 8º dia. Ocorreu 1 *outlier* no controle, indicando um organismo que reproduziu no 9º dia. Os maiores valores não discrepantes dos conjuntos foram: 8º dia no controle, 9º dia nos tratamentos de 10 e 75%. No ponto 2 (Figura 24), segunda campanha, a mediana concentrou-se entre o 7º e 9º dia. Novamente ocorreu letalidade dos organismos até o 10º dia de vida, nos tratamento 100 e 75%. No tratamento de 50% o limite superior foi o 10º dia e o inferior o 7º dia. A mediana oscilou entre o 7º e 9º dia. %. Ocorreu um *outlier* no grupo controle no 9º dia.

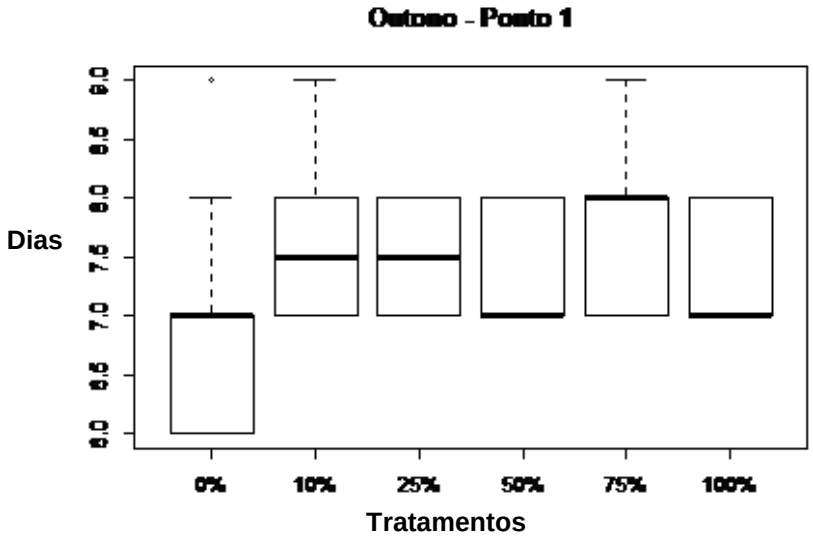


Figura 23 – Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 1, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação a data da 1ª postura e o tratamento de 0%.

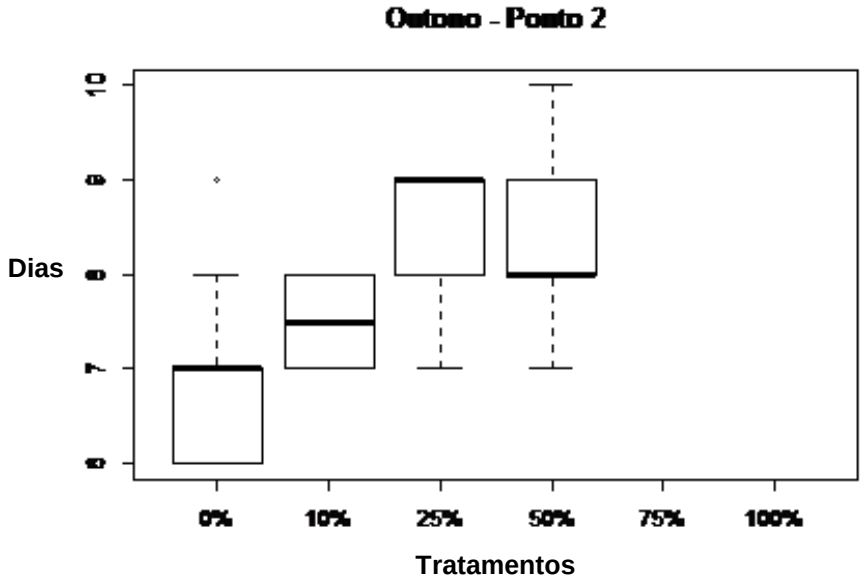


Figura 24 – Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 2, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação a data da 1ª postura e o tratamento de 0%.

No ponto 3 da 2ª campanha (Figura 25) a mediana variou entre 7,5º a 8º dia para os tratamentos, o limite superior foi o 9º dia para os tratamentos de 50, 75 e 100%. Ocorreu um *outlier* no grupo controle, no 9º dia.

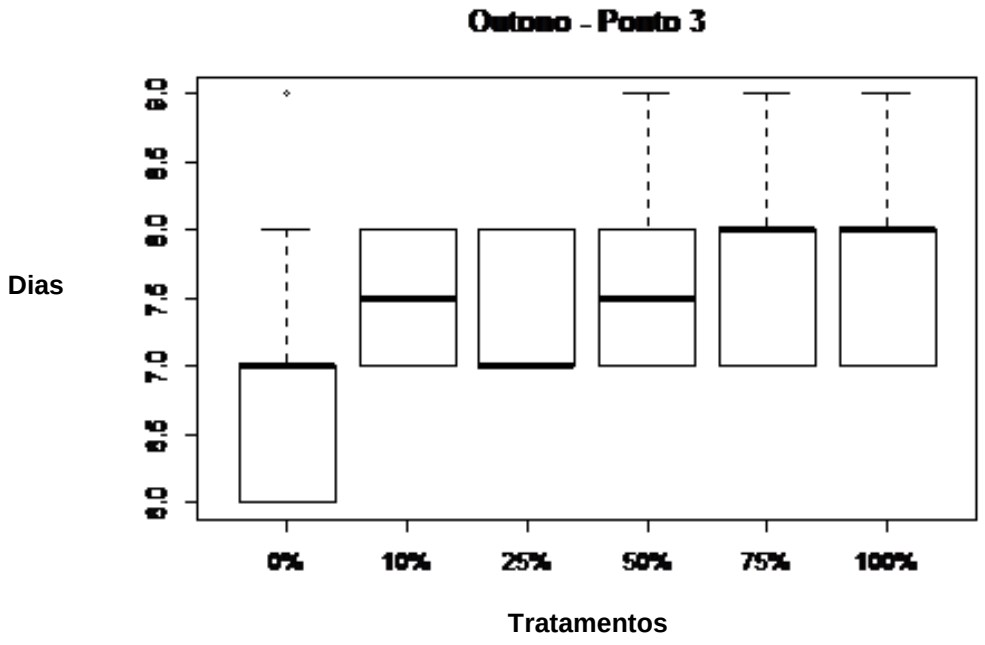


Figura 25- Análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 3, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação a data da 1ª postura e o tratamento de 0%.

Para as comparações entre o controle e tratamentos, da campanha 2, ponto 1 o valor de “p” foi 0,6632, no ponto 2 foi de 0,3861, todos esses valores não foram significativos, e no ponto 3 foi de 0,01082, significativo.

Para o ponto 1, 3ª campanha (Figura 26) a mediana concentrou-se no 7º dia. O limite superior do controle foi o 8º dia. Para todos os tratamentos, 25% das posturas ocorreram no 8º dia, e 25% ocorreram no 6,5 dia, o limite inferior ocorreu no 6º dia. O limite máximo de variação foi no 9º dia para os tratamentos 10, 25 e 75%.

O ponto 2, 3ª campanha (Figura 27) a amostra continuou expressando letalidade, até o 10ºdia para os organismos expostos aos tratamentos de 100 e 75%, que acabaram não desenvolvendo-se e não atingindo a maturidade sexual. A mediana em todos os tratamentos foi 7º dia, exceto naqueles em que ocorreu letalidade para os organismos. Ocorreram 25% das posturas no 8º dia, o limite máximo de variação foi no 9º dia.

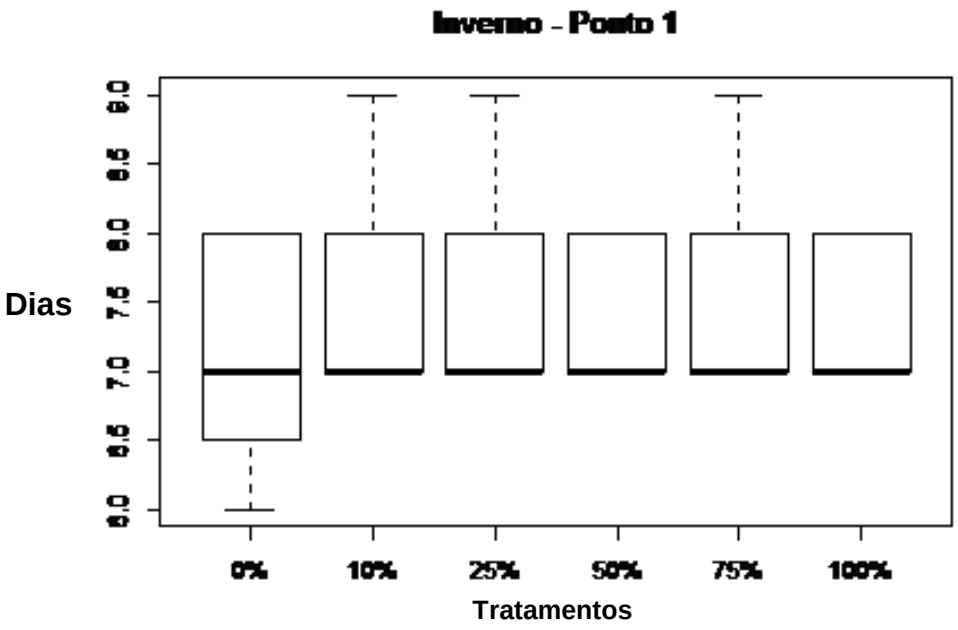


Figura 26- Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 1, campanha 3 no inverno.

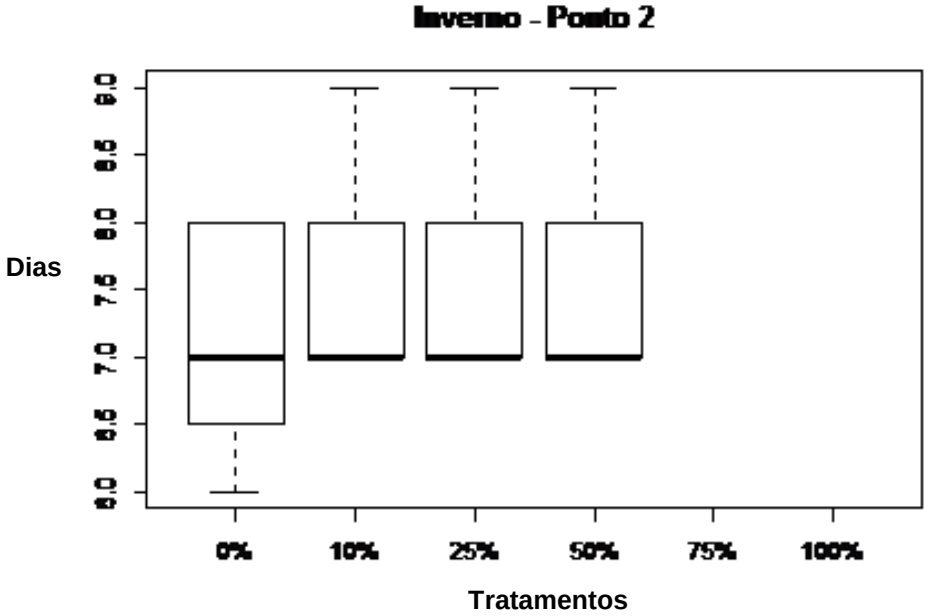


Figura 27- Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 2, campanha 3 no inverno.

No ponto 3, da 3ª campanha (Figura 28) a mediana 7º dia não variou entre o controle e os tratamentos, em todos os tratamentos 25% das posturas concentraram-se no 8º dia, os limites máximos de variação ocorreram no 9º dia.

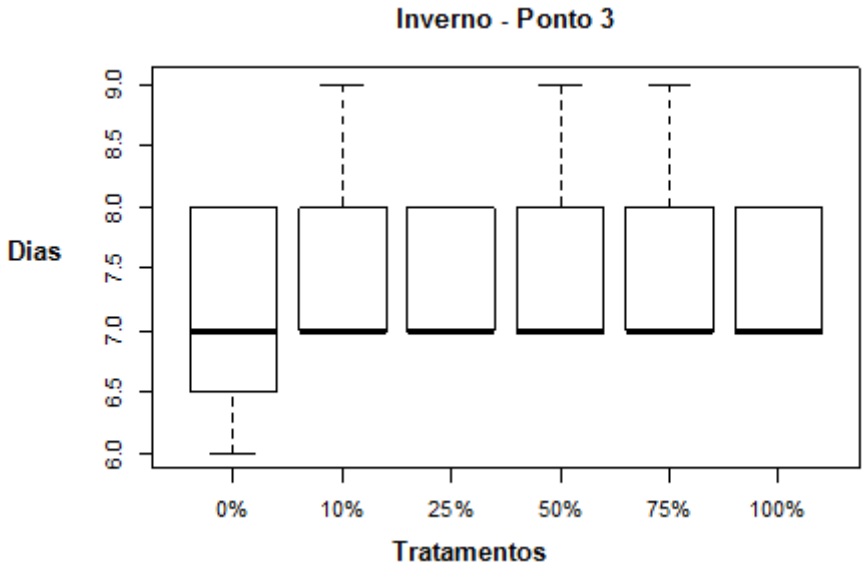


Figura 28- Gráfico da análise estatística referente à data da primeira postura, tratamentos para o ponto 3, campanha 3 no inverno.

Os resultados apresentados para todos os grupos controle seguiram uma tendência central de a primeira postura ocorrer durante o 7º dia, contudo ocorreu uma variação e os outros 50% concentraram-se entre o 6º e o 8º dia. Os resultados contrariam os de Rand (1995, p. 798), que definiu que Daphnideos amadurecem em condições normais entre o 9º a 12 º dia de vida. Também contrariam os de Maluf (2008) que encontrou resultados parecidos com os de Rand (1995). Os resultados apresentados nesse trabalho, contradizem os resultados apresentados por Leal et al. (2012), onde em média a primeira reprodução do controle ocorreu aproximadamente no 9º dia. Por outro lado, concordam com o proposto por Jonczyk e Gilron (2005), que consideraram que data em que ocorre a primeira postura é variável, entre o 6º e 14º dia de vida, em média entre o 7º e o 10º dia, sendo que o tempo em que ocorre a maturidade depende primariamente do desenvolvimento corporal. Também estão em concordância com Heckmann e Connon (2007) que constataram que a 20 ºC, *D. magna* atinge a maturidade sexual entre 6 a 8 dias de vida. A temperatura de 20ºC foi a mesma utilizada em todos os experimentos do presente trabalho. Mendonça et al. (2008) e Mendonça et al. (2009) não avaliaram a primeira postura durante o desenvolvimento dos testes crônicos, apenas a letalidade e o número médio de filhotes produzidos.

Analisando o grupo experimental, Leal et al. (2012) demonstrou que ocorreu atraso na primeira postura de indivíduos expostos ao efluente de ETED, exceto para os que foram expostos ao efluente tratado com carbono ativo granular e ozônio, onde verificou-se que a primeira reprodução foi adiantada, cerca de 1,5 dias. No desenvolvimento do presente estudo, em parte, o trabalho de Leal et al. (2012) concorda com resultados obtidos dos organismos expostos aos tratamentos de 100% e 75% da amostra 2, em todas as campanhas, não amadureceram até o 10º dia de vida, apresentando em seguida letalidade.

Como Marzio et al. (2005) e Hamada (2008) utilizaram outras espécies de daphnideos, não foi possível comparar a data da primeira postura.

4.7.2.2 Número de posturas por tratamento

Para as comparações entre o controle e tratamentos, da campanha 2, ponto 1 o valor de “p” foi $6{,}034X10^{-7}$, no ponto 2 foi de $4{,}4411X10^{-12}$, e no ponto 3 foi de $1{,}063X10^{-8}$, todos extremamente significativos.

Foi avaliado o *end point* número de posturas realizadas ao longo do desenvolvimento do teste crônico, durante 21 dias, para cada uma das amostras e seus tratamentos.

Na primeira campanha, ponto 1 (Figura 29), o controle obteve mediana de 7 posturas ao longo de 21 dias, 25% dos organismos realizaram 6 posturas, 25% realizaram 8 posturas, o número máximo de posturas realizadas foi 9 (limite superior). Para os diferentes tratamentos, a mediana oscilou entre 7 e 8 posturas. A mediana foi de 8 posturas no tratamentos de 25%, houve variação de até 9 posturas no período. Para o tratamento 50% a mediana foi 7 posturas, porém, 25% dos organismos realizaram 8 posturas, sendo o limite inferior de 6 posturas. No tratamento 10% a mediana foi 7,5 posturas, chegando até a 9 posturas. Para o tratamento de 75 e 100%, a maioria dos organismos realizou 8 posturas. 2 *outliers* foram registrados para o tratamento de 75%, tanto acima quanto abaixo da mediana.

