

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE TRÊS SUBSTÂNCIAS
DE REFERÊNCIA AO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2013

LUIS FELIPE ONISANTI KNAPIK
MORGANA ANDREATTA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE TRÊS SUBSTÂNCIAS
DE REFERÊNCIA AO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna***

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado para obtenção do grau de
Tecnólogo no curso de Tecnologia em
Processos Ambientais da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR.

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa
Ramsdorf.

CURITIBA
2013

**LUIS FELIPE ONISANTI KNAPIK
MORGANA ANDREATA**

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE TRÊS SUBSTÂNCIAS
DE REFERÊNCIA AO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Ms. Taynah Vicari
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Membro 2 – Ms. Jeferson Nagata
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Orientadora – Prof^a. Dr^a. Wanessa Algarte Ramsdorf
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Prof^a. Dr^a. Valma Martins Barbosa

Curitiba, 29 de abril de 2013.

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

Aos nossos pais que ensinaram os verdadeiros valores da vida, auxiliando-nos a traçar os nossos caminhos, por terem sido nossos maiores incentivadores e por terem sempre nos apoiados nos momentos difíceis contribuindo assim para a nossa formação acadêmica.

À nossa querida Professora Dra. Wanessa Ramsdorf por aceitar nossa orientação, por todo seu empenho, dedicação, carinho e confiança ofertados durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela estrutura oferecida;

A todos os professores que ministram aula para o curso de Tecnologia em Processos Ambientais que a nós transmitiram seus conhecimentos;

Aos professores Thomaz Aurélio Pagioro e Lucia Regina Rocha Martins, por ceder o laboratório de Ecotoxicologia para podermos realizar nosso trabalho;

Às técnicas chefes do laboratório de ecotoxicologia do Instituto Ambiental do Paraná, Elenize e Márcia, pelo apoio, incentivo e colaboração para que este trabalho pudesse ser realizado;

Aos nossos amigos Bruna Vigo, Letícia Gonçalves, Maiara Soares, Mayara Gabriela e Regiane Reque pelo incentivo, amizade, que sempre tiveram conosco;

Aos nossos amigos e companheiros do Laboratório de Ecotoxicologia, em especial a mestrandia Juliana Túlio pela ajuda na realização desse trabalho;

Aos nossos amores por todo carinho, amor, paciência e ajuda ofertada para a realização deste trabalho.

Enfim a todos que contribuíram tanto diretamente como indiretamente para a conclusão dessa pesquisa.

RESUMO

ONISANTI, Luís; ANDREATTA, Morgana. Avaliação de toxicidade de três substâncias de referência ao microcrustáceo *Daphnia magna*. Trabalho de conclusão de curso - Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

O desenvolvimento de produtos e tecnologias vem aumentando significativamente, resultando no lançamento de agentes químicos e físicos, contaminando a biota terrestre e aquática e provocando desequilíbrios ambientais. A concentração crescente destes resíduos em ecossistemas aquáticos tem despertado cada vez mais interesse, tanto pela quantidade e variedade, quanto pela toxicidade, a qual pode provocar danos, até mutagênicos, nos organismos aquáticos não-alvo, gerando assim a necessidade da avaliação dos seus efeitos nestes ecossistemas. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar possíveis efeitos toxicológicos ocasionados por substâncias de referência (Dicromato de Potássio, Sulfato de Cobre e Cloreto de Potássio), utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* como organismo-teste, através do ensaio tradicional de sensibilidade (avaliação toxicológica). Os testes de sensibilidade foram realizados em laboratório, de acordo com metodologias normatizadas e algumas adaptações. Os valores de CE50-24h calculados para *Daphnia magna* foram de 0,82 mg/L para o dicromato de potássio e 0,17 mg/L para o sulfato de cobre. Os valores de CE 50-48h calculados para *Daphnia magna* foram de 698,8 mg/L para o cloreto de potássio. Todas as substâncias utilizadas forneceram resultados satisfatórios para que um determinado método analítico seja desenvolvido de forma consistente e preciso, tendo destaque o cloreto de potássio cuja padronização não necessitou de diversas alterações na metodologia, além de ser mais seguro com relação à disposição no ambiente e manuseio. Como objetivo específico, foi proposta avaliação dos efeitos genotóxicos, através ensaio cometa, das três diferentes substâncias por meio de danos ao DNA de *Daphnia magna* a partir da CE50 encontrada nos testes de sensibilidade. Por ter sido encontrado poucos cometas por lâmina, não foi possível fazer o cálculo estatístico dos danos, os quais eram difíceis de serem identificados. Este empecilho pode ser atribuído ao fato de que o material celular da *Daphnia magna* é muito pequeno, dificultando assim a visualização de algum cometa no microscópio, mesmo na objetiva de 100x. Além do material celular do microcrustáceo utilizado ser muito pequeno, houve muita perda de material pelo uso de um desagregador incompatível durante o preparo da suspensão celular para o ensaio cometa. No entanto a metodologia adaptada e introduzida no laboratório foi utilizada para peixes e apresentou resultados satisfatórios.

Palavra-chave: Toxicidade. Teste de sensibilidade. Avaliação toxicológica. *Daphnia magna*.

ABSTRACT

ONISANTI, Luís; ANDREATTA, Morgana. Evaluation of toxicity of three reference substances to *Daphnia magna* microcrustacean. Course conclusion work - Undergraduate Technology in Environmental Processes, Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2013.

The development of products and technologies has increased significantly, resulting in the release of chemical and physical agents, contaminating the aquatic and terrestrial biota and causing environmental imbalance. The increasing concentration of these residues in aquatic ecosystems has attracted increasing interest, both the quantity and variety, as the toxicity, which can cause damage, even mutagenic in non-target aquatic organisms, thus creating the need for impact assessment these ecosystems. This study aimed to evaluate the possible toxicological effects caused by reference substances (Potassium Dichromate, Copper Sulfate and Potassium Chloride), using the test micro-organism *Daphnia magna*, by testing traditional sensitivity (toxicological evaluation). Sensitivity tests were performed in laboratory, according to standardized methodologies and some adaptations. The values of EC50-24h calculated for *Daphnia magna* were 0.82 mg / L for the potassium dichromate and 0.17 mg / L for copper sulfate. The values of EC50-48h calculated for *Daphnia magna* were 698.8 mg / L for potassium chloride. All substances used provided satisfactory outcomes and attended the purpose of reference substance, having highlighted the potassium chloride whose standardization does not required several changes in methodology as well as being safer with respect to handling and disposal on the environment. As specific objective was proposed assessment of the genotoxic effects by the comet assay, of the three different substances through DNA damage in *Daphnia magna* from the EC50 found through sensitivity tests. For a few comets have been found by the blade, it was not possible to make statistical calculation of damages, which were difficult to identify. This obstacle can be attributed to the fact that the cellular material of *Daphnia magna* is very small, making it difficult to visualize any comet in the microscope, even at 100x objective. Besides the cellular material used is too small, there were a lot of loss of material by use of a disintegrator incompatible during preparation of the cell suspension for the comet assay. However the methodology adapted and introduced into the laboratory was used for fishes and showed good results.

Keywords: Toxicity Sensitivity test. Toxicological assessment. *Daphnia magna*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Daphnia magna</i>	23
Figura 2: Organismo teste em Meio M4.	30
Figura 3: Lotes de cultivo dos organismos teste.	30
Figura 4: Cultivo de <i>Desmodesmus subspicatus</i>	32
Figura 5: Suspensão de células de alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	33
Figura 6: Teste de sensibilidade.....	34
Figura 7: Teste de sensibilidade.....	34
Figura 8: Preparo da lâmina para a realização do ensaio cometa.	36
Figura 9: Lâmina recoberta com agarose normal 1,5%.	37
Figura 10: Homogenizador tipo Potter.	38
Figura 11: Amperímetro e voltímetro.	40
Figura 12: Corrida eletroforética no escuro.	40
Figura 13: Após a corrida eletroforética.	41
Figura 14: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de CE50-24 horas do dicromato de potássio a <i>Daphnia magna</i> (LSC = limite superior calculado; LIC = limite inferior calculado).	48
Figura 15: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de CE50-24 horas do cloreto de potássio a <i>Daphnia magna</i> (LSC = limite superior calculado; LIC = limite inferior calculado).	49
Figura 16: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de CE50-24 horas do sulfato de cobre a <i>D. magna</i> (LSC = limite superior calculado; LIC = limite inferior calculado).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios de CE50-24 h (mg de $K_2Cr_2O_7/L$) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).	44
Tabela 2: Valores médios de CE50-48 h (mg de KCl) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).	45
Tabela 3: Valores médios de CE50-24 h (mg de $CuSO_4.5H_2O/L$) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).	47

APÊNDICE

APÊNDICE A- Parâmetros do meio de cultivo M4.	60
APÊNDICE B - Parâmetros da água de diluição.	62

ANEXOS

ANEXOS A - Soluções-estoque para o preparo do Meio Básico e do Meio M4.	63
ANEXOS B - Método de preparo do meio básico.	65
ANEXOS C - Critérios para aprovação do meio de cultivo.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

B1	Tiamina
B2	Lactoflavina
B6	Piridoxina
B12	Cobalamina
BOD	Incubadora Biochemical oxygen demand
$C_{12}H_{25}NaSO_4$	Dodecil sulfato de sódio
Ca	Cálcio
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
CAE	Concentração ambiental estimada da exposição de organismos não alvos aos agrotóxicos resultante da aplicação direta no ambiente
$CdCl_2$	Cloreto de cádmio
CE50	Concentração derivada estatisticamente que causa efeito, em porcentagem de imobilidade, em 50% dos organismos
Cu^{+2}	Íons cúprico
$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de Cobre
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Deoxyribonucleic acid
DQO	Demanda química de oxigênio
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
Fcv	Fator de correção volumétrico
H	Hidrogênio
H	Hora
K	Potássio
K^+	Íon potássio
KCL	Cloreto de Potássio
$Kr_2Cr_2O_7$	Dicromato de Potássio
L	Litro
LMP	Agarose de baixo ponto de fusão
M	Mol
mA	Miliampere
Meio M4	Meio de cultivo constituído de elementos-traço e vitaminas

LISTA DE ABREVIATURAS

Mg	Magnésio
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimol
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
°C	Grau Celsius
OD	Oxigênio dissolvido
PBS	Solução fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
R	Coefficiente de correlação
S	Desvio padrão
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
Tris	Trisaminometano
V	Volts
Vg	Volume gasto de EDTA
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco
µL	Microlitros

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo.
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
IAP	Instituto Ambiental do Paraná
ICSU	Committee of the International Council of Scientific Unions
ISO	International Organization for Standardization
NBR	Norma Brasileira de Regulamentarização
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
4.1 Poluição de Ecossistemas Aquáticos	16
4.2 Toxicidade	17
4.3 Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia	18
4.4 Genotoxicidade	19
4.4.1 Genotoxicidade ambiental	20
4.5 Ensaio Cometa	20
4.6 Característica do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	22
4.7 Teste de sensibilidade	23
4.8 Substâncias de referência	24
4.9 Substâncias de referência selecionadas para estudo e suas características	26
4.9.1 Dicromato de Potássio	26
4.9.2 Sulfato de Cobre	27
4.9.3 Cloreto de Potássio	28
5. METODOLOGIA	29
5.1 Organismo-teste	29
5.2 Cultivo das Daphnias	29
5.2.1 Preparo do meio de cultivo	31
5.2.2 Alimentação das Daphnias	32
5.3 Testes de sensibilidade	33
5.3.1 Teste de sensibilidade com Dicromato de Potássio	35
5.3.2 Teste de sensibilidade com Sulfato de Cobre	35
5.3.3 Teste de sensibilidade com Cloreto de Potássio	35
5.4 Ensaio cometa	35
5.4.1 Preparo da lâmina	36
5.4.2 Preparo da suspensão celular	37

5.4.2.1 Preparo da suspensão celular em PBS	37
5.4.2.2 Preparo da suspensão celular com LMP	38
5.4.3 Incubação em uma solução de lise	39
5.4.4 Etapa de desespiralização do DNA e corrida eletroforética	39
5.4.5 Coloração e análise microscópica.....	41
5.5 Análise estatística	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 Testes de Sensibilidade.....	43
6.2 Ensaio Cometa	50
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
APÊNDICES	60
ANEXOS.....	63

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos e tecnologias vem aumentando significativamente desde que o homem tornou-se parte dominante dos sistemas, resultando no lançamento de agentes químicos e físicos, contaminando a biota atmosférica, terrestre e aquática, e provocando um forte desequilíbrio ambiental (ANDRADE et al. 2004). Devido à grande variedade de novas substâncias que estão sendo introduzidas no meio ambiente, não se deve subestimar o controle de poluentes tóxicos que afetam adversamente o mesmo (ZAGATTO et al., 1992).

A biota aquática pode estar sujeita aos efeitos acumulativos de agentes químicos no meio aquático, principalmente por substâncias perigosas, por prolongados períodos de tempo. A bioacumulação é o impacto mais frequente da contaminação, resultante do processo de acúmulo da concentração do contaminante nos tecidos dos organismos vivos, caso não sejam metabolizados ou excretados por eles, este acúmulo é transmitido para o nível superior da cadeia trófica (BAPTISTA et al., 2001). Segundo Costa e Menk (2000) devido ao acúmulo lento dos contaminantes nos tecidos dos indivíduos, ao longo do tempo eles vão desenvolvendo características de toxicidade subletal até alcançar níveis danosos para o organismo.

As substâncias de referência podem ser utilizadas nos laboratórios de ecotoxicologia para garantir a qualidade analítica de estudos que realizam testes agudos de toxicidade e avaliar as alterações sazonais na sensibilidade de organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Segundo o ENVIRONMENT CANADA (1995) e a USEPA (2002), as substâncias de referência são utilizadas na forma de cartas-controle, as quais demonstram a habilidade dos técnicos em obter resultados consistentes e precisos para um determinado método analítico.

O Cloreto de Potássio (KCl) de alta pureza é muito utilizado na realização de titulações argentimétricas para a padronização de soluções de nitrato de prata e no preparo de soluções de condutividade eletrolítica (BORGES et al., 2011). Sua utilização causa discussões, pois se acredita que ocorra mais um efeito osmótico no organismo teste do que um efeito tóxico propriamente dito (KNIE; LOPES, 2004).

O Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$), também chamado Bicromato de Potássio é um composto tóxico e perigoso e possivelmente carcinogênico, assim como muitos compostos de cromo hexavalente. Porém, por ser tóxico é também utilizado em testes laboratoriais onde se faz necessário compostos letais (controle positivo) para comparação de mortalidade com outras substâncias. É muito utilizado como substância de referência nos testes padronizados de toxicidade para microcrustáceos.

O Sulfato de Cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) são cristais finos azuis penta-hidratados, também chamado de vitríolo azul, é a forma no qual o composto de cobre é mais encontrado. É uma substância de grande aplicabilidade na aquicultura para controle de parasitoses, como *Ichthyophthirius multifiliis* (BOYD; TURKER, 1998). Portanto, ele pode alterar a composição natural de sistemas aquáticos, deteriorando-os, poluindo os recursos hídricos e conseqüentemente impossibilitando o aproveitamento das águas para uso humano ou animal (FONSECA, 1991).

O grande problema da utilização de produtos químicos tóxicos está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem, nos ambientes aquáticos, espécies sensíveis e não-alvos (MANSANO et al., 2012).

A interrupção na sequência natural da evolução provocada pela poluição ambiental é capaz de ocasionar a quebra na homeostase do ecossistema. Contudo, diante de toda problemática, nos últimos anos, houve o desenvolvimento de métodos para mitigar os prejuízos sofridos pelo ambiente aquático (LEMOS; TERRA, 2003).

Diferentes testes foram desenvolvidos para se avaliar o grau de contaminação dos ecossistemas. O ensaio de ecotoxicidade com *Daphnia magna* é um dos testes mais utilizados para se estudar o potencial ecotoxicológico de amostras e efluentes. Na Europa, a aplicação de biotestes recebeu, em 1986, fortes impulsos, após incêndio numa fábrica de produtos químicos da Sandoz em Basileia, Suíça. Juntamente com a água de extinção, chegaram biocidas no rio Reno, os quais foram detectados na Alemanha através dos testes com *Daphnia*, numa distância de mais de 1.000 Km do local do incêndio (KNIE; LOPES, 2004).

No Brasil, nos últimos anos, os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para avaliar e monitorar a qualidade de águas têm se tornando bastante comuns. Em 1975, tomou-se a primeira iniciativa em termos metodológicos, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes,

desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), a qual participou também a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), convidada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2006).

De acordo com Knie e Lopes (2004), é viável a utilização da *Daphnia magna* como um organismo teste, pelo fato de seus descendentes serem geneticamente idênticos, característica esta que confere uma uniformidade de respostas nos ensaios, além da fácil reprodução destas em laboratórios, sob condições controladas. Em comparação com outros microcrustáceos, seu tamanho é relativamente grande, o que fornece maior facilidade ao manuseá-las. O microcrustáceo *Daphnia magna* apresenta ciclos de reprodução e de vida curtos e apresentam grande sensibilidade a vários agentes tóxicos (KNIE; LOPES, 2004). A *Daphnia magna*, muito comum no meio aquático, é utilizada na criação de alevinos de peixes (PAUW, LAUREYS; MORALES, 1981).

Alterações no DNA de organismos podem ocasionar graves consequências para o ecossistema, pois em níveis individuais tais efeitos lesam células e órgãos de seres vivos, podendo afetar inclusive sua função reprodutiva (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

Nos anos 50 e 60 a ecologia e a genética se uniram e desenvolveram testes rápidos e muito eficientes, que hoje são difundidos na comunidade científica (STECKERT, 2007). Um exemplo de teste rápido e eficiente é o Ensaio Cometa, que visa detectar danos no DNA de células individuais expostas a agentes genotóxicos. Além disso, o Ensaio Cometa é simples, sensível e de baixo custo (KAPCZINSKI et al., 2004). Os sítios mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão (KAPCZINSKI et al., 2004). No Brasil, os testes de genotoxicidade têm sido empregados desde a década de 80 para avaliações ambientais (VALENT, 1998).

Este trabalho teve como objetivo principal, introduzir o teste de genotoxicidade para complementar a avaliação de sensibilidade com substâncias de referência (Dicromato de Potássio, Sulfato de Cobre e Cloreto de Potássio), ocorrendo assim, uma maior exatidão ao estimar os danos que uma substância específica possa causar ao organismo teste, caso não ocorra sua morte.

2. JUSTIFICATIVA

As avaliações de ecotoxicidade são de suma importância para avaliação e saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. No entanto, para que sejam obtidos resultados confiáveis nos testes de ecotoxicidade, é necessário avaliar a sensibilidade dos organismos-teste.

Uma vez que diversas substâncias de referência distintas possam ser utilizadas para avaliação de sensibilidade, ainda é muito utilizado o dicromato de potássio, substância que tem possíveis efeitos carcinogênicos, durante exposição crônica, para quem o manuseia. Sendo assim, se faz necessário investigar os possíveis danos genotóxicos de substâncias referência utilizadas em ensaios de sensibilidade, procurando saber qual a substância com a menor capacidade de causar danos ao DNA da *Daphnia magna*, organismo-teste muito utilizado em ensaios de toxicidade. Além disso, investigar qual substância causa menos risco a quem manuseia, qual delas é menos danosa ao ser descartada no meio ambiente e que satisfaça os critérios para poder ser utilizada na padronização da sensibilidade.

Para a realização desse trabalho foram estudadas três substâncias referência, sendo elas o dicromato de potássio, cloreto de potássio e o sulfato de cobre, a fim de saber qual delas atende melhor os critérios apontados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis efeitos toxicológicos ocasionados por substâncias de referência (Dicromato de Potássio, Sulfato de Cobre e Cloreto de Potássio), utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* como organismo-teste, através do ensaio tradicional de sensibilidade (avaliação toxicológica).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade, através do teste de sensibilidade, do microcrustáceo *Daphnia magna* ao Dicromato de Potássio;
- Avaliar a toxicidade, através do teste de sensibilidade, do microcrustáceo *Daphnia magna* ao Cloreto de Potássio;
- Avaliar a toxicidade, através do teste de sensibilidade, do microcrustáceo *Daphnia magna* ao Sulfato de Cobre;
- Avaliar os efeitos genotóxicos, através do ensaio cometa, das três diferentes substâncias de referência ao material genético de *Daphnia magna* a partir da concentração efetiva mediana (CE50) encontrada através dos testes de sensibilidade;

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Poluição de Ecossistemas Aquáticos

A água é um elemento vital para a sobrevivência, para as atividades humanas e para a manutenção da vida na Terra, no entanto a qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido alterada cada vez mais nas últimas décadas pela forte degradação ambiental. Esta significativa degradação é uma consequência da explosão populacional e os usos múltiplos da água pelo homem, onde os ecossistemas aquáticos acabam sendo agredidos intensivamente quando dejetos são lançados diretamente em cursos d'água sem nenhum tipo de tratamento, diminuindo, portanto a disponibilidade de água de qualidade (MULLER, 2007). De acordo com BRAGA et al. (2005), poluição de água pode ser entendida como a alteração de suas características físicas, química e biológica por quaisquer ações ou interferências, sejam elas provocadas ou não pelo homem.

Não podemos julgar a qualidade da água pela sua aparência, pois alteração na qualidade da água não se manifesta apenas em características estéticas e sim por conter ou não microrganismos patogênicos, substâncias tóxicas e parâmetros físico-químicos, como pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). A qualidade da água pode ser afetada pelas mais diversas atividades do homem, sejam elas domésticas, comerciais ou industriais, gerando poluentes característicos que alteram de alguma forma a qualidade do corpo receptor. As fontes poluentes podem ser pontuais, nas quais os poluentes são despejados de forma concentrada, introduzidos por lançamentos facilmente identificáveis e individualizados, como o despejo de esgotos de uma comunidade. As suas fontes, também podem ser difusas, onde os poluentes adentram o corpo d'água diluindo-se ao longo de seu curso, não sendo fácil a sua identificação, como no caso das substâncias provenientes de áreas agrícolas, ou dos poluentes associados à drenagem pluvial urbana (COLLISHONN; TASS, 2010).