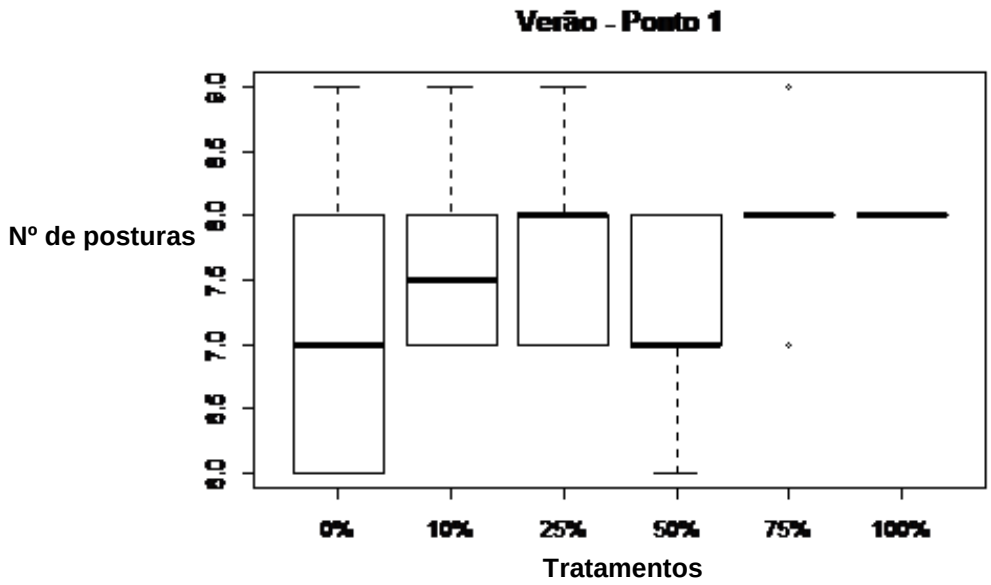


Figura 29- Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento, o ponto 1, campanha 1 no verão. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e o tratamento de 75%.

Na primeira campanha, ponto 2 (Figura 30), a letalidade após os 10 primeiros dias de tratamento continuou ocorrendo, nos tratamentos de 100 e 75%, não havendo também maturidade sexual dos organismos, desenvolvimento corporal e posturas. No controle a mediana para o número de posturas foi próximo a seis, sendo consideradas 6 posturas, as mesmas chegaram ao valor máximo de 8 posturas no período, para alguns dos organismos testados. O tratamento de 10% apresentou mediana de 8 posturas, 25% dos organismos realizaram 8 posturas, com um valor máximo de até 9 posturas. Já no tratamento de 25%, a mediana foi de 6 posturas, mas também ocorreram 7 (quartil superior) e 5 posturas. No tratamento de 50% a maioria dos organismos realizou apenas 3 posturas, , ocorrendo 2 *outliers* acima e abaixo desse valor.

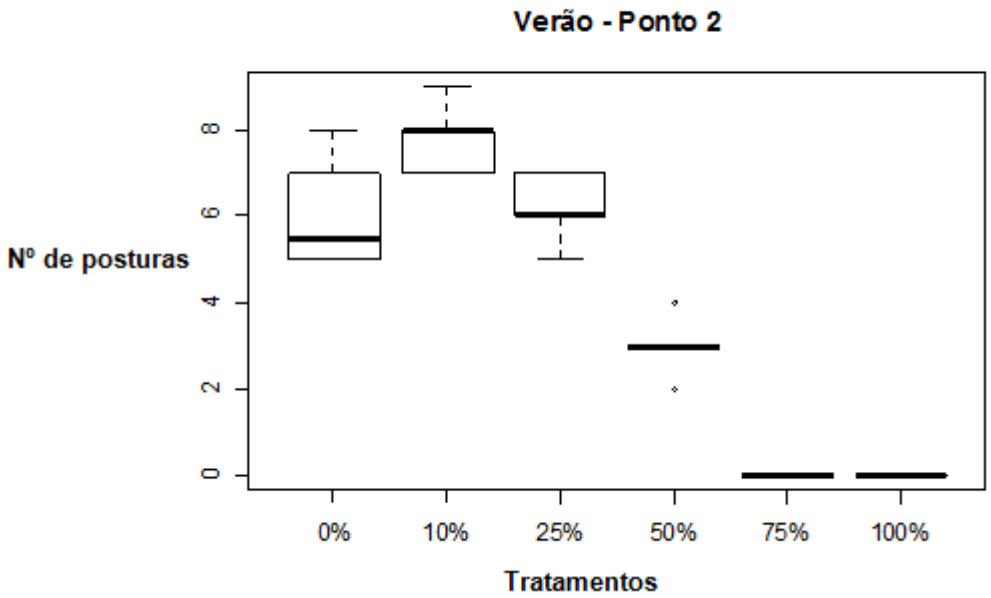


Figura 30 – Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 2, campanha 1 no verão. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e o tratamento de 50%.

No ponto 3 (Figura 31) o controle obteve uma amplitude de 5 a 8 posturas, sendo a mediana próxima de 6. A mediana em todos os outros tratamentos foi de 8 posturas. Para os tratamentos de 50 e 100%, 25% dos organismos realizaram até 9 posturas. Já no tratamento 10 %, 25% dos organismos realizaram 7 posturas, o limite superior chegou até 9 posturas. No tratamento de 100% houve variação de 8 a 9 posturas no período analisado. Ocorreram dois *outliers*, um no tratamento de 25%, 7 posturas, e outro no tratamento de 75%, 9 posturas.

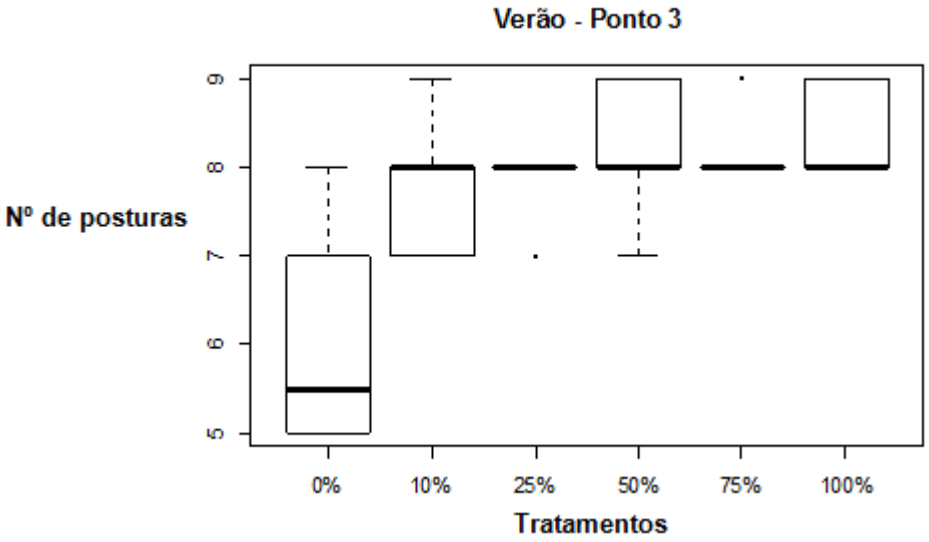


Figura 31- Gráfico na análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 3, campanha 1 no verão. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e aos tratamentos de 25 e 75%.

Para a segunda campanha, ponto 1 (Figura 32), o controle obteve mediana de 7 posturas com um *outler* superior de 8 posturas e um inferior de 6 posturas. O tratamento de 10% obteve mediana de 8,5, sendo considerado o valor de 9 posturas, variando entre 8 e 9 posturas para os dois quartis. Os tratamento 25, 50, 75 e 100% apresentaram medianas iguais de 8 posturas. Ocorreram variações no tratamento 100%, onde o limite superior foi de 9 posturas, entretanto ocorreu também 7 posturas. *Outliers* de 9 posturas estiveram presentes nos tratamentos 25, 50 e 75%. Essa amostra parece ter apresentado maior estabilidade nos organismos com relação a quantidade de posturas realizadas.

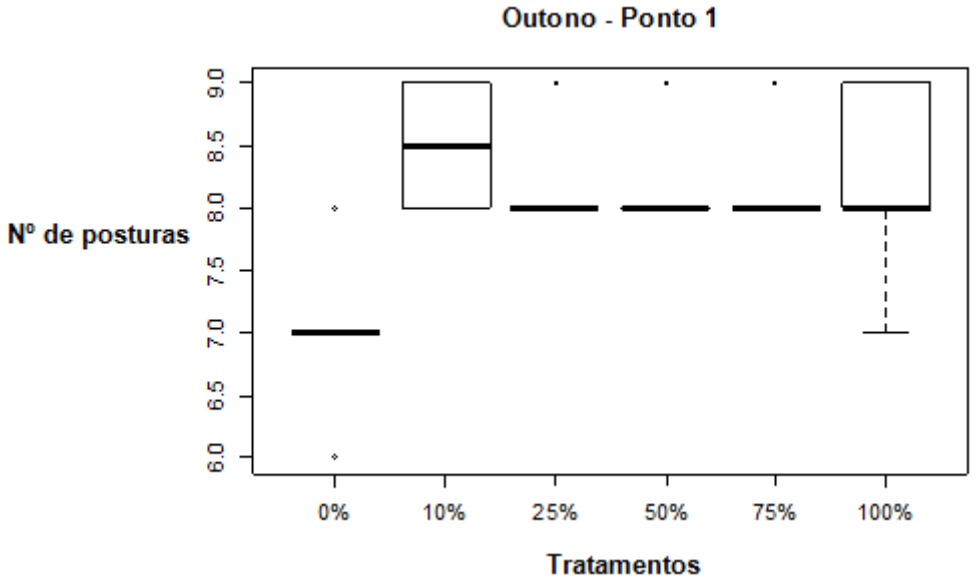


Figura 32- Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 1, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e os tratamentos de 0, 25, 50 e 75%.

Para as comparações entre o controle e tratamentos da campanha 2, ponto 1 o valor de "p" foi 3,877 $X10^{-7}$, ponto 2 6,881e $X10^{-10}$, e ponto 3 foi 3,089 $X10^{-5}$, todos extremamente significativos.

O ponto 2, segunda campanha (Figura 33), apresentou-se de forma bastante assimétrica. O controle manteve a mediana de 7 posturas, com 2 *outliers*, um superior com 8 posturas, e um inferior com 6 posturas. O tratamento 10% apresentou mediana de 8 posturas, sendo que 25% dos organismos realizaram 7 posturas. Para o tratamento 25% a mediana foi levemente inferior a 8, apresentando 25% dos organismos realizando 8 posturas e 25% realizando 6 posturas. O tratamento 50% apresentou mediana inferior aos tratamentos menos concentrados, próxima de 4, sendo 25% dos organismos realizam 5 posturas, e 25% 4 posturas, o limite superior chegou a 6 posturas, e ocorreu 1 *outlier* de 8 posturas. Os tratamentos mais concentrados permaneceram expressando toxicidade, sendo letais para todos os organismos expostos até o 10º dia de teste.

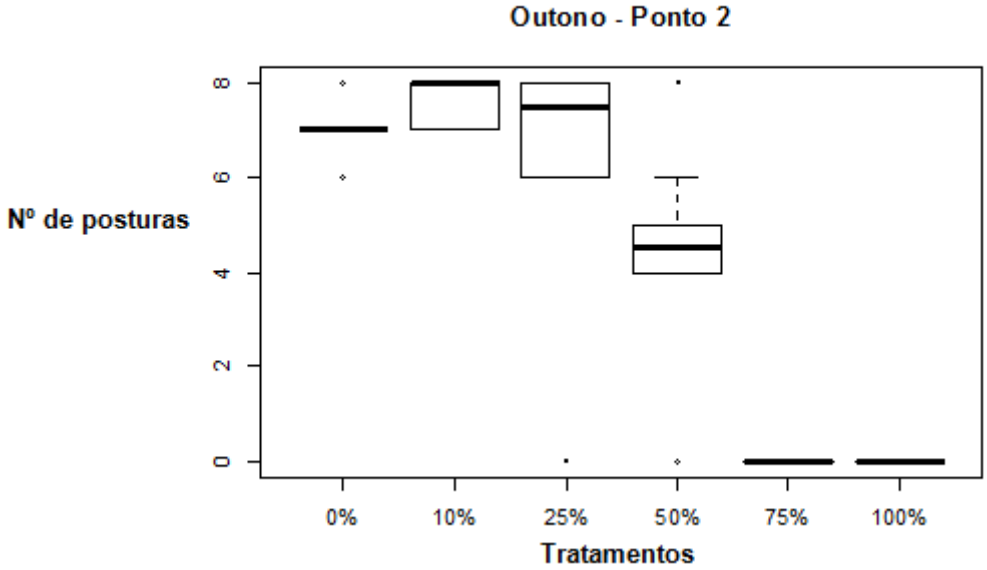


Figura 33- Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 2, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e aos tratamentos de 0, 25 e 50%.

O ponto 3, segunda campanha (Figura 34), apresentou grande simetria em relação ao controle até o tratamento 50%, onde a maioria dos organismos realizaram 7 posturas. Houve uma pequena variação no tratamento 75%, onde 25% dos organismos realizaram 8 posturas. Ocorreram 3 “outliers”, um no controle de 8 posturas e 2 no tratamento mais de 100%, apresentando 9 e 7.

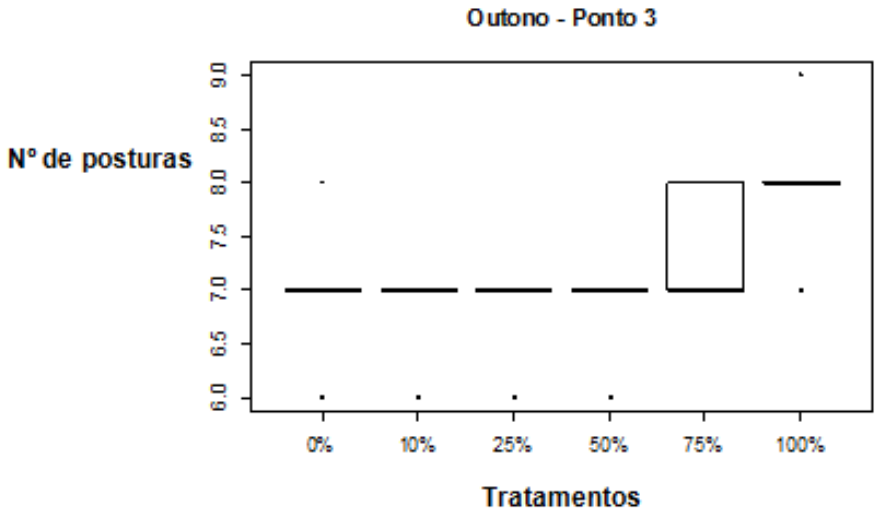


Figura 34 - Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 3, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e aos tratamentos de 0, 10, 25, 50 e 100%.

Para as comparações entre o controle e tratamentos da campanha 3, ponto 1 o valor de “p” foi 6,284X10^{-5}, ponto 2 foi 6,881 X10^{-10}, e ponto 3 foi 3,089 X10^{-5}, todos extremamente significativos.

A terceira campanha, apresentou amostras mais estáveis para o *end point* de número de posturas, no ponto 1 e 2 (Figuras 35 e 36).

A mediana nos grupos controle foi de 8 posturas, no ponto 1 e 3 a mediana manteve em 8 posturas para todos os tratamentos, sendo que no ponto 1, 25% dos organismos de todos os tratamento realizaram 7 posturas . A amostra do ponto 1 promoveu pequenas variações no tratamento, para até 9 posturas, com um limite inferior de 7 posturas.

O ponto 3 apresentou *outliers* nos tratamento de 10, 75 e 100% de 9 posturas.