No entanto, muitas pessoas ignoram a capacidade limitada de diluição dos corpos d'água, e concentrações elevadas de substâncias acabam sendo despejadas

incorretamente nesses corpos, tornando-os saturados e ocasionando a poluição com o consequente desequilíbrio no ecossistema aquático (GENDA, 1982; COSTA, 2004). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357/05) dividiu os sistemas hídricos em 13 classes de acordo com o tipo e usos de suas águas, impondo limites de concentrações de cada poluente ao ser despejado num corpo de água. A partir do momento em que os padrões estabelecidos pelo CONAMA 357/05 são ultrapassados, está caracterizada a poluição. A falta de fiscalização e planejamento torna a água uma fonte de problemas ambientais e saúde pública, pois a contaminação pela disposição de rejeitos nos rios, lagos e oceanos, pode desencadear uma série de doenças para a população humana e também podendo ocasionar a destruição total da ictiofauna, eliminando uma importante fonte de alimentos (SILVA, 2008).

4.2 Toxicidade

Segundo Knie e Lopes (2004), são inúmeras as substâncias químicas que apresentam potencial de efeito tóxico, cuja ação varia em função da concentração. Em termos biológicos, o sistema imunológico dos seres vivos desencadeia uma série de etapas para elevar sua capacidade de proteção, que consiste, principalmente, na metabolização e excreção dos agentes agressores. O resultado mensurável da interação entre as duas forças é o efeito analisado pelos biotestes. Sendo assim, a toxicidade é definida como a habilidade de uma substância, sob certas condições, de exercer algum efeito danoso sobre organismos ou biocenoses, devido às suas propriedades químicas e à sua concentração.

Os bioensaios podem ser classificados em agudos e crônicos. A toxicidade aguda é o efeito deletério (letalidade ou alguma outra manifestação que a anteceda) causado por amostra simples ou composta, a organismos-testes em um curto período de exposição, em relação ao seu ciclo de vida. Já a toxicidade crônica é o efeito deletério causado por amostra simples ou composta, sendo que o teste crônico, normalmente apresenta a duração de uma semana ou mais de exposição dos organismos, em relação ao seu ciclo de vida (CONSEMA, 2006).

Segundo RAND (1995) os métodos de testes de toxicidade aquática podem ser categorizados de acordo com o tempo de exposição, situação de teste, efeitos a serem avaliados e organismos a serem testados.

4.3 Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia

A toxicologia ambiental é o termo usado para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos ocasionados por substâncias químicas presentes no ambiente (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Dentro do contexto da toxicologia ambiental encontra-se a ecotoxicologia, um termo que foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut, que define a ecotoxicologia como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Segundo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) a ecotoxicologia pode ser definida também como, a ciência que estuda os impactos deletérios de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes com o meio ambiente como, mobilidade, degradabilidade, bioacumulação e biomagnificação. Assim, esta ciência nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Consideram-se objetivos da ecotoxicologia a avaliação da toxicidade de poluentes em laboratório e no meio ambiente; compreender os mecanismos de ação de substâncias tóxicas e avaliar o risco que substâncias ou compostos químicos tóxicos apresentam para o meio ambiente (BRENTANO, 2006).

Partindo-se do pressuposto de que se um agente é tóxico para uma ou mais espécies em um sistema de teste, é provável que seja para importantes componentes do ecossistema e, portanto, possa causar impacto ambiental negativo

(MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Dependendo da composição e da estrutura química das substâncias, existem vários mecanismos de ação que se tornam prejudiciais dentro dos organismos em diferentes lugares, influenciando-os das mais variadas formas como no DNA (por exemplo: genotoxicidade, mutagenicidade, fertilidade); no transporte de elétrons (por exemplo: fotossíntese); nos compartimentos celulares (por exemplo: respiração celular); nas formações celulares (por exemplo: tumores celulares, hematomas) (KAPCZINSKI et al., 2004).

Os testes ecotoxicológicos empregando bioensaios realizados para o monitoramento e avaliação da qualidade da água, têm se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil. A primeira iniciativa se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A aplicação de testes ecotoxicológicos é uma ferramenta capaz de auxiliar o monitoramento de lançamento de efluentes nos corpos receptores de modo que não haja alteração na biota aquática decorrente da toxicidade de determinados compostos (BRESOLA, 2007).

Os bioensaios têm como vantagem abranger uma grande variedade de substâncias biologicamente disponíveis em uma amostra ambiental através de um único ensaio, e detectam a capacidade inerente de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Em geral, o princípio do método de avaliação de toxicidade ambiental consiste na exposição de organismos-teste a várias diluições da amostra a ser testada, por um período determinado de tempo (ABNT, 2004).

4.4 Genotoxicidade

Genotoxicidade pode ser definida como a capacidade de uma amostra em alterar a estrutura da molécula de DNA (CONSEMA, 2006), sendo os agentes genotóxicos definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a

replicação do DNA e a transmissão genética. Com isso, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos ou físicos (TICE et al., 2000). O princípio dos testes de toxicologia genética é investigar o potencial de agentes químicos que induzem mutações nas células somáticas, ou que possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA, 2003). A genotoxicidade pode ser avaliada pelo teste de Ames, teste de micronúcleos e o Ensaio do Cometa, entre outros (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003).

4.4.1 Genotoxicidade ambiental

Todos os organismos vivos interagem constantemente com o meio ambiente, sendo que seu genoma fica exposto às interferências que este meio sofre. Essa exposição a agentes ambientais pode induzir a modificações e lesões no DNA, prejudiciais a todas as células, podendo interferir em diversos processos vitais (SILVA, 2007).

Segundo IANISTCKI et al. (2006), devido às implicações ecológicas associadas com a genotoxicidade, a detecção e a quantificação dos danos genéticos são de interesse em estudos ambientais. Os testes de genotoxicidade são utilizados na toxicologia ambiental para o conhecimento e prevenção de patologias e aberrações cromossômicas decorrentes da exposição aos contaminantes, sendo que, uma das suas formas de estudo é o acompanhamento por meio do Ensaio Cometa, um teste realizado em células individuais não proliferativas que detecta danos no DNA.

4.5 Ensaio Cometa

O Ensaio do Cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) é um método de eletroforese em microgel, baseia-se na lise de membranas celulares, seguida

pela indução da migração eletroforética (microeletroforese) do DNA liberado em matriz de agarose (BRIANEZI et al. 2009). O método é utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia (SINGH et al., 1988). A célula migrada, quando vista no microscópio, adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, a região nuclear, e cauda, a qual contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo (BRIANEZI et al., 2009).

É um teste de genotoxicidade que se desenvolveu rapidamente, nos últimos anos, representando um papel importante em muitas áreas (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003). Rydeberg e Johanson (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente o dano no DNA de células individuais analisadas, e SINGH et al. (1988) modificaram a técnica, utilizando uma eletroforese alcalina, com pH superior a 13, capaz de detectar quebras das fitas simples do DNA e em sítios sensíveis ao pH básico (sítios álcali-lábeis). Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos induzem mais quebras em fitas simples do que em fitas duplas do DNA, a versão alcalina da técnica apresenta maior sensibilidade para a detecção da indução de danos ao DNA (TICE et al., 2000). Segundo ROJAS et al. (1999), isso se da pelo fato de que, durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula do DNA.

O Ensaio Cometa foi descrito por SINGH et al. (1988), em que células englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que força a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do nucleóide. Após a eletroforese, as células que apresentam um nucleóide redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. No entanto, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (MOREIRA, 2010).

O Ensaio Cometa é amplamente utilizado para testar agentes genotóxicos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparo no DNA, biomonitoramento de populações expostas e, ainda em aplicações clínicas. Segundo GONÇALVES et al. (2003), as vantagens deste ensaio incluem a sua simplicidade, rápido desempenho e sua alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA.

Assim, o ensaio cometa se caracteriza por ser uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas, apresentando amplas aplicações em toxicologia genética,

em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, no biomonitoramento ambiental e no monitoramento populacional humano (ROCHA et al., 2009).

Uma desvantagem deste teste é a diversidade de métodos para quantificação do dano, podendo ser utilizado o tamanho ou da cauda comparada ao núcleo, à porcentagem e intensidade de fragmentação da cauda, ou até mesmo ambas as medições (MOREIRA, 2010).

4.6 Característica do microcrustáceo *Daphnia magna*

Segundo ELMOOR (1997) as Daphnias pertencem à **Ordem** Anomopoda (Sars, 1865); à **Família** Daphniidae (Straus, 1820); e ao **Gênero** *Daphnia* (MULLER, 1785).

A *Daphnia magna* (Straus, 1820) é um microcrustáceo planctônico de água doce, é um organismo considerado grande, se comparado a outros microcrustáceos, medindo de 5 a 6 mm de comprimento, encontrado em lagos, represas, rios e planícies inundadas (Figura 1). Sua população é composta basicamente de fêmeas, uma vez que sua reprodução é assexuada por partenogênese, em condições ambientais favoráveis, originando somente fêmeas (KNIE; LOPES, 2004).

Este organismo é indicado pela ABNT (1993) para análise da toxicidade aguda de efluentes líquidos, apresentando um papel importante na comunidade zooplanctônica, pois compõem um elo entre os níveis trófico inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

O cultivo das Daphnias pode ser feito em laboratório, demoram cerca de 15 dias para atingir a idade de reprodução e possuem ciclo de vida de aproximadamente 45 dias. A alimentação, temperatura e fotoperíodo são padronizados e devem ser monitorados. O meio de cultivo é composto por sais e nutrientes os quais estão em quantidades adequadas para atender às necessidades vitais das Daphnias. São alimentadas geralmente com a alga verde fresca *Desmodesmus subspicatus*, cultivada em laboratório, a qual também pode ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos. A temperatura ideal, obtida em incubadora adaptada com fonte de luz (BOD), é de 20°C e 16h de luz diária (KNIE; LOPES, 2004). São realizadas trocas diárias da água de cultivo (sendo divididas em trocas

parciais e totais) e limpeza da sujidade, separando-se os filhotes que serão utilizados, posteriormente, nos testes ecotoxicológicos, das matrizes (ou indivíduos adultos) por meio de peneiras com malha de diâmetros apropriados.

A *Daphnia magna* é utilizada internacionalmente pelos órgãos e institutos ambientais de diversos países pelo fato da padronização de seus bioensaios. Além disto, é amplamente indicada por apresentar características significativas como abundância em meio aquático e sensibilidade a substâncias tóxicas. Seu manejo e cultivo, frente às condições favoráveis em laboratório, são fáceis uma vez que apresenta um ciclo de vida curto e um padrão reprodutivo assexuado. Portanto, seu genótipo padrão garante uma uniformidade no resultado do ensaio (KNIE; LOPES, 2004).



Figura 1: *Daphnia magna*
Fonte: Daniel Garcia, 2011.

4.7 Teste de sensibilidade

O microcrustáceo *Daphnia magna* é um dos organismos zooplanctônicos mais utilizados em testes toxicológicos em vários países atualmente e reage sensivelmente a uma variedade de agentes tóxicos (ALVES; SILVANO, 2006).

Para que sejam obtidos resultados confiáveis nos testes de toxicidade é necessário avaliar a sensibilidade dos organismos-teste. As condições de vida desses organismos são avaliadas de acordo com normas indicativas da faixa de sensibilidade das Daphnias a uma substância de referência (ALVES; SILVANO, 2006).

Após a realização da leitura direta do teste e obtenção dos resultados pode-se calcular a CE50 (concentração derivada estatisticamente que causa efeito, em porcentagem de imobilidade, em 50% dos organismos). A partir da obtenção de aproximadamente 10 resultados, pode-se começar a elaboração da carta controle dos lotes de *Daphnia magna*.

A carta controle é uma forma de se estabelecer uma faixa de aceitação de resultados da sensibilidade de organismos para uso em testes. Com os resultados de CE50 elabora-se um gráfico-controle através do cálculo da média e os valores correspondentes a dois desvios-padrão superior e inferior a média. Com isso, se estabelece um limite de aceitabilidade de dados de $\pm 2S$ da média (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Com a carta controle, é possível obter-se maior precisão nos resultados, pois se espera que a sensibilidade dos organismos esteja sempre dentro dos desvios em relação à média de CE50 calculada, garantindo a qualidade e sensibilidade dos organismos utilizados nos testes de toxicidade (ALVES; SILVANO, 2006).

4.8 Substâncias de referência

As substâncias de referência podem ser utilizadas nos laboratórios de ecotoxicologia para garantir a qualidade analítica de estudos que realizam testes agudos de toxicidade e avaliar as alterações sazonais na sensibilidade de organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Segundo o ENVIRONMENT CANADA (1995) e a USEPA (2002), as substâncias de referência são utilizadas na forma de cartas-controle, as quais demonstram a habilidade dos técnicos em obter resultados consistentes e precisos para um determinado método analítico. Várias substâncias referências são indicadas para serem utilizadas na realização de testes de sensibilidade, entre elas estão o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), dodecil sulfato de sódio ($C_{12}H_{25}NaSO_4$), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de cádmio ($CdCl_2$) (EPA, 1989; LEWIS et al., 1995).

A repetição desses ensaios de sensibilidade pelo operador faz parte de um programa de garantia da qualidade, aumentando-se assim, a confiabilidade dos dados gerados em um laboratório (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Usualmente, nas cartas-controle, os limites de aceitação de resultados estão compreendidos entre ± 2 desvios-padrão da média de resultados pretéritos, sendo esses valores um dos indicadores da qualidade do ensaio ecotoxicológico (ENVIRONMENT CANADA, 1995).

Todas as substâncias químicas apresentam um potencial tóxico de ação, o qual depende da concentração. Dessa forma os seres vivos desencadeiam sua capacidade de proteção, que consiste principalmente na metabolização e excreção dos agentes agressores (KNIE; LOPES, 2004).

Alguns critérios devem ser levados em conta para seleção de uma substância de referência, tais como: disponibilidade técnica para mensurá-la; solubilidade; estabilidade em solução (não deve ser volátil ou biodegradável), não deve oferecer riscos à segurança dos técnicos durante a sua manipulação em laboratório. Além dos critérios citados, a característica tóxica de uma substância de referência não deve ser afetada por variações normais da qualidade da água, tais como, pH, dureza, substâncias orgânicas e outros (ENVIRONMENT CANADA, 1995).

Segundo ZAGATTO e BERTOLETTI (2006), sabe-se que apenas uma substância não atenderá a todos os critérios exigidos, assim, a escolha desta pode ser feita em função do objetivo do estudo. Um exemplo é a utilização do cromo como substância de referência na análise de toxicidade de efluentes líquidos industriais, pois este é um contaminante ambiental encontrado em águas e efluentes.

Recomenda-se que as substâncias de referência utilizadas sejam um produto de marca reconhecida, com alto grau de pureza, certificado de garantia de qualidade e toxicidade conhecida. O armazenamento deve ser feito em local seco, ventilado e distante de materiais reativos e inflamáveis. Durante a manipulação para o preparo das soluções-teste, devem-se ser respeitados os princípios de uma boa prática laboratorial, como uso de equipamentos de proteção individual e respeito às normas de segurança de cada laboratório (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

4.9 Substâncias de referência selecionadas para estudo e suas características

4.9.1 Dicromato de Potássio

O Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$), também chamado Bicromato de Potássio, é um sólido cristalino laranja-avermelhado solúvel em água e insolúvel em álcool. Pode ser obtido puro, é estável até seu ponto de fusão (398 °C) e, portanto, é um excelente padrão primário. É um composto tóxico e perigoso e possivelmente carcinogênico, tal quais muitos compostos de cromo hexavalente. No entanto, por ser tóxico é também utilizado em testes laboratoriais onde se faz necessário compostos letais (controle positivo) para comparação de mortalidade com outras substâncias (SANTOS; COSTA, 2010).

É um agente com propriedades oxidantes fortes, o qual deve ser mantido afastado de materiais combustíveis, pois favorece a combustão com outros produtos, mesmo sendo comburente (SANTOS; COSTA, 2010).

Industrialmente sua aplicação é ampla, é usado como um agente de oxidação na indústria química e na produção de produtos corantes, em eletro galvanização, pirotécnica, manufatura de vidro, colas, curtume, fotografia, litografia, e em produtos de cerâmica. Além disso, é usado como despolarizante para células dessecadas. Pode ser aplicado no tratamento de madeiras, para proteger contra a ação de fungos e insetos que possam provocar o seu apodrecimento e depreciação (SANTOS; COSTA, 2010).

O Dicromato de Potássio é a substância de referência mais utilizada nos testes padronizados de toxicidade para microcrustáceos (KNIE; LOPES, 2004), em que a sensibilidade da *D. magna* varia com a dureza da água de cultivo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A faixa aceitável da CE50-24 h do Dicromato de Potássio para *Daphnia magna* é de 0,6 mg/L a 1,7 mg/L na água do meio de cultivo com pH 7,6, CAE (concentração ambiental estimada da exposição de organismos não alvos aos agrotóxicos resultante da aplicação direta no ambiente), os quais são classificados

alto risco, moderado risco e baixo risco de intoxicação da espécie, de acordo a SETAC (1994).

4.9.2 Sulfato de Cobre

O sulfato de Cobre são cristais finos azuis pentahidratados ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), também chamado de vítrolo azul, é a forma no qual o composto de cobre é mais encontrado. É um agrotóxico bastante usado na aquicultura para o controle de agentes com potencial patogênico e doenças em peixes. Porém estudos devem ser feitos para analisar sua ação sobre o ambiente e o tempo residual em peixe cultivado (MARTINS, 1998).

Também apresenta excelente eficiência no controle de algas e macrófitas aquáticas ao inibir a respiração e a fotossíntese das algas BOYD & TURKER (1998), agindo como algicida, bactericida e herbicida. Portanto, ele pode alterar a composição natural de sistemas aquáticos, deteriorando-os, poluindo os recursos hídricos e conseqüentemente impossibilitando o aproveitamento das águas para uso humano ou de animal (FONSECA, 1991).

O sulfato de cobre torna-se bastante tóxico aos peixes, devido à formação de íons cúprico Cu^{+2} , durante a sua dissolução na água, principalmente em águas com baixa alcalinidade total. Quando não matam, doses excessivas de sulfato de cobre, podem causar injúrias e excessiva produção de muco nas brânquias, redução da eficiência do sistema imune dos peixes e distúrbios nervosos (KUBITZA, 1998).

É ainda utilizado nas misturas para conservação de madeiras de construção, em tinturarias e como produto intermédio em várias indústrias (AGUIAR, 2012). Utiliza-se também na agricultura como fungicida; aditivo em alimentos e fertilizantes; como mordente em banhos fotográficos; como eletrólito nas pilhas; na preservação da madeira; na composição de pigmentos em tintas e em composições pirotécnicas (INFOPÉDIA, 2012).

A Resolução CONAMA nº 020, artigo 21, de 18 de julho de 1986 estabelece que o valor máximo admissível é de 1,0 mg de sulfato de cobre/L de água (IBAMA, 1987). Os riscos de intoxicação ambiental, devido à contaminação com os agrotóxicos, podem ser classificados em função da comparação da CE50 com a

CAE (concentração ambiental estimada da exposição de organismos não alvos aos agrotóxicos resultante da aplicação direta no ambiente), os quais são classificados alto risco, moderado risco e baixo risco de intoxicação da espécie, de acordo a SETAC (1994).

4.9.3 Cloreto de Potássio

O KCl de alta pureza é muito utilizado na realização de titulações argentimétricas para a padronização de soluções de nitrato de prata e no preparo de soluções de condutividade eletrolítica (BORGES et al., 2011). Como é facilmente solúvel em água e o íon potássio tem importância para as células, o cloreto de potássio é frequentemente utilizado em ensaios ecotoxicológicos de sensibilidade, porém, sua utilização causa discussões, pois se acredita que ocorra mais um efeito osmótico no organismo teste do que um efeito tóxico propriamente dito (KNIE & LOPES, 2004).

O íon potássio (K^+) é o cátion predominante no interior das células vivas, sendo baixa sua presença extracelular. As concentrações intra e extracelulares formam um gradiente de concentração para que o impulso nervoso seja conduzido. O potássio também é importante para o balanço ácido-base e para processos metabólicos nas células (SLOW-K, 2012). Devido a essa importância para as células, o sal inorgânico cloreto de potássio (KCl) é muito utilizado na medicina (NASCIMENTO et al., 2007) .

5. METODOLOGIA

5.1 Organismo-teste

Os exemplares de *Daphnia magna* foram obtidos de culturas mantidas no Instituto Ambiental do Paraná (IAP), reproduzidos e mantidos em condições de laboratório.

5.2 Cultivo das Daphnias

O cultivo dos organismos foi realizado no Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sede Ecoville. As Daphnias foram cultivadas em seis béqueres de volume de 2000 ml contendo aproximadamente 1800 mL de água de cultivo, sendo cultivados até 50 organismos por recipiente (Figura 2). Cada béquer recebeu uma numeração para controle, lotes (Figura 3). Os microcrustáceos cultivados foram mantidos em estufa incubadora a temperatura controlada de 20°C e fotoperíodo de 16 horas/dia controlado por termômetro.

As trocas de água foram realizadas pelo menos cinco vezes na semana, no qual os recipientes de cultivos eram limpos com álcool 70%, em cada troca de água. Os organismos mais velhos foram descartados conforme seu tempo de vida, e a maioria dos neonatos foram descartados nas trocas de água, quando não eram realizados bioensaios.