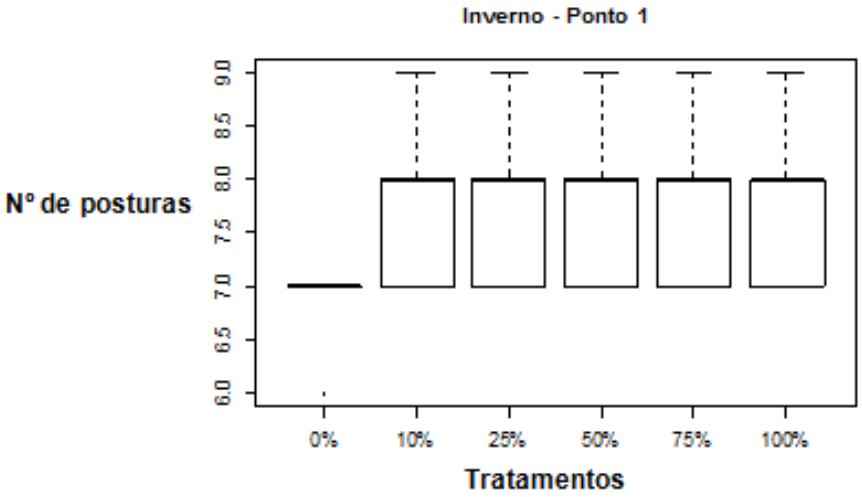


Figura 35 – Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 1, campanha 3 no inverno. O asterisco (*) representa um valor discrepante em relação ao número de postura e o tratamento de 0%.

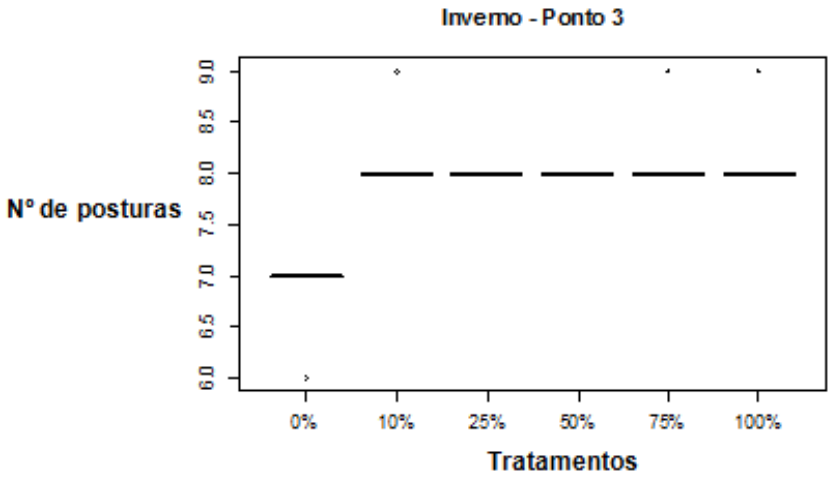


Figura 36 – Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 3, campanha 3 no inverno. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e aos tratamentos de 0,10, 75 e 100%.

O ponto 2 (Figura 37), apresentou variação nas posturas, 9 posturas para o tratamento 10%, e redução nas posturas conforme aumentou-se a concentração dos tratamentos, 5 posturas no tratamento 25%, 3 posturas no tratamento 50%, e ausência de posturas nos tratamentos mais concentrados.

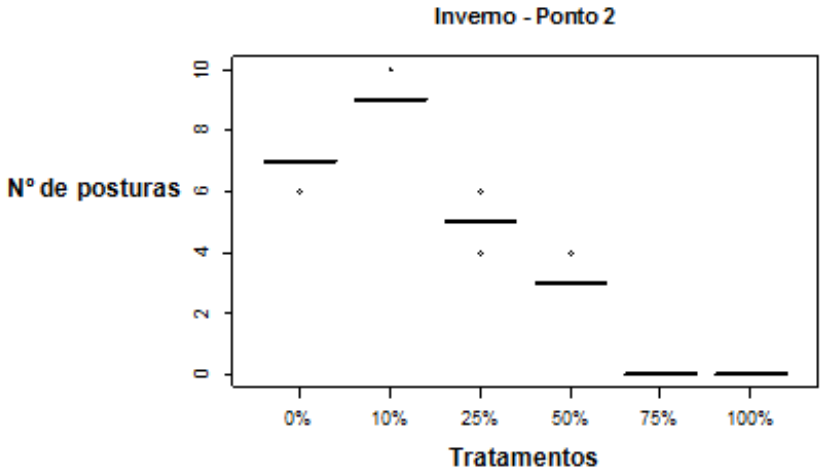


Figura 37- Gráfico da análise estatística das posturas por tratamento para o ponto 2, campanha 3 no inverno. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e aos tratamentos de 0, 10, 25 e 50%.

Considerando os grupos controle que apresentaram quase 100% de número total de 7 posturas, no decorrer do teste (com exceção dos *outliers*), esse resultado não concorda com as considerações de Rand (1995) que define como

número esperado de posturas é entre 3 a 5, ao longo dos 21 dias. A diferença dos resultados, para 7 posturas em todos os controles, pode ser atribuída ao tipo de alimentação e uso do M4. Rand (1995) não especifica qual tipo de meio foi utilizado nos testes citados. Maluf (2008) obteve os mesmo resultados que Rand (1995), com o M4, o mesmo meio utilizado no presente trabalho. Contudo, não há indicação do volume individual de alimento ofertado nos testes. Os trabalhos de Mendonça et al. (2008), Mendonça et al. (2009) e Leal (2012) não especificam a quantidade de posturas desenvolvidas no período dos testes. Marzio et al. (2005) e Hamada (2008) utilizaram outras espécies de daphnideos, portanto não foi possível comparar esse parâmetro, dado que as espécies utilizadas apresentam ciclos de vida mais curtos, portanto menor tempo de reprodução.

4.7.2.3 Média (taxa) de filhotes produzidos por matriz em cada postura

Para as comparações entre o controle e tratamentos da campanha 1, ponto 1 o valor de “p” foi 0,0002265, ponto 2 $3{,}091X10^{-12}$, e ponto 3 $1{,}034X10^{9}$, todos extremamente significativos.

Para essa campanha o grupo controle apresentou a mediana de filhotes produzidos por matriz em cada postura próximo a 20, sendo considerado o valor médio de 20 filhotes em cada postura. Esse valor manteve-se no ponto 1 (Figura 38), nos tratamentos de 10 e 25%, baixou no tratamento 50% e aumentou nos tratamentos de 75 e 100%, chegando ao valor máximo médio de 40 organismos por postura no tratamento mais concentrado. Ocorreu a redução da produção de filhotes, conforme a concentração do tratamento foi menos elevada, nos tratamentos entre 100 a 50%. Para os tratamentos de 25 e 10%, em comparação com o grupo controle, a variação da produção dos filhotes esteve abaixo do controle. O mesmo padrão foi observado em resposta a exposição à amostra do ponto 3 (Figura 39) e seus tratamentos. A mediana para o valor médio de filhotes foi alto no tratamento mais concentrado, acima de 30, com limite máximo de variação de 50 filhotes, sendo o limite inferior ainda superior à mediana do grupo controle, e dos tratamentos de 25 e 10%, que obtiveram a mediana inferior a 20, valor do grupo controle.

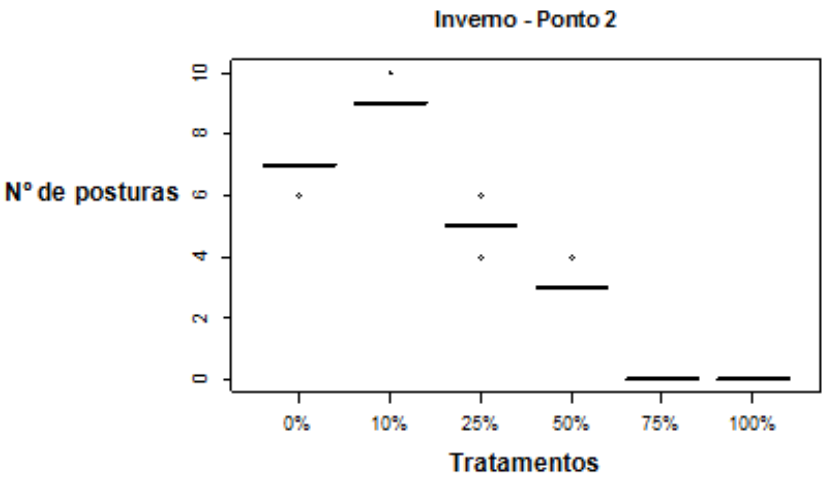


Figura 38– Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 1, campanha 1 no verão. O asterisco (*) representa um valor discrepante em relação ao número médio de filhotes produzidos em relação ao tratamento de 25%.

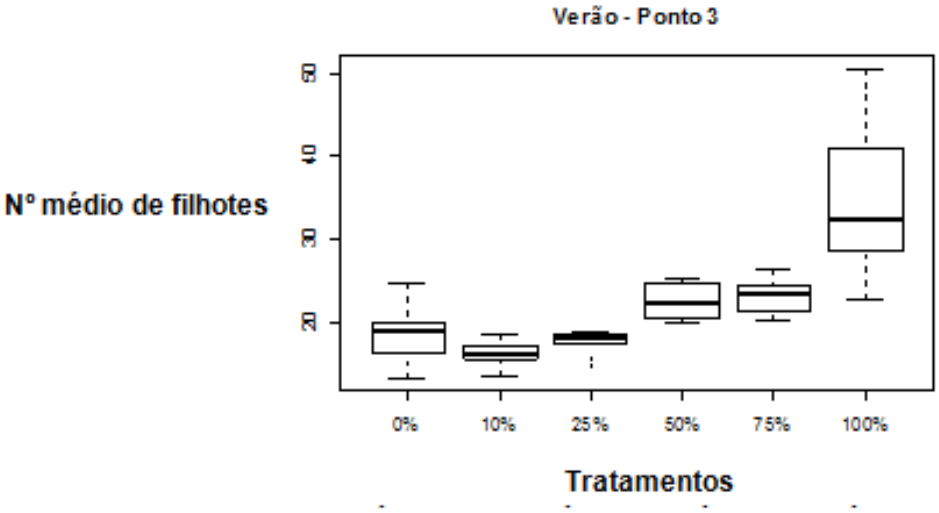


Figura 39 – Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 3, campanha 1 no verão.

O ponto 2 (Figura 40), apresentou um padrão diferenciado, com efeito contrário ao observado para os pontos 1 e 3. Conforme o tratamento foi menos concentrado ocorreu aumento da produção média de filhotes por postura. Para os tratamentos de 100 e 75%, não ocorreu produção de filhotes, pois os organismos não realizaram postura, ocorrendo letalidade até o 10º dia do teste.

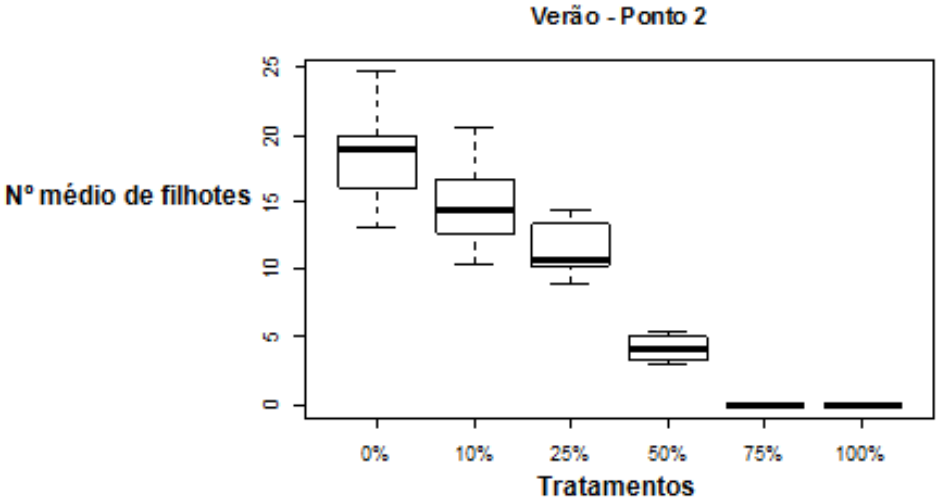


Figura 40 – Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 2, campanha 1 no verão.

Para as comparações entre o controle e tratamentos da campanha 2, ponto 1 o valor de "p" foi de 8, 896 $X10^{-7}$, no ponto 2 foi de 1,529 $X10^{-10}$, e no ponto 3 foi de 1,798$X10^{-7}$, todos extremamente significativos.

No ponto 3 (Figura 41) o padrão descrito anteriormente, da redução dos filhotes conforme foram expostos a tratamentos de inferior concentração, ocorreu novamente. Os maiores valores da mediana e limites superiores e inferiores permaneceram nos tratamentos mais concentrados, que foram reduzindo-se, conforme a concentração do tratamento. Todos os tratamentos acima de 50% promoveram efeito no aumento da produção de filhotes. A maior mediana foi em 100%, acima de 20, com limite superior de 30 e inferior abaixo de 20 em média por postura. Ocorreu 1 *outlier* acima de 35. Os valores mais próximos do controle foram 10, 25 e 50%, onde a variação total esteve dentro da contemplada pelo grupo controle, e estes tratamentos parecem não ter promovido efeito sobre a produção de organismos. O tratamento de 10% apresentou limites inferiores de variação um pouco abaixo que os do controle, entretanto, a mediana foi próxima do controle e esteve dentro da variação do mesmo. No ponto 3 (Figura 42), o efeito da amostra em relação ao valor médio de posturas foi diferente do ocorrido na primeira campanha e na segunda campanha no ponto 2. A concentração mais elevada do tratamento continuou promovendo o aumento do valor médio de posturas, porém, a mediana do tratamento de 25% foi mais elevada que as dos tratamentos de 50 e 75%, apresentando também 2 *outliers* de 18 organismos por postura. O tratamento 10% produziu valor médio de filhotes mais elevado que o do grupo controle.

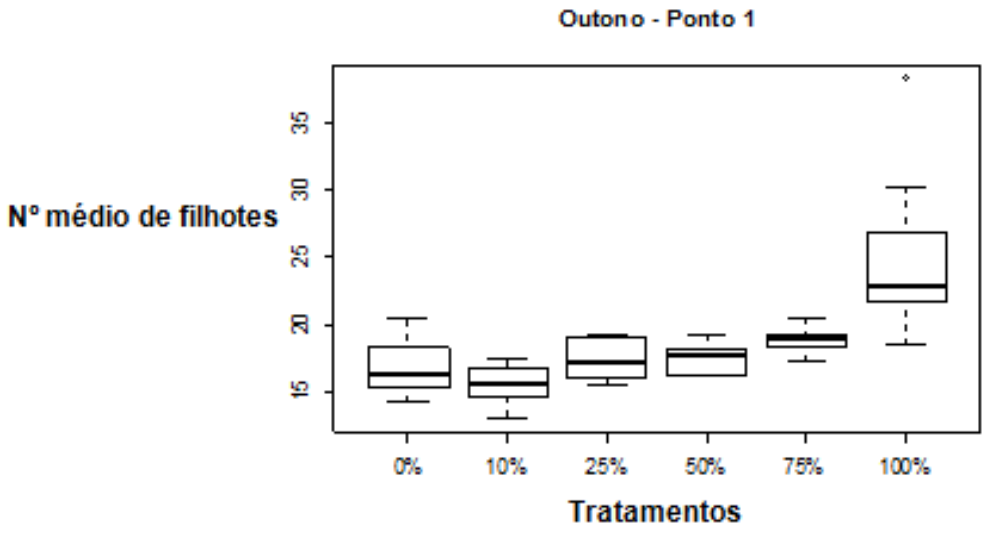


Figura 41– Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 1, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa um valore discrepante do número médio de filhotes produzidos em relação ao tratamento de 100%.

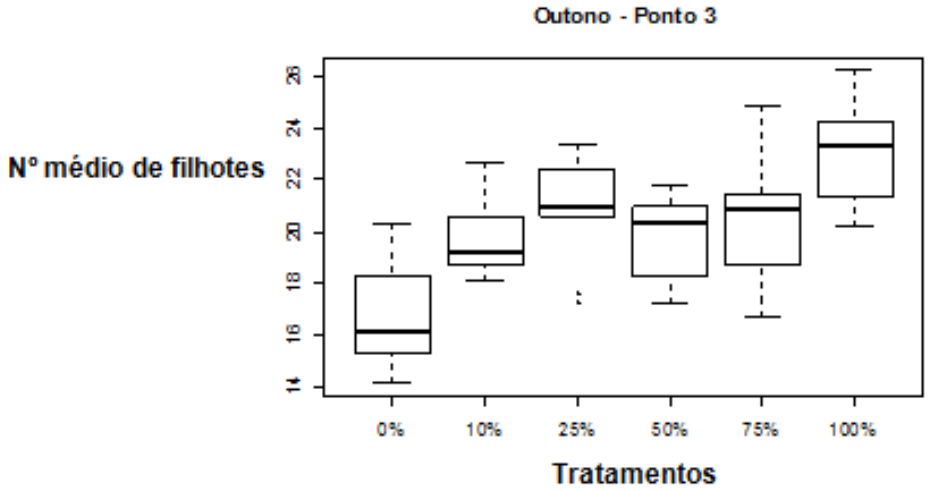


Figura 42 – Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 3, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de filhotes produzidos em relação ao tratamento de 25%.