Para a realização dos bioensaios, a separação dos organismos jovens e adultos, durante as trocas de água, foram realizadas com o auxílio de duas redes, uma de aço-inox com malha de 1 mm, na qual os indivíduos adultos (ou matrizes) ficavam retidos e outra com malha menor de 0,2 mm onde os mais jovens ficavam retidos. Após a troca, os lotes contendo as matrizes retornaram ao cultivo climatizado, enquanto que os indivíduos jovens, com 2 à 24h de vida, foram utilizados para o teste.

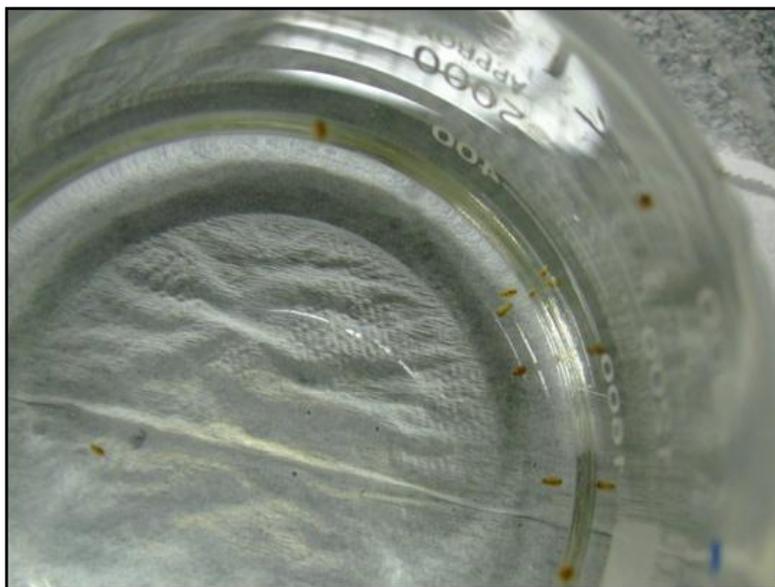


Figura 2: Organismo teste em Meio M4.
Fonte: Autoria própria.



Figura 3: Lotes de cultivo dos organismos teste.
Fonte: Autoria própria.

5.2.1 Preparo do meio de cultivo

O preparo do meio de cultivo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004) presentes na NBR 12713 e, obedecendo aos parâmetros de pH, dureza, condutividade e oxigenação. O princípio do método é a reconstituição de água destilada ou deionizada, com macro, micro elementos minerais e vitaminas, a partir de soluções estoque contendo estas substâncias (KNIE; LOPES, 2004).

Segundo ELENDDT; BIAS, (1990) “Uma água de cultivo comprovadamente adequada, que garante boas condições de vida para as Daphnias, é composta por um Meio Básico (Meio de Diluição), que contém os sais essenciais característicos da água natural (Ca, Mg, K, Na) mais o Meio M4, constituído de elementos-traço e vitaminas”.

As soluções que compõem o Meio Básico e o M4, bem como o modo de prepará-las, estão apresentados no Anexo 1. Todas as soluções preparadas têm validade de seis meses e foram armazenadas em geladeira, a 5°C, com exceção da solução 10, a qual deve ser mantida congelada (KNIE; LOPES, 2004).

Para o preparo de 100 litros do meio básico/M4 os volumes estão citados no Anexo 2, para Dureza total entre 175 mg/L e 225 mg/L. Em um barrilete com 50 litros de água destilada, foram adicionadas as soluções (1 a 10) uma a uma, com prazo de validade de seis meses. O meio preparado era aerado com auxílio de uma bomba de aquário e, em seguida eram medidos os parâmetros necessários para aprovação do meio, os quais estão listados no Anexo 3.

Para a determinação da dureza total foi medido 100 mL da amostra com pipeta volumétrica e esta foi transferida para um Erlenmeyer de 250-300 mL. Depois foi adicionado com pipeta graduada 2 mL de solução tampão para dureza, o qual elevou o pH da amostra entre 8 e 10 e, uma pastilha indicadora, que foi agitada até a sua diluição total. A amostra foi titulada com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,01 M com fator de correção volumétrico conhecido, gota a gota, até mudar a cor de vermelho vinho para verde esmeralda. Os resultados foram obtidos através de uma expressão com dois algarismos significativos:

$$\text{mg/L CaCO}_3 = Vg \times 10 \times Fcv$$

Vg= Volume gasto de EDTA

Fcv= Fator de correção volumétrico

Para determinar o pH foi utilizado o medidor de pH DIGIMED modelo DMPH-2. A concentração e porcentagem de saturação de oxigênio dissolvido (OD) foram determinadas através do oxímetro WTW- 315i.

5.2.2 Alimentação das Daphnias

A alimentação das Daphnias foi realizada com uma suspensão de células de alga da espécie *Desmodesmus subspicatus* (Figuras 4 e 5), na concentração de 5×10^6 células de alga por *Daphnia*, cultivadas no próprio laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR 12648 (2011). Eram fornecidos 0,25ml por organismo contido em cada recipiente, sendo fornecida uma vez por dia, segundo recomendações da CETESB (1991).



Figura 4: Cultivo de *Desmodesmus subspicatus*.
Fonte: Autoria própria.



Figura 5: Suspensão de células de alga *Desmodesmus subpicatus*.
Fonte: A autoria própria.

5.3 Testes de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT - 2004) presentes na NBR 12713.

Os testes consistiram na exposição das Daphnias (neonatos de no máximo 24 horas) à três substâncias de referência, em quintuplicata, por um determinado período de tempo, dependendo da substância. Para isso, foram utilizados copinhos descartáveis de plástico de 50 mL, os quais foram adicionados 20mL de solução e posteriormente foram introduzidos 10 filhotes em cada copinho com o auxílio de pipetas Pasteur (Figura 6). Os copinhos por sua vez eram acondicionados em um recipiente, o qual era coberto com papel alumínio (Figura 7) e levado á incubadora. Após decorrido o tempo de exposição em incubadora sem fotoperíodo e temperatura controlada, foram contabilizados o número de organismos que não apresentaram mobilidade. Em seguida, foi calculada a CE50 que se baseia nas condições em que não ocorra mortalidade das Daphnias quando estas são expostas a uma determinada substância em um determinado tempo e concentração (ALVES; SILVANO, 2006). O cálculo foi realizado através do modelo de regressão linear com o auxílio do programa Excel, *Microsoft*.

Para cada tipo de substância referência foram preparadas antecipadamente soluções estoque, com uma concentração conhecida, e acondicionadas sob refrigeração.



Figura 6: Teste de sensibilidade.
Fonte: Autoria própria.



Figura 7: Teste de sensibilidade.
Fonte: Autoria própria.

5.3.1 Teste de sensibilidade com Dicromato de Potássio

Para o teste com o dicromato de potássio - $K_2Cr_2O_7$, os filhotes ficaram expostos a substância por 24h. Para o experimento foram preparadas soluções teste nas concentrações: 0,58 mg/L, 0,62 mg/L; 0,76 mg/L; 0,85 mg/L; 0,95 mg/L; 1,05 mg/L; 1,17 mg/L e 1,3 mg/L, a partir de uma solução estoque de 100mg/L.

5.3.2 Teste de sensibilidade com Sulfato de Cobre

Para o teste com o Sulfato de Cobre - $CuSO_4.5H_2O$, os filhotes ficaram expostos a substância por 24h.

Para o experimento foram preparadas soluções teste nas concentrações: 0,01 mg/L; 0,13 mg/L; 0,23 mg/L; 0,33 mg/L e 0,48 mg/L, a partir de uma solução estoque de 1000mg/L, seguindo a metodologia de ARAUCO et al. (2005).

5.3.3 Teste de sensibilidade com Cloreto de Potássio

Para o teste com o Cloreto de Potássio - KCl, os filhotes ficaram expostos a substância por 48h.

Para o experimento foram preparadas soluções teste nas concentrações: 370 mg/L; 480 mg/L; 620 mg/L; 800 mg/L e 1000 mg/L, a partir de uma solução estoque de 5 g/L. Seguindo as diretrizes da Norma 12.713 (2004) da ABNT.

5.4 Ensaio cometa

Após a leitura do teste de ecotoxicidade com *D. magna*, foram utilizadas as Daphnias que não apresentaram imobilidade, para a realização do ensaio cometa e

consequente avaliação de danos ao DNA destas. Foram feitas réplicas, quintuplicatas, do teste de sensibilidade, visando aumentar o número de microcrustáceos, tendo em vista que para cada lâmina do ensaio cometa, foram necessários 20 exemplares de *D. magna*, conforme a metodologia descrita em PARK e CHOI (2007).

O ensaio cometa consistiu basicamente das seguintes etapas: preparo da lâmina, preparo da suspensão celular, incubação em uma solução de lise, etapa de desespiralização do DNA, corrida eletroforética, coloração com brometo de etídio e visualização dos danos.

A técnica utilizada para o teste foi a descrita por SINGH et al. (1988), com algumas alterações para análise de danos ao DNA de *Daphnia magna* (PARK; CHOI, 2007).

5.4.1 Preparo da lâmina

Primeiramente foi feita a limpeza das lâminas com papel toalha umedecido com álcool e em seguida, a lâmina foi seca com papel toalha.

Após, a lâmina foi mergulhada em agarose normal 1,5%, aquecida e liquefeita (Figura 8) e em seguida a mesma foi retirada e limpa, com papel toalha, o lado oposto da parte esmerilhada para retirar o excesso. As lâminas foram deixadas secar em temperatura ambiente, sob um plano reto e guardadas posteriormente (Figura 9).



Figura 8: Preparo da lâmina para a realização do ensaio cometa.
Fonte: A autoria própria.



**Figura 9: Lâmina recoberta com agarose normal 1,5%.
Fonte: Autoria própria.**

5.4.2 Preparo da suspensão celular

5.4.2.1 Preparo da suspensão celular em solução fosfato salino (PBS)

A suspensão celular foi obtida após a homogeneização de 20 indivíduos de *D. magna* sobreviventes do ensaio de ecotoxicidade com 100 μ L de PBS. Para a padronização da concentração de suspensão celular utilizada foram realizados vários testes, os quais se utilizaram 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μ L de suspensão, porém a que apresentou melhor resultado foi com a concentração de 100 μ L.

A homogeneização foi feita em um homogeneizador tipo Potter (Figura 10).



Figura 10: Homogenizador tipo Potter.
Fonte: Autoria própria.

5.4.2.2 Preparo da suspensão celular com agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

Em eppendorfs limpos, foram adicionados 70 μL de LMP 0,05% e 100 μL de suspensão de Daphnias em PBS, preparada anteriormente, formando uma solução. Para a análise, foram montadas lâminas de microscopia, previamente coberta com agarose (1,5%), identificadas (na parte áspera) e colocadas sob um plano reto. A solução liquefeita foi então adicionada sobre a lâmina, com o auxílio de uma micropipeta e posteriormente recobertas com uma lamínula, para que a solução pudesse ser espalhada sobre a superfície da mesma. Após isso, foram acondicionadas na geladeira por 20 minutos.

Foi evitado a exposição de luz direta sobre as lâminas após colocada a suspensão celular, para que o resultado não fosse interferido por esse fator.

Após o resfriamento, as lamínulas foram retiradas gentilmente para não danificar a lâmina.

5.4.3 Incubação em uma solução de lise

Após a montagem, as lâminas sem as lamínulas, foram mantidas em uma solução de lise em uma cubeta (2.5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris), preparada antecipadamente, por no mínimo 1 hora na geladeira (4°C) , para remoção dos conteúdos celulares e exposição do material genético. Podendo as lâminas permanecer na geladeira por até quatro semanas.

5.4.4 Etapa de desespiralização do DNA e corrida eletroforética

Após a etapa de lise, as lâminas foram retiradas da cubeta e colocadas na cuba horizontal, com o auxílio de uma pinça, preenchendo o máximo possível da cuba de eletroforese com lâminas com material depositado, porém, os espaços que sobraram eram sempre preenchidos com lâminas limpas. As lâminas foram imersas em uma solução tampão de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 200 mM) (pH maior que 13), que foi adicionada cuidadosamente na cuba, até que se forme uma fina camada de solução sobre as mesmas. As lâminas ficaram em repouso sob essa solução por 30 minutos e, em seguida, foi realizada a corrida eletroforética por 25 minutos, a 25 V e 300 mA (Figura 11 e 12), para migração do DNA (SINGH et al., 1988). Todo esse procedimento foi realizado na ausência de luz.

Após a corrida eletroforética, observa-se a formação de uma espuma, devido a corrente elétrica utilizada no processo (Figura 13). Os próximos passos puderam ser feitos na presença de luz, então as lâminas foram retiradas cuidadosamente e colocadas em uma superfície seca. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas com três banhos de solução de Tris (pH 7,5), com intervalos de 5 minutos e fixadas em etanol por 5 minutos e guardadas para posterior análise.



Figura 11: Amperímetro e voltímetro.
Fonte: Autoria própria.

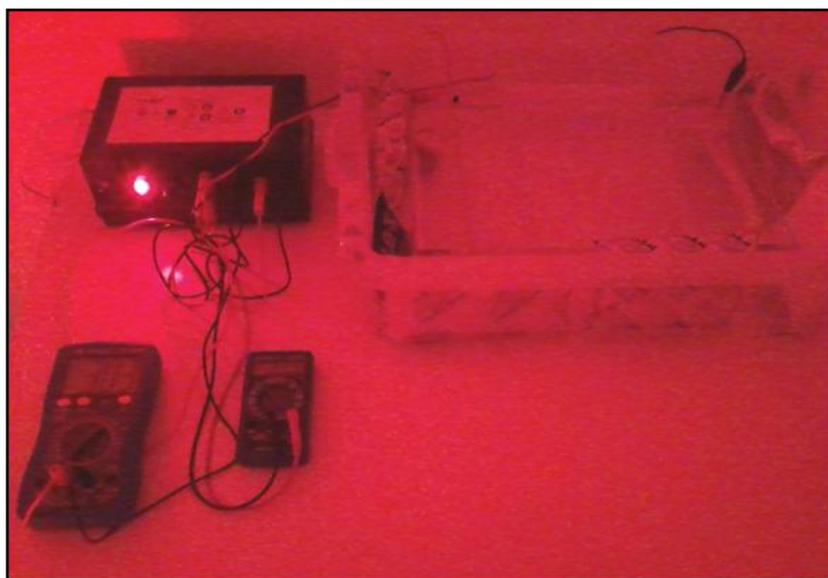


Figura 12: Corrida eletroforética no escuro.
Fonte: Autoria própria.

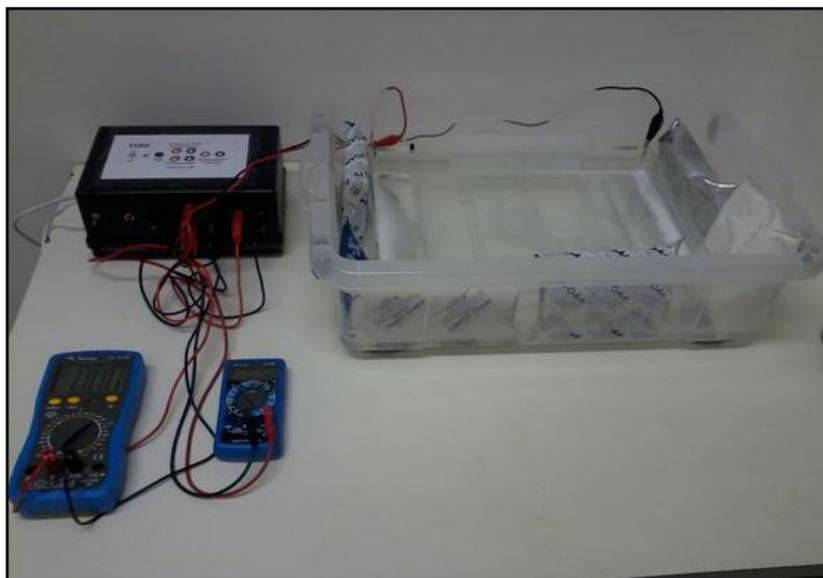


Figura 13: Após a corrida eletroforética.
Fonte: Autoria própria.

5.4.5 Coloração e análise microscópica

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência marca Leica DMLS, com aumento de 400x. Foi adicionado corante brometo de etídeo (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) sobre as lâminas, e estas foram em seguida analisadas. A quantificação dos danos foi feita visualmente, com a análise de 100 nucleóides em cada lâmina, de acordo com as classes variando entre 0 (sem dano aparente) a 4 (DNA danificado). Após a análise visual dos danos dos nucleóides, para cada lâmina, foi atribuído um escore. O escore foi calculado através do somatório do número de nucleóides com o dano vezes o valor do dano (COLLINS et al., 1997).

O ensaio cometa foi realizado buscando a comparação entre os danos ao DNA de *D. magna* expostas a três diferentes substâncias, em diferentes diluições onde foram observadas Daphnias móveis, em relação ao grupo controle (*D. magna* expostas à água de diluição).

5.5 Análise estatística

Para o cálculo da CE50 das substâncias de referências utilizadas, utilizou-se o programa Excel® fazendo-se regressão linear. Os dados foram plotados em planilha, no eixo x as concentrações em escala logarítmica e no eixo y o efeito observado (porcentagem de imobilidade) em escala aritmética. Assim obtiveram-se gráficos de dispersão e uma reta, cuja equação permitiu o cálculo da CE50.

A partir dos resultados obtidos de CE50 de cada teste, foi calculado a média e os desvios padrão, superior e inferior, com intervalo de confiança de 95% para que fosse elaborada a carta controle da substância de referência.

Para o ensaio cometa, a análise estatística seria feita através da comparação dos escores de danos ao DNA das Daphnias entre as diluições que proporcionaram a CE 50 e a menor concentração utilizada de cada substância, e o grupo controle, através do teste estatístico de Mann-Whitney (para 2 grupos) ou Kruskal-Wallis (para 3 ou mais grupos), utilizando o programa BioEstat 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Testes de Sensibilidade

O teste de sensibilidade tem como objetivo verificar as condições em que os organismos se encontram para uma posterior análise toxicológica, sendo que os resultados desse teste devem estar dentro de uma faixa conhecida de sensibilidade a uma substância de referência.

A avaliação da sensibilidade foi realizada empregando-se ensaios com *D. magna* com Dicromato de Potássio, Cloreto de Potássio e Sulfato de Cobre.

Os valores calculados de CE50-24h dos dez testes de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio, para *Daphnia*, estão apresentados na tabela 1, com as respectivas médias de cada ensaio, desvio padrão (S) e coeficiente de correlação (R), entre a taxa de imobilidade e as concentrações utilizadas.

Os testes de sensibilidade com dicromato de potássio obtiveram valores de CE50-24h dentro da faixa recomendável por padrões internacionais (ISO 6341 - 2012), entre 0,6 mg/L e 1,7 mg/L (KNIE; LOPES, 2004). A CE50-24h média obtida foi de 0,82 mg.L⁻¹. Apesar da CE50 encontrada estar dentro do aceitável, proporcionando credibilidade para o ensaio cometa, observa-se que os coeficientes de correlação (R) obtidos para essa substância variou entre 0,628 e 0,970, uma diferença significativa, o que indica uma difícil linearidade de resposta utilizando o dicromato de potássio.

ALVES e SILVANO (2006) encontraram uma CE50-24h média de 1,28 mg.L⁻¹, estando dentro da faixa recomendável. BRENTANO (2006), encontrou uma CE 50 24h média para a substância de referência dicromato de potássio de 0,76 ± 0,17 mg.L⁻¹, proporcionando-lhe credibilidade dos testes desenvolvidos, pois a sensibilidade do cultivo esteve dentro do recomendado pelas normas internacionais (ISO 6341, 2012). SOUZA (2008), obteve uma CE50-24h média um pouco mais elevada, 1,45 mg.L⁻¹, porém também está dentro da faixa aceitável, utilizou concentrações entre 1,1 e 1,9 mg/L.

Tabela 1: Valores médios de CE50-24 h (mg de K₂Cr₂O₇/L) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).

Nº do teste	Data dos testes	CE 50-24h (mg/L)	R
1	22/01	0,93	0,718
2	24/01	0,64	0,806
3	29/01	0,91	0,970
4	30/01	0,96	0,937
5	05/02	0,69	0,800
6	13/02	0,66	0,628
7	20/02	0,99	0,952
8	26/02	0,89	0,853
9	28/02	0,67	0,921
10	28/02	0,88	0,952
Média		0,82	
Desvio Padrão (S)		0,13926793	

Fonte: Autoria própria.

Segundo ZAGATTO e BERTOLETTI (2006) quando a concentração de íons Mg e Ca são elevadas na água de diluição há a decréscimo da toxicidade do cromo, o que indica que a toxicidade do dicromato de potássio é influenciada pela dureza. Isso pode explicar a variação grande entre CE50 encontradas por outros autores que utilizam o dicromato de potássio como substância de referência.

Considerando-se o critério de média $\pm 2 S$ para determinar o intervalo de aceitação dos valores de CE50-24h, para o controle da sensibilidade (USEPA,2002), verificou-se que a sensibilidade da *Daphnia magna* ao dicromato de potássio manteve-se dentro do aceitável (Figura 14).

Os valores calculados de CE 50-48h dos dez testes de toxicidade aguda com a substância de referência cloreto de potássio, para *D. magna*, estão apresentados na tabela 2, com as respectivas médias dos ensaios, desvio padrão (S) e coeficiente de correlação (R), entre a taxa de imobilidade e as concentrações utilizadas.

Para o cloreto de potássio o valor de CE50-48h, a média obtida no trabalho foi de 698,8 mg/L, valor satisfatório e que se encontra dentro dos limites estabelecidos (Figura 15) , dois desvios padrões acima e abaixo da média (ABNT 12.713:2004).

Observa-se na Tabela 2 que o cloreto de potássio apresentou bons valores de linearidade para os testes, a maioria dos coeficientes de correlação (R) permaneceram acima de 0,90, isso pode ser atribuído ao fato de que a toxicidade desta substância não é influenciada pela qualidade da água de diluição (ENVIRONMENT CANADA, 1995).