No ponto 2 (Figura 43), o efeito da amostra sobre o valor médio da produção de filhotes repetiu-se novamente, conforme observado na primeira campanha no ponto 2. Ao mesmo tempo em que as concentrações do tratamento diminuíram houve o aumento do valor médio de filhotes. Os dois tratamentos mais concentrados causaram letalidade em até 10 dias e os organismos não se reproduziram. A mediana variou de 5 no tratamento 50% a 15 organismos no tratamento 10%. O

tratamento 10% foi o que apresentou valores mais próximos do grupo controle, entretanto, a variação total e mediana foram inferiores ao controle. Houve efeito no valor médio da produção de filhotes em todas as concentrações.

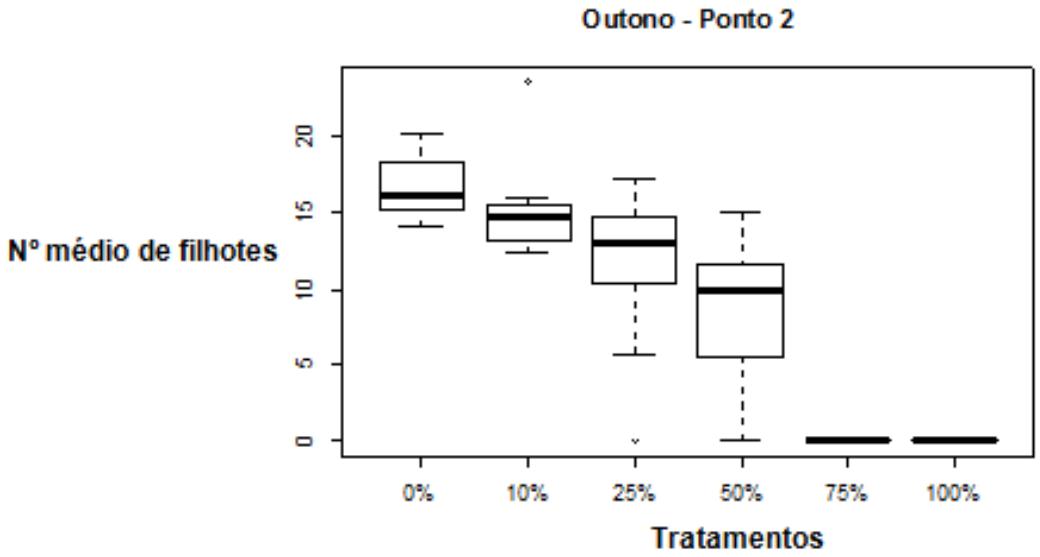


Figura 43 – Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 2, campanha 2 no outono. O asterisco (*) representa um valor discrepante do número de filhotes produzidos em relação ao tratamento de 10%.

Para as comparações entre o controle e tratamentos da campanha 3, ponto 1 o valor de "p" foi de $8{,}896X10^{-7}$, no ponto 2 foi de $1{,}529\ X10^{-7}$, e no ponto 3 foi $1{,}798\ X10^{-7}$, todos esses valores foram considerados extremamente significativos.

No ponto 1 (Figura 44), o feito observado continuou ocorrendo no sentido de as maiores concentrações de tratamento promoverem aumento do valor médio de filhotes produzidos, contudo a mediana 20 foi a mais elevada no tratamento de 75%, e um pouco abaixo desse valor esteve o tratamento 100%, com valores máximos e mínimos bastante parecidos aos do tratamento 75%. O tratamento 10% obteve variação semelhante ao do grupo controle, contudo o valor da mediana foi 16, enquanto no grupo controle foi de 17. O tratamento 10% parece ter desenvolvido um efeito muito pequeno nos organismos quando comparado ao grupo controle.

A amostra do ponto 3 (Figura 45) obteve um efeito semelhante ao observado na amostra 1 da terceira campanha. A variação do número médio de filhotes produzidos foi maior no tratamento de 75%, as medianas de 75 e 100% foram iguais a 30. Os limites superiores e inferiores do tratamento 75% foram maiores que o de 100%, no entanto o de 100% permaneceu dentro dos limites superior de 75%, mas obteve limite inferior menos elevado que o tratamento de

75%. Os tratamentos de 100 a 10% causaram efeito no valor médio do número de filhotes produzidos. Não houve tratamento que não tenha causado efeito, quando comparados ao grupo controle.

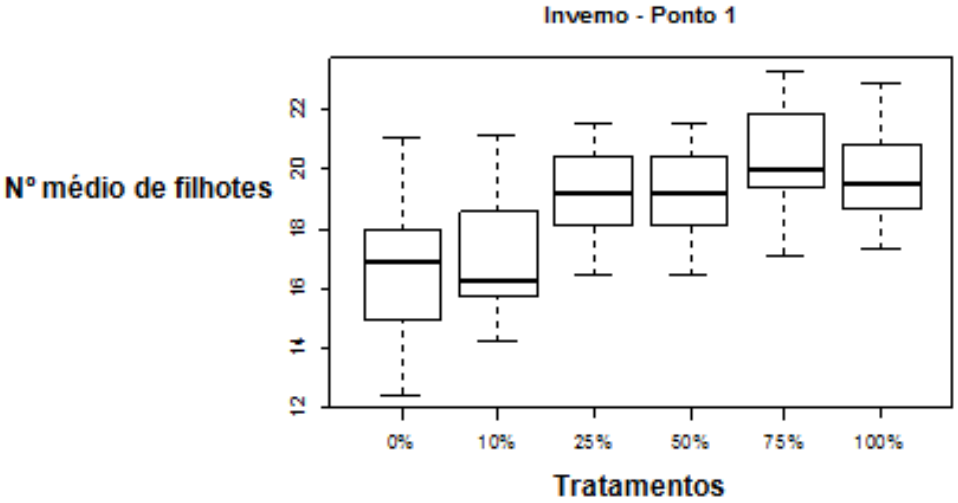


Figura 44 – Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 1, campanha 3 no inverno

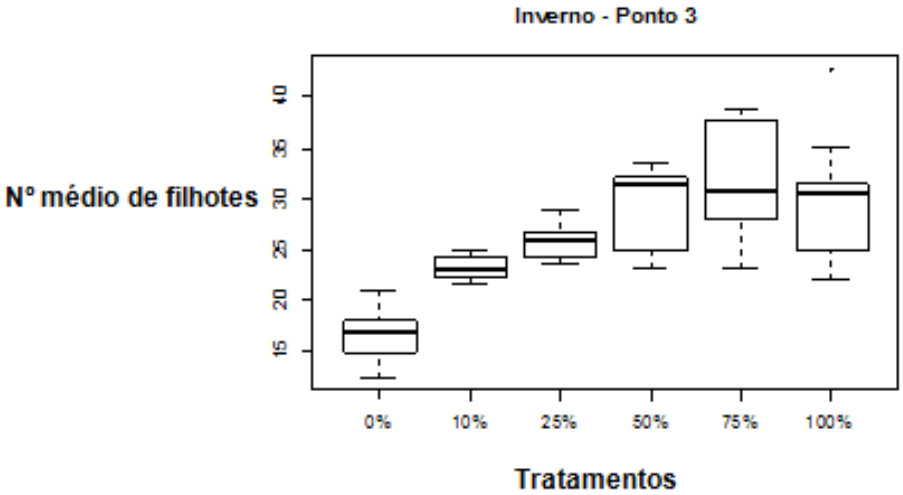


Figura 45– Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto 3, campanha 3 no inverno. O asterisco (*) representa um valor discrepante em relação ao número médio de filhotes produzidos e o tratamento de 100%.

Para os tratamentos da amostra 2 (Figura 46), o efeito observado nas duas primeiras campanhas repetiu-se novamente. Os dois tratamentos mais concentrados promoveram efeito letal até o décimo dia de vida dos organismos, que não se reproduziram nesse período. Conforme as concentrações dos tratamentos foram reduzidas, ocorreu o aumento no valor médio do número de filhotes produzidos.

Contudo, todos os tratamentos determinaram efeito sobre os organismos quando comparados a mediana 17 do grupo controle, e a variação desse mesmo grupo, que esteve entre 13 e 20 filhotes produzidos, em média, por postura. *Outliers* estiveram presentes nos tratamentos de 50, 25 e 10%.

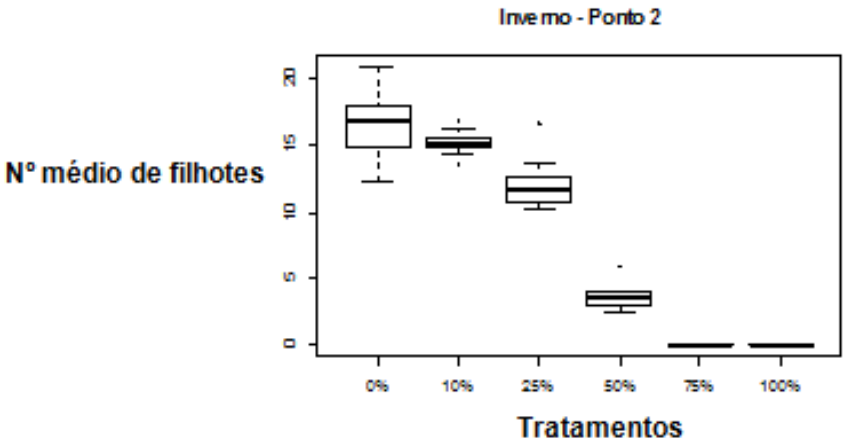


Figura 46– Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes por tratamento para o ponto para o ponto 2, campanha 3 no inverno. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número médio de filhotes produzidos em relação aos tratamentos de 25 e 50%.

Nos testes desenvolvidos nem sempre foi possível encontrar a CENO (concentração que não causa efeito), pois em vários pontos, até nos tratamentos menos concentrados de 10%, as amostras promoveram alterações na reprodução dos organismos. Nos gráficos 20 e 26, foi possível constatar que a CENO foi a concentração 10%. No gráfico 21, a CENO foi 25%. Na maioria dos testes a CEO foi a partir da concentração 10%, promovendo alteração tanto na redução da produção de filhotes, como no incremento da produção dos filhotes. Nos gráficos 23 e 26 possível observar que na concentração 25% houve um incremento da reprodução, que aumentou até o tratamento de concentração 100%. Houve situações em que esse incremento ocorreu a partir de 50%, como no gráfico 21, e a partir de 75% como no gráfico 20. Nos gráficos 22, 25 e 28, todos referentes ao ponto 2, a CEO gerou efeito a partir do tratamento 10%, onde inicia-se a redução do número de filhotes produzidos, baixando até 0 nos tratamentos de 75 e 100%.

Não foi calculada a VC porque em muitas amostras, não foi estabelecida a CENO, devido ao teor de toxicidade das amostras.

Não foi possível realizar uma comparação dos resultados no sentido da concentração, visto que na literatura técnica, as concentrações avaliadas são variadas, porém foi comparado o efeito das amostras nos organismos, se esse efeito promoveu um acréscimo ou decréscimo na média de reprodução dos cladóceros.

A relação entre os resultados apresentados e a pesquisa desenvolvida por Hamada (2008) é parcialmente positiva. Hamada (2008) desenvolveu um estudo em que, através da toxicidade da amostra, esperava-se inferir sobre a eficiência do tratamento biológico aplicado na ETE Suzano (São Paulo, Brasil) e sobre a influência da estação no entorno da ETE. O organismo utilizado como indicador nos ensaio crônico foi a *Ceriodaphnia dubia* (Daphniidae), foram analisados 2 pontos localizados em um rio, e um ponto que recebia o efluente final tratado pela ETE, não foram coletadas amostras na saída da ETE. Foram utilizadas as seguintes concentrações de amostras 25%; 50%; 75% e 100%, sendo realizado um ajuste na dureza das amostras. Os grupos controle apresentaram em média 18,10 filhotes ao longo do experimento. No ponto amostral a montante, com o tratamento de concentração de 25% a média de filhotes foi bastante próxima do controle, já para a concentração mais elevada houve um decréscimo acentuado na média para 4,10 filhotes ao longo do teste. O ponto a jusante ficava cerca de 200 metros após a ETE, a menor concentração de 25% gerou uma média de 15,10 filhotes, um pouco abaixo do que foi produzido pelo controle, e a concentração mais elevada de 100% produziu apenas 1,9 filhotes – em setembro de 2006. Nos estes realizados em fevereiro de 2007, o grupo controle apresentou média de 15,40 organismos, o ponto a montante, na concentração de 25% ocorreram 22,20 organismos, e na concentração de 100% ocorreram 25,10 filhotes. No ponto a jusante, na concentração de 25% ocorreram 11,70 filhotes, e na concentração de 100% ocorreram 12,50 filhotes. Em agosto de 2007, o grupo controle apresentou média de 15,90 organismos, o ponto a montante, na concentração de 25% ocorreram 16 organismos, e na concentração de 100% ocorreram 11,40 filhotes. No ponto a jusante, na concentração de 25% ocorreram 7,70, e na concentração de 100% ocorreu apenas 1 filhote. Em março de 2008 o grupo controle apresentou média de 15,50 organismos, o ponto a montante, não foram realizados os testes com a concentração de 25%, na concentração de 100% ocorreram 17,90 filhotes. No ponto a jusante não foram realizados testes com a concentração de 25%, na concentração de 100% ocorreram 14,25 filhotes em média. No estudo de Hamada (2008) houve

uma grande redução da reprodução no ponto a jusante da ETE, na concentração mais elevada de 100% foram onde ocorreram os maiores índices dessa redução. No presente estudo, no ponto da ETE, nas concentrações mais elevadas não ocorreu sequer o amadurecimento sexual dos organismos teste, e os índices de reprodução nas concentrações de 50 e 25% foram bastante reduzidas.

Os resultados do presente estudo concordam em parte com os apresentados por Maluf (2008), que utilizou para o teste crônico amostras de apenas um ponto, que recebia toda a água da sub-bacia da Universidade Federal de Santa Catarina. Com a amostra foram realizadas quatro diluições de 100%, 50%, 33,33% e 25%. Todos os organismos mantiveram-se vivos ao final do teste, o controle, com 10 organismos, gerou um total de 714 filhotes, 17,85 filhotes em média. A amostra bruta 100% não promoveu efeito nos organismos testados, segundo o autor. Analisando os dados brutos contidos no trabalho, foi possível verificar que a quantidade de filhotes produzidas nos testes apresentou-se um pouco variada, sendo os valores inferiores ao controle: 683 e 613, e os valores superiores ao controle: 848 e 1054. No presente estudo, não ocorreu mortandade nos pontos a montante e jusante da ETE, os pontos com maiores índices de DBO, DQO, PT e NAT, superiores aos índices da pesquisa de Maluf (2008). Por outro lado, houve o aumento dos organismos produzidos em determinadas concentrações, esse foi um efeito promovido pela amostra. No trabalho de Maluf (2008) também há um acréscimo considerável dos organismos produzidos em dois testes em relação ao controle.