Tabela 2: Valores médios de CE50-48 h (mg de KCl) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).

Nº do teste	Data dos testes	CE 50-48h (mg/L)	R
1	22/10	651,79	0,918
2	22/10	691,90	0,858
3	24/10	745,43	0,894
4	29/10	672,18	0,943
5	29/10	640,21	0,919
6	23/01	772,77	0,906
7	28/01	665,18	0,941
8	28/01	663,06	0,939
9	28/01	766,86	0,907
10	29/01	718,31	0,952
Média		698,808	
Desvio Padrão		48,88077486	

Fonte: Autoria própria.

Para a realização do ensaio com cloreto de potássio utilizou-se as diretrizes da Norma 12.713:2004 da ABNT, metodologia também utilizada por LOPES et al. (2010), os quais obtiveram uma CE50-48h, média de 650 mg/L.

Ainda que existam poucos trabalhos com a aplicação do cloreto de potássio como substância de referência, os dados obtidos nos experimentos indicam a adequação desse composto para tal finalidade, além de ser mais seguro com relação à disposição no ambiente. KNIE e LOPES (2004) indicam o uso de substâncias inofensivas (quanto ao manuseio), como o cloreto de potássio, mesmo

que seus efeitos não sejam claramente diferenciáveis se fisiológico-osmóticos ou tóxicos.

ZAGATTO e BERTOLETTI (2006) recomendam que a utilização do cloreto de potássio como substância de referência seja feita com cautela, uma vez que há poucos dados ecotoxicológicos disponíveis da mesma. No entanto, se percebe a melhor linearidade de resultados utilizando o cloreto de potássio, além do fato de esse sal não ter sua toxicidade alterada pela qualidade da água (ENVIRONMENT CANADA, 1995), diferentemente do dicromato de potássio e sulfato de cobre, os quais têm sua toxicidade afetada pela dureza da água de diluição (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Em vista disso, percebe-se a importância de aumentarem-se os estudos com o cloreto de potássio, pois esta é uma substância de referência que se mostrou muito linear em seus resultados e que tendo uma faixa de CE50 padronizada e seus efeitos ecotoxicológicos estudados de forma mais aprofundada, pode vir a substituir o uso do dicromato de potássio, que além de cancerígeno, tem um descarte de valor monetário elevado e tem sua toxicidade alterada em decorrência da água de diluição utilizada por cada laboratório.

Os valores calculados de CE50-24h dos dez testes de toxicidade aguda com a substância de referência sulfato de cobre, para a *Daphnia magna*, estão apresentados na tabela 3, com os respectivos valores de intervalo de confiança, médias do teste, desvio padrão (S) e coeficiente de correlação (R).

Para a realização do ensaio com sulfato de cobre foi adaptada a metodologia de ARAUCO et al. (2005) os quais obtiveram uma CE50 média de 0,044 mg/L, de 48h.

A toxicidade do sulfato de cobre utilizando organismos aquáticos depende da concentração biodisponível e da sensibilidade do organismo (OLIVEIRA-FILHO, LOPES; PAUMGARTTEN, 2004). O valor médio obtido da CE50 foi de 0,17 mg/L, para análises de 24 (Figura 16). Observa-se que os valores dos coeficientes de correlação (R), entre a taxa de imobilidade e as concentrações utilizadas, teve uma variação significativa, entre 0,740 e 0,965, isso mostra uma difícil linearidade de resposta utilizando o sulfato de cobre como substância referência, assim como o dicromato de potássio.

Tabela 3: Valores médios de CE50-24 h (mg de CuSO₄.5H₂O/L) calculados para os testes de toxicidade aguda com intervalo de confiança (95%).

Nº do teste	Data dos testes	CE 50-24h (mg/L)	R
1	02/01	0,20	0,897
2	08/01	0,16	0,793
3	10/01	0,19	0,852
4	14/01	0,14	0,759
5	15/01	0,16	0,839
6	15/01	0,14	0,758
7	16/01	0,20	0,926
8	17/01	0,22	0,965
9	22/01	0,14	0,740
10	23/01	0,15	0,776
Média		0,17	
Desvio Padrão		0,02981424	

Fonte: Autoria própria.

Entretanto, ao tentar realizar a mesma metodologia de ARAUCO et al. (2005), os neonatos em teste acabavam morrendo em grande quantidade, mesmo nas menores concentrações, não apresentando portanto uma correlação com as concentrações de sulfato as quais as Daphnias foram submetidas e a taxa de mortalidade. Portanto, a CE50 média obtida do sulfato de cobre para a *D. magna* diferiu de algumas concentrações observadas na literatura. ELNABARAWY e ROBIDEU (1986) calcularam uma CE50-48h média de 0,041 mg/L e MOUNT e NORBERG (1984) obtiveram uma CE50-48h média de 0,054 mg/L. Já KHANGAROT e RAY (1989) calcularam para a *D. magna* CE50 de 0,54 mg/L e SECOGORDILLO et al. (1998) calcularam uma CE 50 média de 0,21mg/L utilizando Meio M4, dureza 250 ± 15 mg/L em CaCO₃, no entanto para uma análise de 48h.

Esta diferença significativa da CE50 comparando com os resultados calculados por ARAUCO et al. (2005), pode estar relacionada à alimentação fornecida as Daphnias, pois além dos autores fornecerem algas *Scenedesmus subspicatus*, as Daphnias também receberam ração fermentada para peixe, levedura e complexo vitamínico composto por: B1 (7 mg), B2 (7 mg), B6 (5 mg), B12

(33 mg) e H (1mg) de acordo com Sipaubá-Tavares (2001), o que pode ter tornado esses organismos mais resistentes, podendo então ser analisada a toxicidade do sulfato de cobre aos organismos teste em 48h.

ZAGATTO e BERTOLETTI(2006) listam algumas limitações das substâncias de referência utilizadas em laboratório, como o sulfato de cobre que tem sua toxicidade alterada em função do pH e dureza da água de diluição. Essa situação foi evidenciada em nossos resultados, pois a dureza utilizada com o sulfato de cobre por outros autores era superior a 250 mg CaCO₃/L, já a utilizada nos testes realizados no trabalho obedeciam as recomendações da NBR 12.713 (2004), com valores entre 175 mg CaCO₃/L e 225 mg CaCO₃/L.

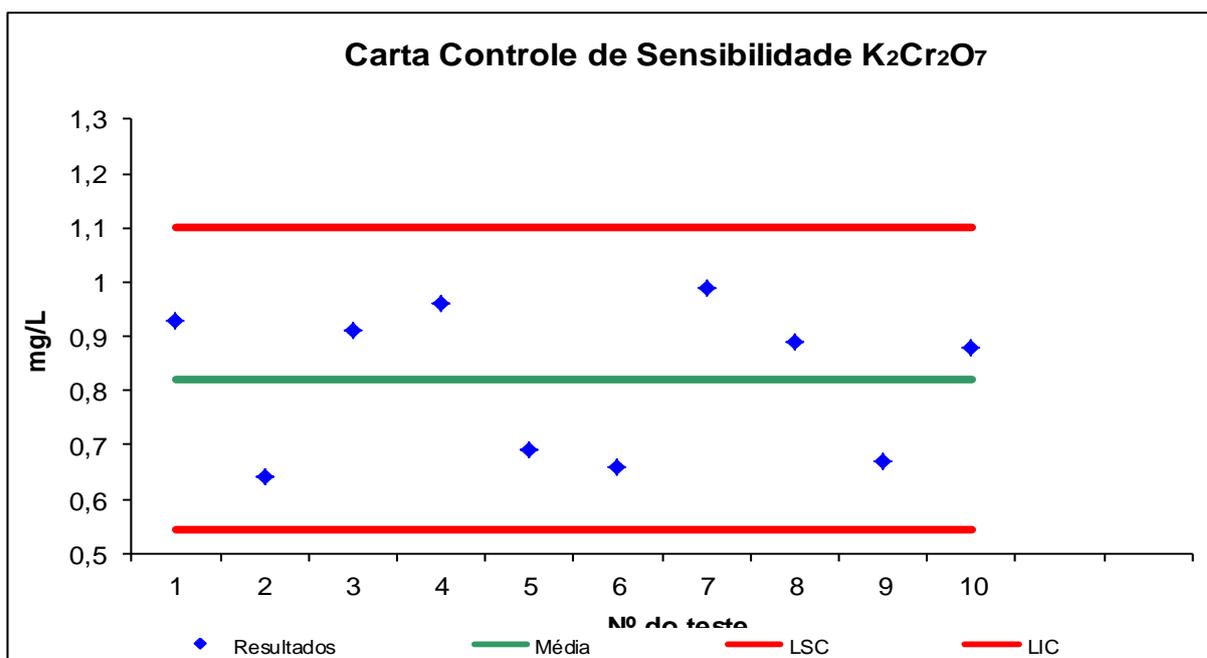


Figura 14: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de CE50-24 horas do dicromato de potássio a *Daphnia magna* (LSC = limite superior calculado; LIC = limite inferior calculado).

Fonte: Autoria própria

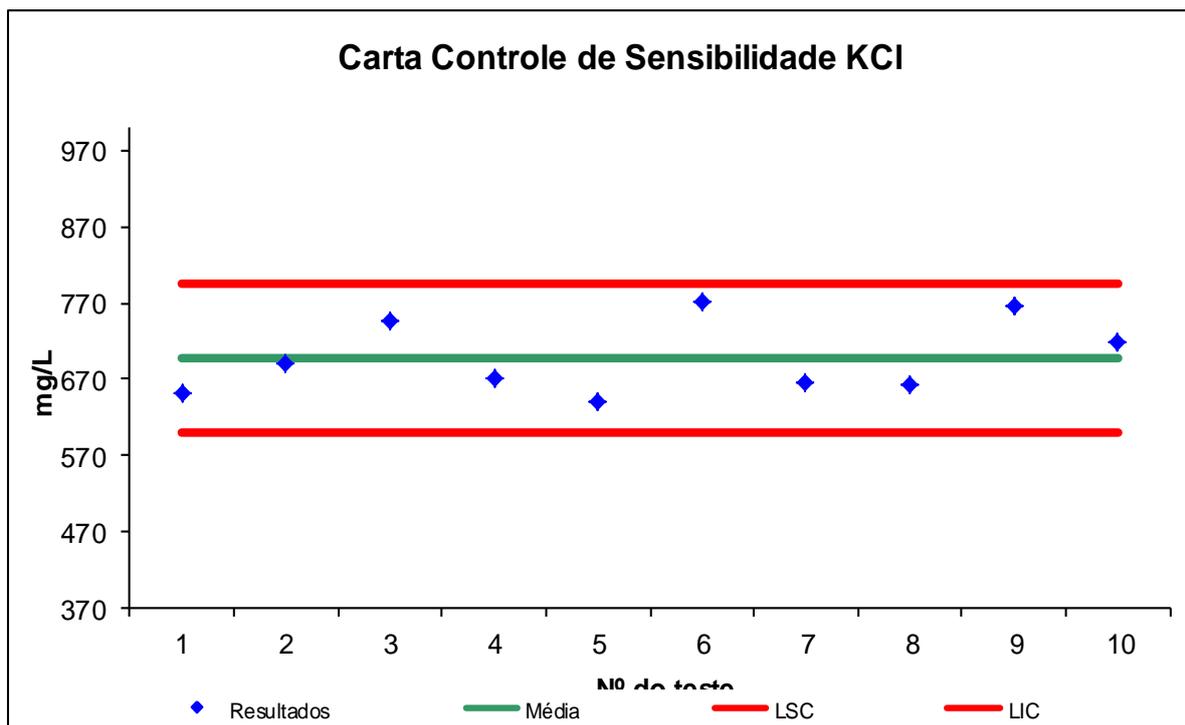


Figura 15: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de limite inferior calculado).
Fonte: Autoria própria.