Há coerência nos resultados apresentados em comparação aos produzidos por Mendonça (2008), que realizou testes crônicos com amostras de água do Rio Trancão (Portugal). Houve tratamentos em diferentes concentrações, porém não foi apresentado detalhamento sobre quais percentuais foram testados. Esse rio recebe efluentes de esgoto, indústrias do setor alimentício, fármacos, galvanoplastia, processamento de carnes e refino de açúcar. Dentre os resultados apresentados, para seis das amostras de águas residuais, a maior concentração testada não apresentou efeitos na reprodução, em relação ao controle. Os valores das amostras que não causaram efeito observado (CENO) variaram de 0,02 a 15%. Verificou-se ocorrência de efeitos em nível crônico em baixas concentrações, o que foi particularmente relevante, dado as amostras não serem tóxicas em nível agudo para nenhum dos organismos ensaiados: *V. fischeri, Lemna minor e D. magna*

Considerando a pesquisa de Mendonça et al. (2009), é possível constatar que os resultados apresentados no presente trabalho estão em concordância com este estudo. Nesse trabalho foi realizado um estudo ecotoxicológico com amostras de águas residuais provenientes de dois sistemas de rede de esgoto, ETAR-1 e 2, localizado na Loures (Portugal). Ambas as ETES recebem águas residuais domésticas e industriais, indústria alimentícia, metal-mecânica, papel, impressão, reciclagem, reparação, e os setores de tratamento de superfície. *D. magna* foi utilizada tanto em testes agudos como crônicos. As concentrações utilizadas nos tratamentos com a amostra 1 foram: 0, 5, 10, 15, 22 e 33%; e com a amostra 2: 0,2; 0,4; 0,9; 2,1 e 5,0%. O controle apresentou uma média de 74,5 filhotes, a menor concentração da amostra 1, de 5%, apresentou 64,3 filhotes, e a maior concentração 41,5 filhotes. Para a amostra 2, a menor concentração, de 2%, apresentou 61,6 filhotes, e a maior concentração, de 5%, apresentou apenas 33 filhotes. Esses resultados apresentam uma relação positiva com os apurados no presente trabalho, onde no ponto próximo da ETE, mesmo nas menores concentrações, ocorreu efeito na reprodução, reduzindo o contingente de filhotes produzidos pelas matrizes. Houve diferenças significativas entre o controle e as amostras testadas. Os autores descreveram que nenhuma mortalidade de fêmeas adultas ocorreu no controle e nas concentrações mais baixas de amostras de efluentes, após uma exposição de 21 dias. Em concentrações elevadas de efluente ocorreu mortandade de até 100% das fêmeas. A CENO foi obtida a uma concentração de 5% para a amostra 1, e 0,4% para a amostra 2. Para a amostra 2 ocorreram efeitos crônicos a baixas concentrações.

Considerando a pesquisa de Leal et al. (2012), que realizou o teste crônico com amostras de água cinza não tratada e submetida a diferentes tipos de tratamentos, houve concordância parcial nos resultados. Para o efluente tratado aerobicamente, com carvão ativado granular e ozônio, ocorreu sobrevivência de 90% dos organismos expostos. Em contraste, a metade da população de daphnideos morreu após 21dias de exposição, a partir do efluente com tratamento anaeróbio combinado ao aeróbio. No presente estudo relacionado a análise ecotoxicológica de amostra de água do rio Atuba, a maioria dos organismos sobreviveu aos testes, sendo que apenas os organismos expostos as concentrações de 75 e 100% das amostras do ponto 2 sofreram efeito letal após 10 dias de exposição. O restante dos organismos não apenas sobreviveu, como amadureceu

sexualmente, e realizaram posturas com uma quantidade elevada de filhotes, em relação ao controle. No trabalho de Leal et al. (2012), o tratamento com ozônio causou um pequeno, mas significativo ($p < 0,05$) aumento na reprodução cumulativa. Os autores não trabalharam com o índice médio de reprodução, sugerido pela OECD (2008), mas sim com a reprodução acumulada. O controle exibiu um valor de 187 filhotes, para os organismos expostos às amostras provenientes dos tratamentos aeróbico e anaeróbico ocorreu um decréscimo na reprodução para 90 e 30 filhotes. Para o tratamento com carbono granular ativado ocorreu aumento da reprodução, atingindo valores máximos de até 140 filhotes produzidos. Para o tratamento com ozônio, a reprodução gerou 120 filhotes, resultado semelhante ao do grupo controle. Leal et al. (2012) considerou as águas cinzas tóxicas, bem como o aumento da reprodução como um efeito crônico da exposição.

Além de testes ecotoxicológicos, foi encontrado um trabalho que utilizava cladóceros no tratamento biológico de efluentes de esgoto. Esse artigo foi utilizado na discussão porque descreve o aumento na população de organismos durante a exposição ao efluente, consequentemente presume-se que ocorreu acréscimo da reprodução.

Nandini et al. (2004) utilizou *Alona caix* , *Ceriodaphnia dubia*, *Moina macrocopa* e *Daphnia pulex* (Cladocera) para realizar o polimentode efluentes de esgoto, proveniente de uma estação de tratamento em Iztacalco , México, sendo avaliados três tipos de efluentes: esgoto bruto, parcialmente tratado, e clorado na última etapa. As taxas de crescimento populacional das espécies de cladóceros testadas seguiram tendências similares às densidades populacionais de pico. *D. pulex* não mostraram crescimento positivo em todas as repetições envolvendo águas residuais. *A. caix* com águas residuais parcialmente tratadas mostrou curvas de crescimento semelhantes aos controles. *M. macrocopa* mostrou melhor crescimento da população em efluentes brutos e em águas residuais parcialmente tratadas do tanque do que nos controles. A conclusão desse estudo foi de que *M. macrocopa* e *A. caix* atingiram densidades tão elevadas como 12.000 e 55.000 indivíduos/L, respectivamente, em águas residuais.

4.7.3 Testes de Kruskall-Walis com a matriz sedimento

4.7.3.1 1ª Postura

O valor de “p” para os testes envolvendo a comparação entre os pontos amostrais para as amostras de sedimento, considerando o *end point* 1ª postura, foi de 3,026 X 10^{-6}, extremamente significativo.

Para as análises de 1ª postura (Figura 47), o grupo controle apresentou as 1ªs posturas no 8º dia, houve dois *outliers*, um no 9º e outro no 6º dia. A mediana do ponto 1 para o 1º dia de postura ocorreu no 7,5 dia, sendo que 25% dos organismos realizaram a 1ª postura no 8º dia e mais 25% no 6º dia. No ponto 2, a maioria dos organismos realizou a 1ª postura no 7º dia, ocorreram três *outliers* no 6º, 8º e 9º dia. No ponto 3 a mediana foi 7, e 25% dos organismos realizaram a 1ª postura no 8º dia.

Os resultados apresentados para o grupo controle seguiu uma tendência central de a primeira postura ocorrer durante o 8º dia, contudo ocorreu uma variação e os outros 50% concentraram-se entre o 6º e o 8º dia. Esses resultados contrariam os de Rand (1995, p. 798), que definiu que Daphnideos amadurecem em condições normais entre o 9º a 12 º dia de vida, em testes desenvolvidos exclusivamente na água. Os resultados estão em concordância com o proposto por Jonczyk e Gilron (2005), que consideraram que a data em que ocorre a primeira postura é variável, entre o 6º e 14º dia de vida, em média entre o 7º e o 10º dia, sendo que o tempo em que ocorre a maturidade depende primariamente do desenvolvimento corporal para organismos testados exclusivamente na água.

O trabalho de Terra et al. (2006) não descreveu o dia da primeira postura. Até o momento, não existem outros trabalhos publicados relacionando toxicidade de sedimento.

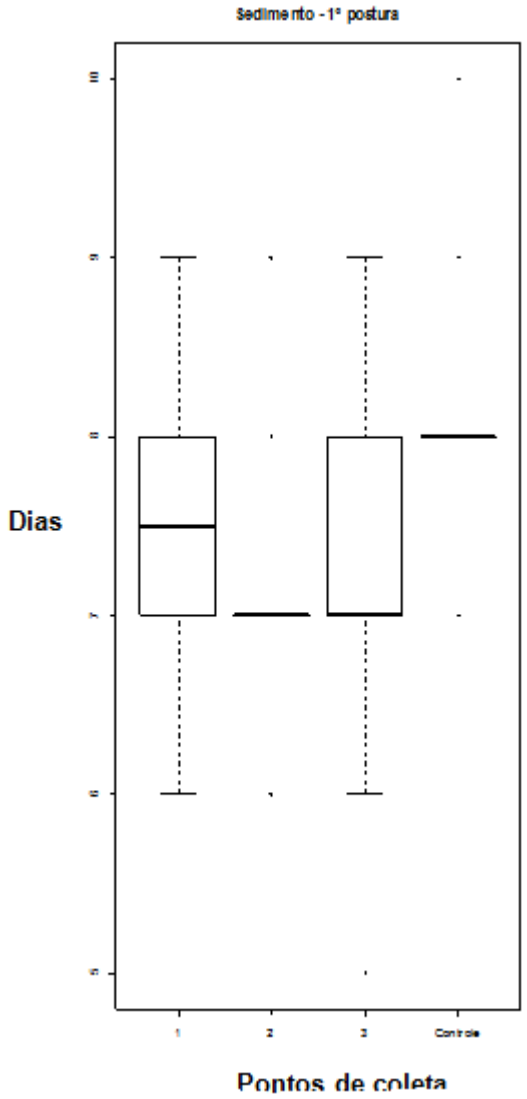


Figura 47– Gráfico da análise estatística da data da 1ª postura para os 3 pontos e grupo controle. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação à data da 1ª postura em relação aos pontos 2 e 3.

4.7.3.2 Número de posturas

O valor de “p” para os testes envolvendo a comparação entre os pontos amostrais, considerando o *end point* do número de posturas com amostras de sedimento, apresentou o valor de 3,033 X 10^{-6}, extremamente significativo.

Para as análises de número de posturas por ponto amostral (Figura 48), o grupo controle exibiu a mediana de 5 posturas ao longo dos 21 dias de teste, com 25% dos organismos exibindo até 8 posturas e 25 % dos organismos apresentando 4 posturas. Os três pontos amostrais obtiveram a mediana de 8 posturas no período analisado, apresentando 1 *outlier* superior de 9 posturas e dois inferiores de 0 e 7 posturas no ponto 1. No ponto 2 e 3 houve uma variação em 25% dos organismos que apresentaram um total de 7 posturas.

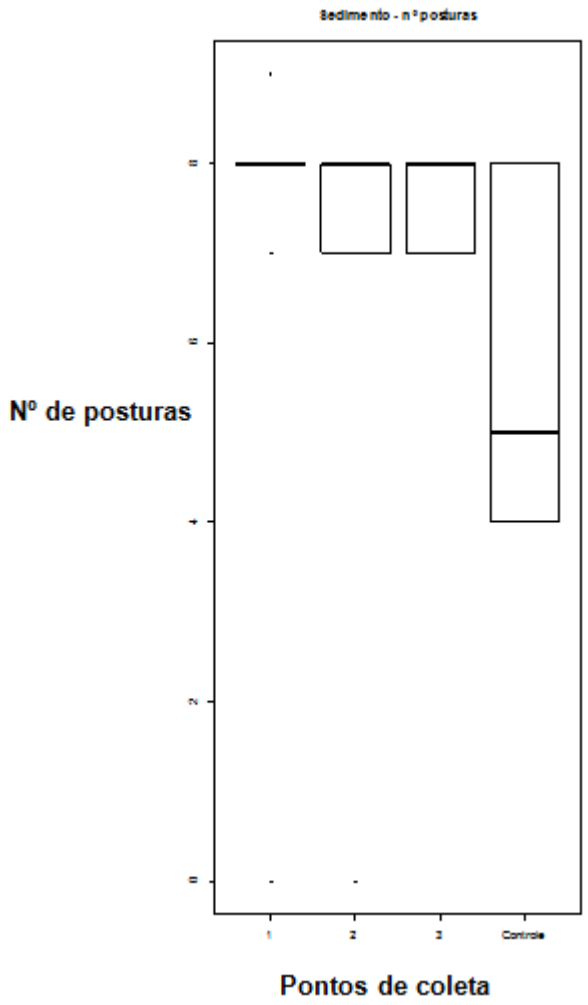


Figura 48- Análise estatística do número de posturas realizadas para os 3 pontos e grupo controle. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número de posturas e os pontos 1 e 2.

Considerando os grupos controle que apresentaram quase 100% de número total de 5 posturas, 25% das posturas realizaram 8 posturas e 25% realizaram 6 posturas no decorrer do teste. Esses resultados concordam, em parte, com as

considerações de Rand (1995), que define como número esperado de posturas é entre 3 a 5, ao longo dos 21 dias, em testes desenvolvidos exclusivamente com água.

4.7.3.3 Média (taxa) de número de filhotes produzidos

O valor de “p” para os testes envolvendo a comparação entre os pontos amostrais, considerando o *end point* do número médio de filhotes produzidos (Figura 49) com amostras de sedimento, apresentou o valor de 2,515X 10^{-8}, extremamente significativo. A mediana foi de aproximadamente 15,5 filhotes por postura no grupo controle, sendo que 25% dos organismos apresentaram produção média de 20 filhotes por postura e 25% 14,7 filhotes por postura. O ponto 1 obteve mediana 16, o 2 e 3 obtiveram mediana de 25 filhotes por postura. O ponto 2 obteve as maiores variações. Não houve amostra que não causou efeito na reprodução dos organismos, todas as amostras diferiram do grupo controle.

Os resultados obtidos discordam dos de Terra et al. (2008), que descreveu redução no número de filhotes produzidos. Neste trabalho os autores analisaram quatro locais para a qualidade do sedimento, de março de 2001 a março de 2005, através de ensaios crônicos com *Daphnia magna*. Ocorreu resposta negativa para a mortalidade, que foi acompanhada muitas vezes por resposta positiva para a deficiência reprodutiva, presença de toxicidade crônica. Na sobrevivência predominaram as respostas negativas enquanto que na reprodução a situação foi inversa, sendo as respostas positivas frequentes. Os pontos mais críticos foram em uma região de classe 3 com 54% das amostras apresentando baixo nível reprodutivo, seguido por uma amostra de região de classe 2 com 42% de amostras com essa característica.

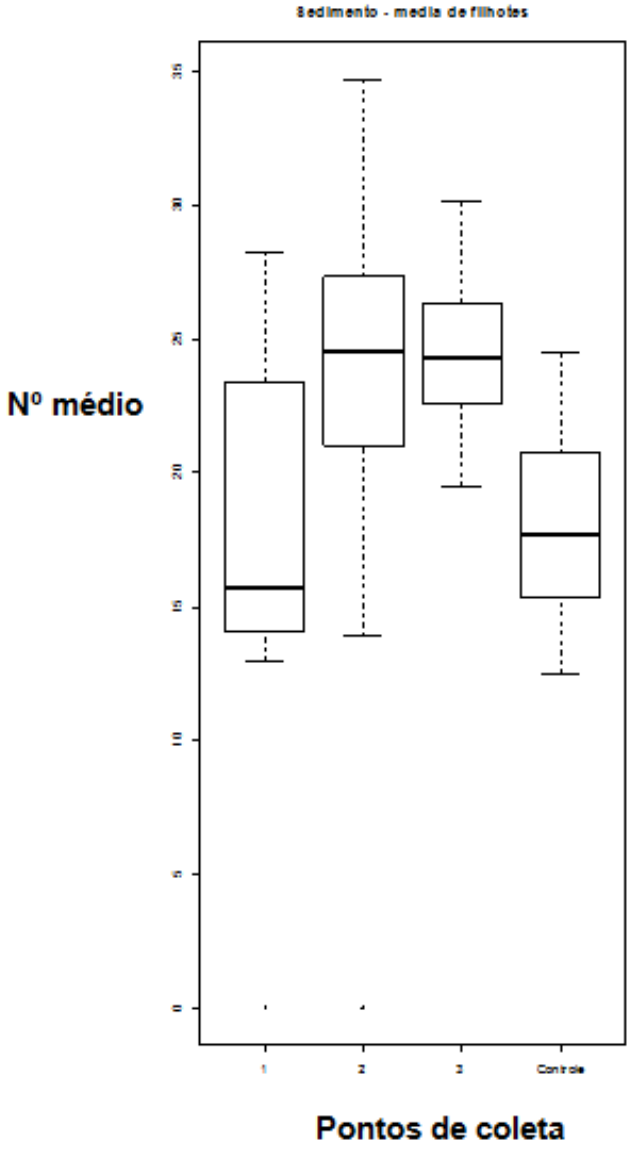


Figura 49– Gráfico da análise estatística do número médio de filhotes para os 3 pontos de coleta e grupo controle. O asterisco (*) representa valores discrepantes em relação ao número médio dos filhotes produzidos e os pontos 1 e 2.

4.8 TESTES COM *C. sancticaroli*

4.8.1 Testes de sensibilidade com *C. sancticaroli*

O valor médio da CE_{50} (Anexo B) para a substância de referência KCl foi de 4,31 mg/L, o desvio padrão foi de 0,371mg/L e as variação dos limites inferior e superior entre 3,95 mg/L e 5,31 mg/L, enquadrando-se nas faixas de sensibilidade apresentadas nos trabalhos de Dornfeld (2006), entre 3,55 mg/L e 5,36 mg/L,

Rebechi (2012), entre 4,03 mg/L e 5,54 mg/L, e Richardi (2013), entre e 3,26 a 5,58 mg/L.

O valor encontrado no presente estudo, para a CE_{50}, garantiu que os organismos utilizados estavam em condições aceitáveis de sensibilidade para o desenvolvimento dos testes agudos e crônicos, gerando, portanto, resultados aceitáveis.

No cultivo de *C. sancticaroli* foi utilizado um meio de cultivo padronizado por Dornfeld (2002) (Anexo C), esse meio de cultivo foi também o mesmo utilizado por Rebechi (2012) e Richardi (2013). Para o desenvolvimento dos testes, também foi utilizado esse mesmo meio de cultivo. A dieta e as medidas ofertadas, de Tetramin® moída, foram diferentes em todos os trabalhos mencionados.

4.8.2 Teste agudo com matriz sedimento com *C. sancticaroli*

Foram realizados um total de nove testes agudos, em triplicata, com os sedimentos coletados, sendo testada apenas uma proporção de sedimento coletado em relação à água de cultivo, onde não ocorreu a expressão do efeito tóxico em 4 dias. Todas as amostras de sedimento, em todas as coletas, obtiveram o mesmo resultado para análise de sedimentos, não foi expressa a imobilidade para os organismos testados em 4 dias. O controle realizado com o sedimento de areia de sílica também não expressou toxicidade, obtendo 0% de imobilidade, o que garantiu a validade do teste.

Os resultados apresentados discordam do trabalho desenvolvido por Dornfeld (2006), pois não ocorreu expressão da toxicidade ou o *end point* utilizado não foi eficiente. Em uma das etapas do trabalho de Dornfeld foi avaliada a toxicidade dos sedimentos de vários pontos do Rio Monjolinho, em São Paulo, utilizando *C. xanthus*. Foi utilizado um índice de toxicidade, no qual a amostra seria considerada tóxica se a letalidade fosse superior a 50%, e não tóxico, com letalidade inferior a 10%. Para os estudos desenvolvidos com sedimento coletado em campo em vários pontos no rio Monjolinho, em São Paulo, em março de 2003, os resultados dos testes de toxicidade aguda com *C. xanthus* apontaram para indícios de toxicidade em três pontos de coleta, com correlação positiva da

biodisponibilidade no sedimento para o Cobre, Ferro e Manganês e fósforo total na água. Indícios de toxicidade também ocorreram nos meses de julho e em outubro de 2003 e em janeiro de 2004, em cinco pontos de coleta, sendo um desses pontos uma nascente. Em outubro ocorreu correlação do indício de toxicidade com a biodisponibilidade de todos os metais no sedimento, bem como para o fósforo total e nitrogênio orgânico total e matéria orgânica no sedimento. O sedimento foi considerado tóxico apenas em duas estações, em julho de 2003 sem correlação com nenhum parâmetro e em outubro de 2003, onde ocorreu a correlação já mencionada. Para os bioensaios desenvolvidos *in situ*, ocorreu baixo índice de sobrevivência, entre os meses de outubro de 2003 e janeiro de 2004. A autora considerou que os resultados não indicavam toxicidade, pois tratavam-se de pontos localizados em uma área de nascentes de rios, 90% em outubro de 2003 e de 60% em janeiro de 2004. A mortalidade *in situ* poderia ter sido atribuída a fatores relacionados a predadores que invadiram a câmaras de ensaio, ou a baixa concentração de oxigênio dissolvido dentro da mesma, não necessariamente sendo os pontos próximos das nascentes, pontos contaminados que poderiam promover toxicidade.

Os resultados apresentados apresentam coerência com os de Baldan (2012), que estudou em sua tese a possibilidade do uso de *C. xanthus* ser utilizado como bioindicador para diferentes xenobióticos, determinando sua eficiência no uso de ensaios de toxicidade aguda, com concentrações letais: CL_{50}, CL_{90} e CL_{99}, exposto a alfa-cipermetrina, malation e esgoto bruto doméstico. As concentrações utilizadas para o teste agudo com esgoto bruto foram de 100; 50; 33, 25, 20, 17 e 14 %, sendo o efluente diluído em água mineral. O tempo de duração dos ensaios foi de 1, 2, 3 e 4 dias. Características físicas e químicas do efluente foram fornecidas pela empresa que desenvolveu o tratamento do mesmo, sendo que o pH variou de 7,3 a7,5; a DQO de 591,2 a 236,8 mg/L e a DBO_5 oscilou entre 349,3 a 118,0 mg/L. Dados referentes aos parâmetros de fósforo total e índices de nitrogênio não foram fornecidos e também não foram avaliados no decorrer do trabalho. Não foi observada a mortalidade de *C. xanthus* de 50% ou mais em nenhuma das concentrações e tempos de ensaio propostos. Os valores estimados para as concentrações letais foram de: CL_{50} 108,2%, a CL_{90} 187,9% e a CL_{99} 205,8 %, havendo diferença significativa apenas de CL_{50} para as demais. Houve diferença significativa entre as médias de mortalidade, na concentração de 50% e

100% de efluente bruto diluído em água mineral, as mortalidades foram de 24,2% e 41,9% em relação ao controle. Para as concentrações 30, 25, 20 17 e 14%; os resultados foram de 9,8; 5,0; 0,0; 1,2 e 0,0% de mortalidade. Baldan concluiu que *C. xanthus* não é um bom indicador quando utilizado em ensaios agudos com esgotos brutos de ETED.

4.8.3 Resultados para os testes crônicos com *C. sancticaroli*

As medidas do comprimento total corporal (cm) dos Chironomidaes (Tabela 11) foram mensuradas ao término dos testes de toxicidade. Para tanto, os organismos foram anestesiados com mentol diluído em água deionizada colocados delicadamente sobre uma placa de Petri com um papel milimetrado fixado no fundo da placa e observados em lupa binocular esteroscópica Olympus.

Tabela 10 - Resumo dos resultados dos testes desenvolvidos com as amostras de sedimento das três campanhas para *C. sancticaroli*. A média refere-se ao comprimento

	Estação	Ponto amostral	Comprimento corporal	Variância	Desvio padrão	Média + 2 DP	Média – 2 DP
1	Verão	Controle	6,000	1,000	1,000	8,000	4,000
1	Verão	1	11,400	1,640	1,281	13,961	8,839
	Verão	2	*	*	*	*	*
1	Verão	3	14,000	2,000	1,414	16,828	11,172
2	Outono	Controle	5,800	0,760	0,872	7,544	4,056
2	Outono	1	10,800	1,960	1,400	13,600	8,000
2	Outono	2	*	*	*	*	*
2	Outono	3	15,000	0,000	0,000	15,000	15,000
3	Inverno	Controle	6,100	0,290	0,539	7,177	5,023
3	Inverno	1	10,800	3,160	1,778	14,355	7,245
3	Inverno	2	*	*	*	*	*
3	Inverno	2	*	*	*	*	*

Legenda: * significa que os dados de comprimento não foram apresentados na tabela porque houve emergência antecipada das larvas em alados.

Todos os organismos expostos ao sedimento do ponto amostral 2, de todas as campanhas, e a maioria dos organismos expostos ao sedimento do ponto amostral 3 não apresentam as medidas registradas na tabela, devido ao desenvolvimento anormal. Como resultados da exposição para essas duas

amostras, o desenvolvimento corporal ocorreu mais rapidamente do que o esperado, o que ocasionou na emergência e transformação da larva no adulto alado no término do teste, após 8 dias, inviabilizando a comparação da média do comprimento corporal desses organismos com os expostos ao sedimento controle. Dessa forma, esses resultados não puderam ser tratados com testes estatísticos, sendo apenas apresentados e comparados, de forma bruta, com a literatura técnica.

Dornfeld (2006) desenvolveu 3 testes crônicos com *C. xanthus* expostos a sedimento contaminado artificialmente com cádmio e cobre. Foi avaliada a letalidade e o comprimento do corpo. Ocorreu sobrevivência de 81% dos organismos expostos à combinação de cádmio com cobre. Com relação ao comprimento corporal, após 10 dias de ensaio, para o teste 1 a média foi de 1,12 cm, para o organismo controle; no teste 3 1,19cm; para o organismos exposto ao tratamento com o cádmio, no teste 1 a média foi de 1,21cm, e no teste 3 de 1,06 cm, para o tratamento com cobre a média para o teste 1 foi de 1,23 cm para o organismos exposto ao cobre, e no este 3 foi de 1,08cm.

No que se refere à capacidade de sobrevivência em ambientes contaminados por períodos prolongados, Chironomidaes apresentam-se como organismos resistentes em ambientes que apresentam contaminação orgânica. Sokolova, Paliy e Izvekova, (1992) estudaram o rio Sestra, jusante da Klin, em uma cidade na região de Moscou. Durante dois anos coletaram amostras de um local a cerca de 250 metros a jusante da descarga de um efluente de uma instalação de tratamento de esgoto. Concluiu-se que *Chironomus piger* possui a capacidade de permanecer em esgoto bruto, provavelmente devido a sua capacidade de depurar a água, promovendo um aumento da concentração de oxigênio dissolvido, garantindo uma melhora gradativa do seu mesocosmos e, consequentemente, a sua permanência em ambientes com condições pouco favoráveis. Foi possível evidenciar que *C.piger* atua como “filtro biológico” em ambientes dulcícolas, promovendo a remoção de bactérias.

Al-Shami et al. (2010), também fez inferência com relação a sobrevivência e resistência de espécies de Chironomidades em ambientes com contaminação orgânica. Foi analisada a influência de parâmetros físicos e químicos sobre a abundância e diversidade de oito grupos de Chironomidades em seis rios, de novembro de 2007 até março de 2008. Os rios variavam entre águas

moderadamente poluídas a águas altamente poluídas, na Bacia do Rio Jur, na Malásia. Chironomidaes apresentaram tolerância às flutuações do meio, foram encontrados em ambientes com alto grau de comprometimento, como ambientes ricos em matéria orgânica. O organismo *Tanytarsus formosanus* (Chironomidae) foi bastante sensível à deterioração da qualidade da água e sedimentos na Bacia do Rio Juru. No entanto, *Chironomus kiiensis*, *Chironomus javanus*, e *Polypedilun trigonus* foram altamente tolerantes à contaminação orgânica e por metais, distribuindo-se de forma abundante em todos os afluentes da Bacia do Rio Juru.

Com relação à emergência, um resultado bastante interessante foi encontrado por Penillen e Soimasuo (1993), que estudaram a toxicidade de sedimentos contaminados por efluentes de fábrica de celulose de papel, a pesquisa foi desenvolvida parte na Finlândia e parte na Rússia. Os testes, agudos e crônicos, incluíram determinações de crescimento corporal, testes de emergência e mortalidade das larvas de *Chironomus riparius*. Os sedimentos foram coletados em seis pontos, sendo um deles no rio Saimaa (Finlândia), outros três pontos, a jusante de uma serralheria e uma fábrica de papel (lago Ladoga), e os dois últimos pontos, a jusante da cidade Sortavala (Rússia) em um lago receptor, sem qualquer sistema de tratamento de águas residuais. O sedimento referência veio de um ponto que não possuía interferência de efluentes, agricultura, e indústria, a montante do rio Saimaa. Os testes de toxicidade mostraram que as larvas cresceram tanto quanto, e até mais, nos sedimentos poluídos do lago Saimaa e do Lago Ladoga, do que no sedimento referência. Segundo os autores, esse fato, possivelmente, deve-se à eutrofização causada pelos nutrientes despejados nos lago Ladoga e no rio Saimaa. Os testes de toxicidade mostraram que a mortalidade e o número de deformidades nas larvas em sedimentos poluídos do lago Saimaa, na Finlândia, foram comparáveis com o sedimento referência. A mortalidade mais elevada, de 40%, foi observada para os sedimentos advindos do lago Ladoga, que apresentou teores mais elevados de níquel, cromo, chumbo, zinco e manganês. Com os sedimentos do rio Saimaa e Ladoga, as emergências dos Chironomidaes foram precoces, e o desenvolvimento do tamanho do corpo foi superior ao controle.

5 CONCLUSÕES

Para as amostras coletadas e analisadas entre janeiro a julho de 2013 foi possível inferir que:

1. Para as amostras testadas não houve resultado positivo de toxicidade aguda, tanto para a matriz água como para a matriz sedimento utilizado o organismo *D. magna*.
2. Não foi possível utilizar o sedimento padronizado de areia de sílica da Sigma-Aldrich como sedimento controle, pois esse sedimento foi testado em *D. magna* e ocorreu letalidade no teste agudo, com duração de 2 dias.
3. Não houve diferença de toxicidade entre as análises com as amostras de água refrigerada e preservada por congelamento, pois o FT_D = 1 para todas as amostras, portanto, se havia toxicidade não foi expressa em 48 horas.
4. Não foi detectada a toxicidade aguda através da imobilidade para a matriz sedimento com o organismo *C. sancticaroli*.
5. Houve efeito crônico para os testes com toxicidade crônica para a matriz água, ocorrendo letalidade e baixa fertilidade para amostras coletadas próximas da ETED, e aumento da fertilidade nos pontos a montante e jusante da ETED.
6. Houve efeito crônico do sedimento, pois em todas as amostras ocorreu acréscimo da reprodução em relação ao grupo controle.
7. Para os testes crônicos com sedimento, desenvolvidos com *C. sacticaroli*, a emergência foi precoce na exposição de organismos aos sedimentos teste.
8. Os pontos amostrados não atendem a Resolução nº 430 (2011), pois todas as amostras promoveram efeito crônico na fertilidade dos Daphnideos, e efeito letal após 10 dias de exposição para as amostras de maior concentração provenientes do ponto próximo da ETED.
9. O teor de oxigênio dissolvido encontra-se bastante reduzido nos pontos analisados;
10. Os resultados das análises de DQO, $DBO_{5,}$ PT e NAT indicam que as amostras coletadas podem conter poluição proveniente de esgotos domésticos ou insuficientemente tratados;

11. Os resultados para a avaliação de Coliformes termotolerantes corroboram que todas as amostras coletadas extrapolam os limites, para todas as classes de água doce, definidas pela Resolução CONAMA nº 357 (2005).

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Estudos sobre a contaminação por hormônios, metais pesados e presença de cafeína já foram desenvolvidos nos pontos estudados, mas seria necessária uma avaliação conjunta no mesmo período, onde as amostras para o desenvolvimento dessas análises fossem as mesmas para as análises ecotoxicológicas, no sentido de demonstrar que efetivamente ocorre contaminação por efluentes de esgoto, nos pontos analisados.
2. Seriam necessárias avaliações de outros *end points*, morfológicos e fisiológicos, tanto em *D. magna* como em *C. sancticaroli*, para investigar alterações nesses organismos que possam ser diretamente relacionadas à contaminação por efluentes de ETED ou amostras de águas receptoras de esgoto doméstico. Além disso, testes com tempo de recuperação dos organismos expostos e testes com a prole dos organismos testados também deveriam ser desenvolvidos.
3. Projetos com todas as observações supracitadas deveriam ser desenvolvidos em diferentes ETED, para que os resultados fossem comparados, traçando assim um perfil dos possíveis efeitos das amostras contaminadas por esgoto em *D. magna* e *C. sancticaroli*.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática - Método de ensaio com algas (Clorophyceae), 2005.

_____.**NBR 1547**: Ecotoxicologia aquática - Teste de toxicidade em sedimento - Método de ensaio com *Hyalella spp* (Amphipoda), 2007.

_____.**NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera), 2009.

_____.**NBR 15411**: Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente). Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas, 2009.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic toxicology test methods. Cap. 2, p. 19-44. In: HOFFMAN, D., J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2ª ed. Boca Raton London New York Washington, D.C, 2003.

AL-SHAMI, S. A.; RAWI, C. S. M.; AHMAD, A. H.; NOR, S. A. M. Distribuition of Chironomidae (Insecta: Diptera) in polluted Rivers of the Juru River Basin, Penang, Malaysia. **Journal of Environmental Sciences** [on line], v.22(11): p.1718-1727. 2010.

AMARAL, K. G. C. **Correlação entre fator de toxicidade e parâmetros físico-químicos para efluentes domésticos tratados.** 2012. 205 f. (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Rev. Bras. Epidemiol**. [online] v. 6, (1), p. 158-170. 2003.

APHA, AWWA - American Public Health Association, American Water Works Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** in: L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton (Eds.), 21th, Water Environment Federation,Washington - WEF, DC, USA. p. 9-72. New York, 2005.

AQUINO, S. F. de; SILVA, S. de Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise

de efluentes anaeróbios. **Eng. Sanit. Ambient.** [on line] v.11 nº.4, p. 295-304. 2006.

ARAGÃO, M. A.; BERTOLETTI, E. Avaliação da Toxicidade de Amostras de Águas Superficiais Preservadas de Diferentes Formas: Refrigeração e Congelamento. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**. [on line], v. 1, n. 2, p.153-156. 2006.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaio de toxicidade com organismos aquáticos. Cap. 6, p. 115-152. In: **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: Rima. 2008.

ARAÚJO, M. V. C; NASCIMENTO, R. B.; OLIVEIRA C. A.; STROTMANN, U. J.; DA SILVA; E. M. The use of Microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil). **Chemosphere** [on line] n. 58, p. 1277–128. 2005.

ARMITAGE, P., CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges.** London: Chapman & Hall, 1995.

AZEVEDO, F. A. M.; CHASIN*, A. A.* **As Bases Toxicológicas de Ecotoxicologia**. Ed. Vida e Consciência. São Paulo, 2004.

BALDAN, L. T. **Macroinvertebrados em cavas adjacentes do rio Iguaçu e uso de *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) como bioindicador ambiental.** 2012. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências, ênfase em Zoologia) – Programa de Pós-graduação da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

BEATRICI, A. C.; ARENZON, A.; COIMBRA N. J.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* submetidas a diferentes cultivos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**. [on line], v. 1, n. 2, 2006, 123-126, 2006.

BEKETOV, M., A.; LIESS, M. Ecotoxicology and macroecology - Time for integration. **Environmental Pollution** [on line]**,** v. 162, p.247 e 254, 2012.

BLAISE, C.; FÉRARD, J.; F. **Small-scalle freshwater toxicity investigations. Volume 1- Toxicity test methods**. Springer. Netherlands, 2005.

BOLLMANN, H. A.; MARQUES, D. M. L. M. Influência da densidade populacional nas relações entre matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo em rios urbanos situados em áreas com baixa cobertura sanitária. **Eng. Sanit. Ambient.** [on line], v.11, n.4, Rio de Janeiro Oct./Dec.2006.

BRANDÃO, C. J. (ORG.). **Guia nacional de coletas e preservação de amostras** – água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Brasília, Athalia, 2011.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 17 de março de 2005.

_____. **Resolução CONAMA nº 430**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 16 de maio de 2011.

BURTON – JUNIOR, A. G. **Sediment toxicity assessment.** Lewis Publisher. Boca Raton. United States of America, 1992.

BURTON – JUNIOR, A. G. Sediment quality criteria in use around the world. **Limnology** [on line]**,** v.3, p.65–75. 2002.

BURTON – JUNIOR, A. G.; DEBRA L.; DENTON, K. H.; IRELAND, S. D. Sediment Toxicity Testing: Issues and Methods Cap. 5, p. 111-149. In: HOFFMAN, D., J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2ª ed. Boca Raton London New York Washington, D.C, 2003.

BUSS, F. D.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro** [on line], v.19, p. 465-473. 2003.

CASSARET, A.; DOULLS. **Toxicology, the basic science of poisons**. 6. ed. Mc. Graw Hill: Books: Curtis D. Klaassen by Curtis D. Klassen. 1997.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **NT L5.406** Coliformes termotolerantes: Determinação em amostras ambientais pela técnica de tubos múltiplos com meio A1 - método de ensaio. São Paulo, 2007.

CORREIA, L. C. S. **Contribuição para o conhecimento do gênero *Chironomus meigen*, 1803, na região Neotropical**. 2004. 154f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2004.

COSTA, J. B. **Avaliação ecotoxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta.** 2007. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-graduação da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

COSTA, C. R; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova** [online], v.31, n.7, p. 1820-1830, 2008.

CUNHA; C. L. N.; FERREIRA, A. P. Modelagem matemática para avaliação dos efeitos de despejos orgânicos nas condições sanitárias de águas ambientais. **Cad. Saúde Pública** [on line], v. 22, n.8. 2006.

DA CUNHA, A. A.; SILVA, C. R.; FINKLER, R.; MATIAS, W. G. Sensibilidade do cultivo de *Daphnia magna* no laboratório de toxicologia ambiental LABTOX/ ENS/ UFSC. In: 3ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2003. Santa Catarina. **Anais...**Santa Catarina: UFS, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. p. 65. Disponível em: < http://anais.sepex.ufsc.br/anais_3/trabalhos/644.html> Acesso em: 27 jan. 2014.

DANELON; J. R. B.; NETTO, F. M.; RODRIGUES, S. C. Análise do nível de fósforo total, nitrogênio amoniacal e cloretos nas águas do córrego Terra Branca do município de Uberlândia (MG). **Revista Geonorte** [on line], v.1, n.4, p.412 – 421. 2012.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais.** Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) 211f- Programa de Pós-graduação da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.

EINSCHLAG, G. S. F. **Wastewater evaluation and management**. Disponível em: <www.intechopen.com> Acesso em: 14 fev. 2013.

ESTEVES, F., A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1988.

FERNANDES, M. N.; RANTIN, F. T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **Journal of Fish Biology** [on line], v.35, p. 509-519. 1989.

FRANCO, P. L. P. **Análise da potencialidade do reuso indireto potável: estudo de caso da ETE Atuba-Sul, região Metropolitana de Curitiba**. 2010. 238f. Dissertação (Mestrado em Ambiente Urbano e Industrial) - Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná em parceria com o SENAI-PR e a Universität Sttutgart, Alemanha. Curitiba, 2010.

FROEHNER, S; MARTINS, R. F. Avaliação da composição química de sedimentos do Rio Barigui na Região Metropolitana de Curitiba. **Quim. Nova** [on line], v. 31, n. 8, p. 2020-2026. 2008.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. London. Chapman & Hall, 1994

HADAS, O.; KOTT, Y.; BACHRACH, U.; CAVARI, B. Z. Assimilation of *E.coli* cells by *Daphnia magna* on the whole organism level. **Hydrobiologia** [on line], n. 102, p.163-171. 1983.

HAMADA, N. **Ensaios de toxicidade empregados na avaliação de efeitos no sistema de tratamento de esgotos e efluentes, ETE Suzano, e seu entorno, utilizando organismos aquáticos.** 2008. 75f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

HELLER, M, I. A cidade sitiada. **Revista Oficial do CREA-PR** [on line], n.18, p. 16-17. 2002.

HIMEDIA, **The HiMedia manual: a manual of microbiology laboratory practice. Himedia laboratories**. Pvt. Limited. Mumbai, Índia. p.795-796. 2009.

HENRIQUE, F. L.; BENTRANO, D. M. Avaliação da toxicidade aguda da Água do rio Papaquara, município de Florianópolis/SC, utilizando o organismo teste *Daphnia magna*. Revista técnico científico do Instituto federal de Santa Catarina. [on line] v. 1, nº 2. 2011.

HERNANDO; M. B.; FERNANDES-ALBA; A. R.; TAULER; R.; BARCELÓ, D. Toxicity assays applied to wastewater treatment. **J. Talanta** [on line], v. 65, p.358–366. 2005.

HOFFMAN, D. J.; BARNETT, A.; RATTNER, G.;BURTON Jr., A.; CAIRNS Jr, J. Introduction. Cap. 1, p. 1-16. In: HOFFMAN, D., J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. 2ª ed. Boca Raton London New York Washington, D.C, 2003.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. **Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts.** Disponível em: < http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/bioindicators-using-organisms-to-measure-environmental-impacts-16821310 Acesso em: 2 mai, 2013.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. **Monitoramento da qualidade das águas da Bacia do Alto Iguaçu, na região metropolitana de Curitiba, no período de 2005 a 2009**. Curitiba, 2009

JONCZYK; E.; GIRON, G. Acute and chronic toxicity testing with *Daphnia sp*. Cap. 10, p. 337-393. In: BLAISE, C.; FÉRARD, J.; F. **Small-scalle freshwater toxicity investigations. Volume 1- Toxicity test methods**. Springer. Netherlands, 2005.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos – métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis-SC: FATMA/GTZ, 2004.

KOBAYASHI, E. M. C. Otimização de procedimento de caracterização de materiais catalíticos empregando fluorescência de raios-x por energia dispersiva. **Revista Analytica** [on line], n.50 p. 62 -1 1044. 2011.

LEAL, L.; H.; SOETER, A. M.; KOOLS, S. A.; KRAAK, M. H.; PARSONS, J. R.; TEMMIN, H.; ZEEMAN, G.; BUISMAN, C. J. Ecotoxicological assessment of grey water treatment systems with *Daphnia magna* and *Chironomus riparius*. **Water research** [on line], v. 46, n.4, p. 1038 -1 1044. 2012.

LOURDES, A. M.; LOUREIRO, E. M. **Manual de identificação de cladóceros límnicos** do Brasil. Editora Universa. Taguatinga, DF, 1997.

LICHT, O. A. B. **A geoquímica multielementar na gestão ambiental – identificação e caracterização de províncias geoquímicas naturais, alterações antrópicas das paisagem, áreas favoráveis a prospecção mineral, e região de risco para a saúde no Estado do Paraná, Brasil.** Tese (Doutorado em Geologia) 236f- Programa de Pós-graduação em Geologia, Universidade Federal do Paraná, 2001.

MAGALHÃES; D. P.; FERRÃO FILHO; A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras**. [on line], v. 12, p: 355-381. 2008.

MALUF, C**. Avaliação Toxicológica da Água do Corrego da Sub-bacia da UFSC utilizando *Daphina magna* como Organismo-teste. 2008.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Sanitária Ambiental) 91f, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

MARANHO, L. A.; NIEWEGLOWKI, A. M. A 1995, Influência da dureza da água no estudo da reprodução de *Daphnia magna* (Straus, 1820). **Instituto Ambiental do Paraná**, 5: 33-52.

MARIN, M.; C. F. C.; SCUISSIATO, C.; FERNANDES, C. S.. PORTO, F. A. Proposta preliminar de reenquadramento dos corpos de água em classes de avaliação do seu risco e não atendimento: estudo de caso da bacia do Alto Iguaçu. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 7, 2007. São Paulo. **Anais**:... São Paulo: ABRH-Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 2007 p. 1-18.

MARANHO, L. A.; NIEWEGLOWKI, A. M. A. Influência da dureza da água no estudo da reprodução de *Daphnia magna* (Straus, 1820). **Instituto Ambiental do Paraná**, 5: 33-52. 1995.

MARQUEZI, M. C.; GALLO, C. R.; DIAS, C. T. S. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** [on line], v.69, n.3, p.291-296. 2010.

MARZIO, W. D. D. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety** [on line]**,** v.61, n.3, p.380–391. 2005.

MC. NULTY, E. W.; DWYER, F. J.; ELLERSIECK, M. R.; GREER, E. I.; INGERSOLL, C. G.; RABENI, C. F.. Evaluation of ability of reference toxicity tests to identify stress in laboratory populations of the amphipod *Hyalella azteca*. **Environmental Toxicology and Chemistry** [on line], v.18, p. 544–548.1999.

MENDONÇA, E.; CUNHA, M. A.; PICADO, A; LEITÃO, S.; PAIXÃO, S. M.; SILVA, L.; BRITO, F. Avaliação directa da toxicidade de águas residuais: um caso de estudo – Direct toxicity assessment of wastewaters: a case study. **Recursos Hídricos: Associação Portuguesa dos Recursos Hídrico** [on line], v. 28 (1), p. 84-93. 2008.

MENDONÇA, E.; PICADO, A.; PAIXÃO, M. S.; SILVA, L.; A, CUNHA, M. A.; LEITÃO, S.; MOURA, I.; CORTEZ, I.; BRITO, F. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. **Journal of Hazardous Materials** [on line] v.163, p.665–670. 2009.

METCALF: EDDY, INC. **Wastewater engineering**: treatment and reuse. 4 ed. Boston: McGraw-Hill, 2003.

MOVAHEDIAN, H. et al. Toxicity Evaluation of Wastewater Treatment Plant Effluents Using *Daphnia magna*. **J Env Health Sci Eng** [on line], v.2, n.2/3, p.1-4. 2005.

NASCIMENTO, E. .Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformação. Cap. 3, p. 39-54. In: **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: Rima. 2008.

NUNES, F.; G. **A Influência do Uso e ocupação de solo nas vazões de pico da bacia hidrográfica do rio Atuba**. 2007. 205f. Tese (Doutorado em Geologia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Geologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD/OCD). **Test-211** - Guidelines for the testing of chemicals - *Daphnia magna* Reproduction, 2008.

PARANÁ, **Portaria SEMA nº 19.** Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Diário Oficial do Estado, 10 de fevereiro de 2006. Curitiba. 2006.

_____, **Resolução CEMA nº 81** - Conselho Estadual do Meio Ambiente. Valores de referência para descarte de efluentes. 2010.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International** [on line] v v.32, p. 265–268. 2006.

PATACA, L. C. M.; BORTOLETO, G. G.; BUENO, M. I. M. S. Determinação de Arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-x por energia dispersiva. **Química Nova** [on line], v.28, n.4, p.579-582. 2005.

PAU, C.; SERRA, T.; COLOMER , J.; CASAMITJANA, X.;KAMPF, R. Filtering capacity of *Daphnia magna* on sludge particles in treated wastewater. **Water Research** [on line] v.47,p.181-186. 2013.

PENILLEN, J.; SOIMASUO, R. Toxicity of sediments polluted by the pulp and paper industry to a midge (*Chironomus riparius* Meigen). **The Science of the Total Environment** [on line], Supplement, p. 1247-1256, 1993.

PEREIRA, I. S. A; LEITE, M. B. N. L. A. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. Cap. 17, p. 413-432. In: **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: Rima. 2008.

PIVETTA, F.; MACHADO, J. S. H,; ARAÚJO, U. C.; MOREIRA, M. F. R.; APOSTOLI, P. Monitoramento biológico: conceitos e aplicação na saúde pública. **Cad. Saúde Pública** [on line] v. 17, n.3, p. 545-554. 2001.

QUEIROZ, A. M. **Caracterização limnológica do lagamar do Cauípe – Planície Costeira do município de Caucaia – CE**. 2003. 204 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, CE, 2003.

RACHWAL; M.; F.; G.; CAMATI, A.; R. **Diagnóstico expedito sobre a ocupação e conservação dos ambientes ciliares do município de Pinhais**. Embrapa. Colombo, 2001.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Introduction to aquatic toxicology.** D. C. Taylor & Francis, Washington, 2ªed. 1995.

RAND, G.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S. Cap. 1, p. 3-67. In: **Fundamentals of aquatic toxicology: Introduction to aquatic toxicology.** D. C. Taylor & Francis, Washington, 2ªed. 1995.

REN, S.; FRYMIER, O. D. Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. **Water Research** [on line] v.37, p.1655–1661. 2003.

RIO GRANDE DO SUL, **CONSEMA RESOLUÇÃO ESTADUAL Nº 129/2006** - CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, Valores de referência para descarte de efluentes, 2006.

ROSENBERG, D. M. Freshwater biomonitoring and Chironomidae. **Netherlands Journal of Aquatic Ecology**. [on line] v.26(2-4), p.101-122. 1992.

RUPERT, E; E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1996.

SANTA CATARINA, **PORTARIA FATMA Nº 017 –** Fundação do Meio Ambiente, Valores de referência para descarte de efluentes. 2002.

SANTIAGO, L. L. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e de acumulação induzidas pela Cilindrosoermopsina (Cianotoxina) em *Chironomus xanthus* (Diptera-Chironomidae).** 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Recursos Naturais, 2012.

SANTOS, M.; A. **Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos.** 2008. 186f. Tese (Doutorado em Ciências) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, R. M. C.; NASCIMENTO FILHO, V. F. D.; APPOLONI, C. R. **Fluorescência de Raios X por dispersão em energia**. Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada. DFIS/CCE/UEL - LFNA - PT01/. Londrina. 2004.

SILVEIRA, G.; A. **Taxonomia e sistemática de *Compterosmittia sæther*, 1981 (Orthocladiinae, Chironomidae, Diptera).** 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão preto – São Paulo, 2006.

SOBRINHO, V. R. **Descrição histológica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) e efeitos histopatológicos e biológicos após a exposição ao fenantreno.** 2013. 114f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Universidade Federal do Paraná, 2013

SOKOLOVA, N. Y.; PALIY, A. V.; IZVEKOVA, B. I. Biology Of *Chironomus piger*; Str. (Diptera: Chironomidae) And Its Role In The Self-Purification Of A River. **Aquat. Ecol**. [on line], v.26 (2), p.509-512. 1992.

SOUZA, J. P. **Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento.** 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho - Centro de Aquicultura – CAUNESP, Jaboticabal– São Paulo, 2008.

SOUZA, DE C. C.; PADULA, L.; SILVA, L. F.; IRASUSTA, S. P. Validação dos Bioensaios de Toxicidade como Adjuvantes no Monitoramento de Efluentes para Descarte. **Ecotoxicol. Environ. Contam**. [on line], v. 8, n. 2. 2013.

SUNG RA, J.; LEE, B. C.; CHANG, N. I.; KIM, S. D. Comparative Whole Effluent Toxicity Assessment of Wastewater Treatment Plant Effluents using *Daphnia magna.* **Bull Environ Contam Toxicology** [on line], v.80, p.196–200. 2008.

TERRA, N., R.; FEIDEN, I. R.; FACHEL, J. M. G.; LEMOS, C. T.; NUNES, E. A. Ecotoxicological evaluation of sediment and water samples from Sinos River, Rio Grande do Sul, Brazil, using *Daphnia magna* and V79 cells. **Acta Limnol. Bras**. [on line],v. 20, n. 1, p. 63-72. 2008.

TISLER, T.; KONCAN, J. C. Toxicity evaluation of wastewater from the pharmaceutical industry to aquatic organisms. **Wat.Sci.Tech** [on line], v.39, n.10-11: p.71-76. 1999.

TOKESHI, M. Production ecology. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges.** Chapman & Hall, London, UK, 1995.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 26, p. 183-189. 1982.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região neotropical (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 33, n.2, p. 207-216. 1989.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo - **Guia de Identificação e Diagnose dos Gêneros**. Editora da Universidade de São Carlos. São Carlos, São Paulo, 1995.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica** v.11, p.1-10. 2011.

UNIVERSITÄT BASEL, ZOOLOGISCHES INSTITUT. Disponível em: <http://www.evolution.unibas.ch/ebert/publications/parasitismdaphnia/ch8.htm?view=printable> Acesso em: 13 jun. 2013.

US.EPA - United States Environmental Protection Agency. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms** - 821-R-02-012, Washington, DC. 2002.

_____.**EPA guidelines**: regulatory monitoring and testing water and wastewater sampling. Washington, DC, 2007. 15 -16p.

VILLEGAS, N.; A. GONZALES, M. C. R.; LÓPEZ, E. R. Evaluation of *D.magna* indicator of toxicity and treatment efficacy of textile waste water. **Environ Int** [on line], v.25(5): p.619-624.1999.

VON-SPERLING, M. **Princípios de Tratamento Biológico de Águas Residuárias/Introdução e qualidade das águas e do tratamento de esgotos**. 2.ed, v.1. Belo Horizonte: UFMG, 1996.

VIVEIROS, W. ***Chironomus sancticaroli* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sediment**o. 2012. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WALKER, C., H. et al. **Principles of ecotoxicology**. 2ª ed. Taylors & Francis. 2004.

YSI Environmental. **Operations Manual** - YSI 550A Dissolved Oxygen Instrument. Disponível em:< http://www.ysi.com/media/pdfs/605348-YSI-550A-Operations-Manual-RevB_001.pdf> Acesso em: 10 out. 2012.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E.; GODSTEIN, E. G.; DE SOUZA, H. B. Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos.Rev. SABESP [on line], nº166: p.1-6.1992.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. Cap. 1, p. 1-13. In: **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. São Carlos: Rima. 2008.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima. 2008.

APÊNDICE A

Carta controle elaborada para *D. magna* com a substância de referência dicromato de potássio.

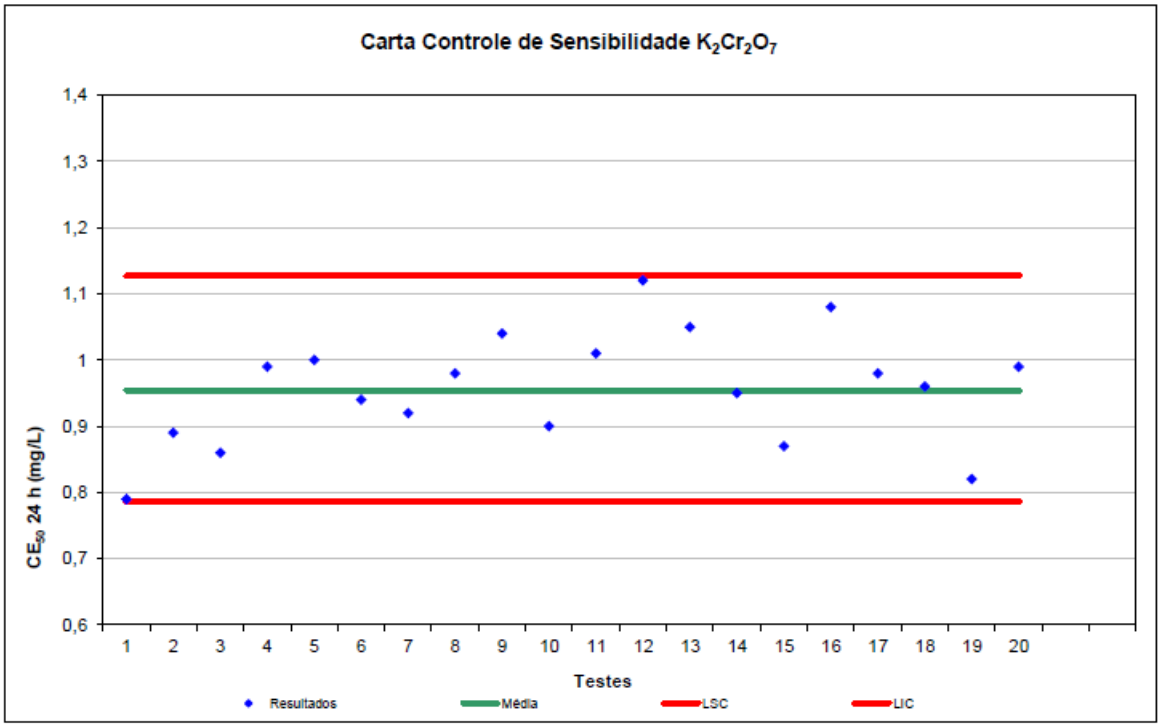


Figura A 1 - Carta controle contendo os valores da CE50 para *Daphnia magna* exposta à substância de referência dicromato de potássio.
Fonte: Autoria própria

APÊNDICE B

Carta controle elaborada para *C. sancticaroli* com a substância de referência cloreto de potássio.

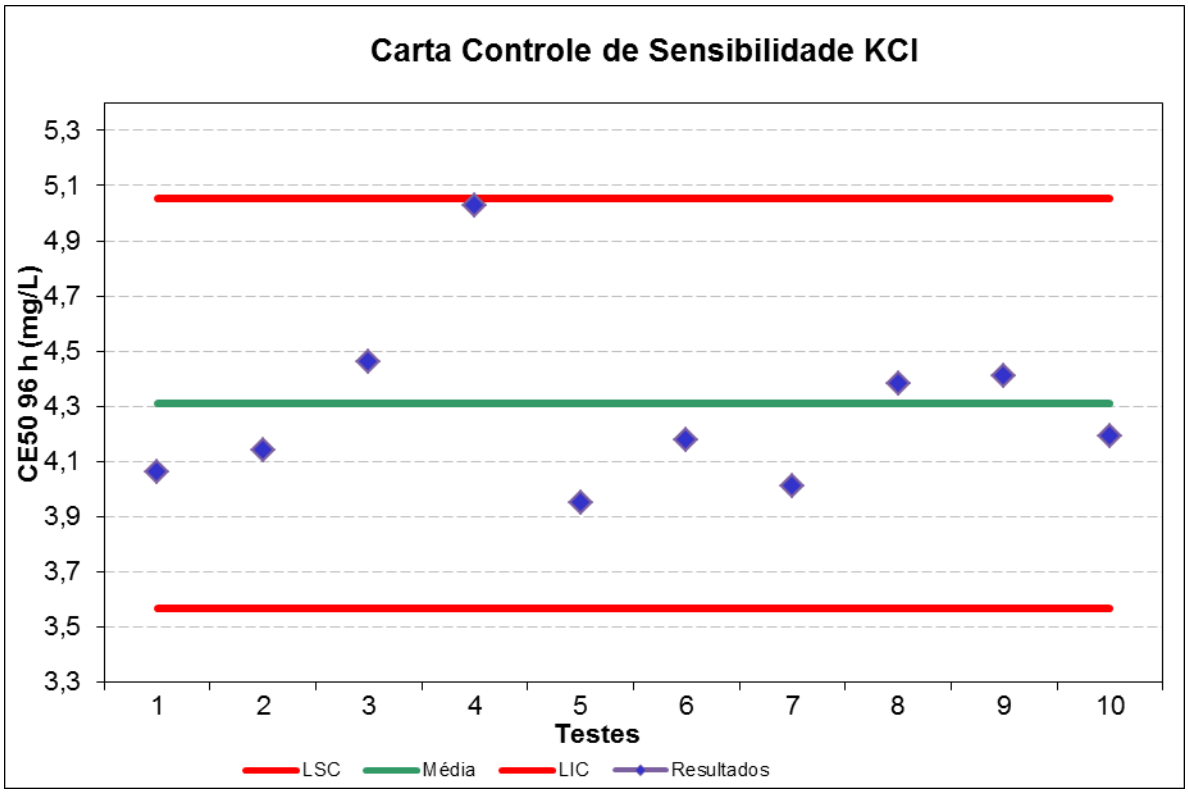


Figura A 2 - Carta controle contendo os valores da CE50 para *Chironomus sancticaroli* exposto à substância de referência Cloreto de Potássio.
Fonte: Autoria própria

ANEXO A

Na Tabela A 1 estão listadas as Soluções - estoque, reagentes e suas proporções para a elaboração de 1L de cada Solução - estoque para a elaboração do M4 (ABNT/NBR 12713, 2009).

Tabela A 1 - Elementos necessários para a elaboração do M4.
Fonte: ABNT/NBR 12713 (2009) adaptado.

Solução - estoque	Reagentes	Massa
1.1	$CaCl_2.2H_2O$	73,5 g
1.2	$MgSO_4.7H_2O$	123,3 g
1.3	KCl	5,8 g
1.4	$NaHCO_3$	64,8 g
1.5 - Catiônica	$MnCl_2.4H_2O$	7,21 g
	LiCl	6,12 g
	RbCl	1,42 g
	$SrCl_2.6H_2O$	3,04 g
	$ZnCl_2$	0,26 g
	$CoCl_2.6H_2O$	0,2 g
	$CuCl_2.2H_2O$	0,335g
1.6 - Aniônica	$NaNO_3$	0,548 g
	H_3BO_3	5,719 g
	NaBr	0,032 g
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,126 g
	NH_4VO_3	0,00115 g
	KI	0,0065 g
	$NaSe_2O_3$	0,00438 g
1.7- Silicato	Na_2SiO_3	21,475 g
1.8 - Fe/EDTA	$Na_2.2H_2O$– EDTA	1,000 g
	$FeSO_4.7H_2O$	0,3980 g
1.9 - Fosfato	KH_2PO_4	0,286g
	K_2HPO_4	0,368 g
1.10- Vitamínica	Hidrocloreto de Tiamina	0,75 g
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	0,01 g
	D (+)Biotina	0,0075 g

Para o preparo de 50L de M4 são utilizadas as proporções da Tabela A 2, aferindo-se o barrilete para 50L:

Tabela A 2 - Proporções das soluções estoque necessários para a elaboração do M4.
Fonte: ABNT/NBR 12713 (2009) adaptado.

VOLUME DA SOLUÇÃO ESTOQUE A SER DILUÍDO EM 50 L
140 mL da solução básica 1.1
40 mL da solução básica 1.2
40 mL da solução básica 1.3
40 mL da solução básica 1.4
05 mL da solução catiônica 1.5
25 mL da solução aniônica 1.6
10 mL da solução de Silicato 1.7
250 mL da solução Fe/EDTA 1.8
25 mL da solução Fosfato 1.9
05 mL da solução Vitamínica 1.10

Para o preparo de 10L da água de diluição, usada nos testes de toxicidade aguda com *D. magna*, foram listadas na Tabela A 3 as proporções de solução estoque, aferindo-se o barrilete para 10L.

Tabela A 3 - - Proporções das soluções estoque necessários para a elaboração da água de diluição.
Fonte: ABNT/NBR 12713 (2009) adaptado.

SOLUÇÃO ESTOQUE
28 mL da solução básica 1.1
8 mL da solução básica 1.2
8 mL da solução básica 1.3
8 ml da solução básica 1.4

ANEXO B

O meio CHU, meio de cultivo para as algas que foram ofertadas para a alimentação de *D. magna*, foi desenvolvido conforme as proporções das Soluções Estoque da Tabela 4, cada qual para a elaboração de 1L de Soluções Estoque.

Tabela B 1 - Proporções das soluções estoque necessários para a elaboração do meio Chu. Fonte: ABNT/NBR 12648 (2011) adaptado.

Solução Estoque	Reagente	Massa	Volume da Solução Estoque a ser diluído em 1L
I	$NaNO_3$	25g ± 0,30g	10 mL
II.	$CaCl_2 . 2H_2O$	2,5g ± 0,005g	10 mL
III	$MgSO_4 . 7H_2O$	7,5g ± 0,005g	10 mL
IV	K_2HPO_4	7,5g ± 0,005g	10 mL
V	KH_2PO_4	17,5g ± 0,30g	10 mL
VI	NaCl	2,5g ± 0,005g	10 mL
VII	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ KOH	50g ± 0,30g 31g± 0,30g	1 mL
VIII	$FeSO_4 . 7H_2O$	4,98g ± 0,005g	1mL
IX	H_3BO_3	11,42g ± 0,005g	1 mL
X	$ZnSO_4 . 7H_2O$ $MnCl_2 . 4H_2O$ MoO_3 $CuSO_4 . 5H_2O$ $Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,0882g ± 0,0005g 0,0144g ± 0,0005g 0,0071g ± 0,0005g 0,0157g ± 0,0005g 0,0049g ± 0,0005g	0,1 mL

- O Meio é CHU de cultivo preparado pela mistura de 10 Soluções-estoque, ricas em sais nutrientes e microelementos (Tabela A 4). O volume das Soluções – estoque devem ser aferido para 1.000 mL em balão volumétrico com água ultrapurificada. Em seguida, o Meio CHU deve ser distribuído em pequenos volumes de 100 mL e ser esterilizado em autoclave a 1,1 atm, por 15 minutos.

Tabela B 2 - Proporções das soluções estoque necessários para a elaboração do Meio CHU de cultivo de algas.
Fonte: ABNT/NBR 12648 (2011) adaptado.

Proporções para o preparo de 1.000 ml de Meio de CHU para cultivo de algas	
Volume	Soluções- estoque
10 mL	I, II, III, IV, V e VI
1 mL	VII, VIII e IX
0,1 mL	X

ANEXO C

O meio cultivo de *C. sancticaroli* utilizado nesse trabalho seguiu a metodologia desenvolvida por Dornfeld (2002). Para a elaboração do meio, que também é utilizado nos testes, como água de diluição – tanto para efluentes como para quaisquer substâncias de concentração conhecida, ou mesmo acompanhando ensaios com sedimento, são utilizadas apenas duas soluções estoque (Tabela C1).

Para o preparo de cada solução estoque, aferir para 1L de água destilada ou ultrapura. O pH deve variar entre 6,5 a 7, e a dureza entre 12 a 16 mg de $CaCO_3$.

Tabela C 1 - Instruções para a elaboração do meio de cultivo de *C. sancticaroli*.
Fonte: DORNFELD (2002) adaptado.

Soluções estoque	Reagentes	Massa	Volume a ser adicionado para a elaboração de 50L meio de cultivo
I	$CaSO_4$. $2H_2O$	1,5 g	400 mL
II	KCl	0,2 g	200 mL
	$NaHCO_3$	4,8 g	
	$MgSO_4.7H_2O$	6,1 g	