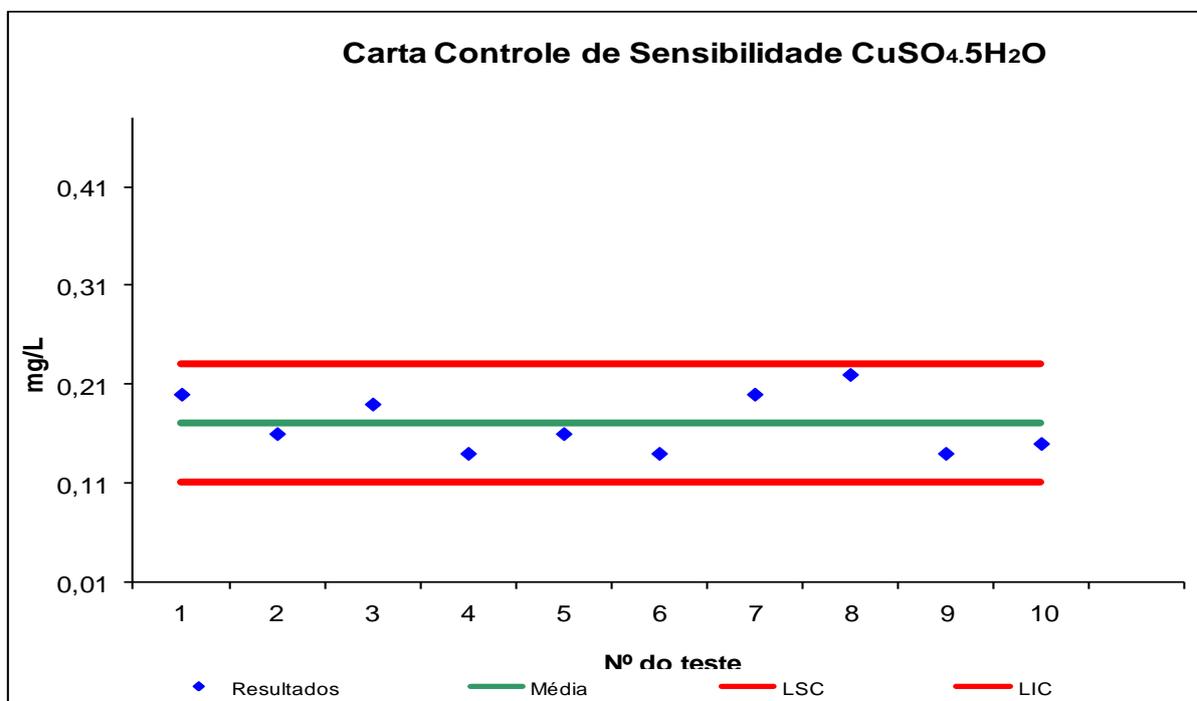


Figura 16: Controle de qualidade do organismo-teste e estabelecimento da faixa aceitável, de CE50-24 horas do sulfato de cobre a *D. magna* (LSC = limite superior calculado; LIC = limite inferior calculado).
Fonte: Autoria própria.

6.2 Ensaio Cometa

Ao realizar este trabalho, foi proposta a análise de genotoxicidade para o valor médio de CE50 das substâncias de referência e para a sua menor concentração, sendo verificado se estas substâncias causariam algum dano no material genético das Daphnias após serem expostas a estas substâncias por um determinado período de tempo. Assim, pelo ensaio cometa, seria possível quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas.

No entanto não foi possível a determinação destes resultados, embora tenha sido utilizada a metodologia de LEE, MAN e CHOI (2009), os quais obtiveram resultados satisfatórios com o organismo *Daphnia magna*. Pois, cabe acreditar que alguns fatores contribuíram para que os resultados não fossem satisfatórios: no momento do estudo o laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde foram realizados os testes, passava por um período de adaptação à nova sede, isso fez com que o cultivo de vários organismos fosse afetado e conseqüentemente a realização dos testes; o desagregador de material não era o ideal para o processo com *Daphnia magna*, pois havia muita perda de material genético durante o processo de transferência da suspensão celular para os eppendorfs, sem contar que o material genético da *D. magna* é muito pequeno, o que dificultou bastante a análise desse material. A metodologia empregada esta em fase de validação, pois até então ninguém havia feito testes de genotoxicidade na universidade. Houve também uma grande dificuldade para padronizar a quantidade de material para as lâminas, devido ao pequeno tamanho corpóreo das Daphnias, o que dificultou nossa análise estatística, aliado ao pequeno tamanho dos nucleóides e difícil análise dos danos. Apesar das dificuldades encontradas durante o desenvolvimento do ensaio cometa, a técnica foi bem estabelecida, sendo possível a visualização de cometa, mesmo que muito pouco, o que não viabilizou a mensuração dos resultados e a análise estatística.

Entretanto, a metodologia foi desenvolvida na universidade utilizando peixes como organismo teste e se mostrou eficaz, obtendo-se resultados satisfatórios.

7. CONCLUSÃO

Considerando-se as condições em que os testes foram realizados e os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- ✓ Todas as substâncias testadas atendem à finalidade de serem utilizadas como substância de referência, podendo ser utilizadas para padronização de testes de sensibilidade;
- ✓ As condições do ambiente de cultivo afetam a resposta dos organismos às substâncias, como visto no caso da alteração do período de realização de teste com o sulfato de cobre;
- ✓ É possível ser realizada a substituição do dicromato de potássio, que oferece riscos a quem o manuseia, pelo cloreto de potássio, substância que apresentou resultados satisfatórios, tendo em vista que esta é mais segura e apresenta uma disposição menos danosa ao ambiente.
- ✓ Para a validação da metodologia do ensaio cometa com *Daphnias* é necessário a realização contínua do estudo, pois o laboratório já esta com as instalações adaptadas, sem que ocorram mudanças que prejudiquem o cultivo dos organismos teste;
- ✓ Seria interessante trocar o desagregador de material genético, para que haja a menor perda possível de material, recomenda-se utilizar um desagregador diretamente no eppendorf em que a suspensão esta alocada;
- ✓ O objetivo de implantar a técnica do ensaio cometa no Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da UTFPR foi atingido, porém a análise estatística não se mostrou viável em razão do pequeno tamanho dos cometas e pequena quantidade de células observada, mesmo após bastante tempo procurando a padronização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.648:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) Rio de Janeiro, 2011. 28 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713:** Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2004. 21 p.

AGUIAR, D.S. Sulfato de Cobre pentahidratado, UERJ. Disponível em:<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAA6WgAH/sulfato-cobre-penta-hidratado#>>. Acesso: 02 jan. 2012, 10:27.

ALVES, A. C; SILVANO, J. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna Straus*, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao dicromato de potássio, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 65, p. 59-61, 2006.

ANDRADE, V. M.; FREITAS, T.R.O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research**, n. 560, p. 57-67, 2004.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***. 135p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ARAUCO, L.R.R, et al. Efeito da Presença de Sedimento na Toxicidade aguda do Sulfato de Cobre e do Triclorfon para Três Espécies de *Daphnia*, **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, Vol. 15, p. 55-64, jan./dez. 2005.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 340p, 2003.

BAPTISTA, D.F; DORVILLÉ, L. F; BUSS, D.F; NESSIMIAN, J.L. Spatial and temporal organization of aquatic insects assemblages in the longitudinal gradient of a tropical river. **Brazilian Journal of Biology**, n.61, p. 295-304, 2001.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, Vol. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BORGES P. et al. **Caracterização da pureza do padrão primário de cloreto de potássio por coulometria a corrente constante e cromatografia iônica**, 2011. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T3281-2.pdf>>. Acesso em: 02/01/2013.

BOYD, C.E; TUCKER, C.S. **Pond aquaculture water quality management**. Boston: Editora Kluwer Academic, 700 p., 1998.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental: o desafio de desenvolvimento sustentável**. 2 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 305 p., 2005.

BRENTANO, D.M. Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 130p., 2006.

BRESOLA, R.C. **Avaliação de toxicidade de mananciais em áreas degradadas pela mineração com a utilização do bioindicador *Scenedesmus subspicatus* e implementação de metodologia de toxicidade com peixe *Danio rerio* popular “zebrafish”**. Monografia (Engenharia Ambiental). Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Criciúma. 69p., 2007.

BRIANEZI, G. S. ET AL. Desenvolvimento E Validação De Técnica Quantitativa De Análise De Imagem Para Avaliação Do Teste Do Cometa Corado Pela Prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, VOL. 45, N. 4, P. 325-334, 2009.

CETESB. **ÁGUA: TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM DAPHNIA SIMILIS CLAUS, CLADOCERA, CRUSTÁCEA**. SÃO PAULO, P1-17, 1991

COLLINS A., DUSINSKÁ M., FRANKLIN M., SOMOROVSKÁ M., PETROVSKÁ H., DUTHIE S., FILLION L., PANAYIOTIDIS M., RASLOVÁ K., VAUGHAN N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol. 30 (2), P139–146, 1997.

COLLISHONN, W; TASSI, R. **Introduzindo Hidrologia**, IPH UFRGS, cap.19, 2010.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, Vol. 24, p. 950-954, 1992.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). **Resolução nº 020**, de 18/06/1986.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). **Resolução nº 357**, de 17/03/2005.

COSTA, M. A. G. **Poluição ambiental: herança para gerações futuras**. Santa Maria, RS: Orium, 254 p., 2004.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. Ano 2, número 12, p. 24-26. 2000.

DA SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, v.1. 424p, 2003.

DANIEL GARCIA. **Daphnia magna**. Fotografia, colorida. Disponível em: <<http://www.aquarium-kosmos.de/inhalt/57/>> Acessado em: 10 de Nov. 2011, 10:00.

ELENDT, B.P., BIAS, W.R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. **Water Research.**, vol. 24, p. 1157-1169, 1990

ELMOOR L. **Manual de identificação de Cladoceros límnicos do Brasil**. Editora Universa, Brasília, 156p.

ELNABARAWAY, W. T.; ROBIDEU, R.R. Relative sensitivity of daphnid specie to selected organic and inorganic chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 5, p 393- 398, 1986.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant**, report EPS 1/RM/30, 1995.

FONSECA, A. L. A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestres* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais. 210 f. **FUNEP**, 1998. p.46-49., 1991.

GENDA, A. **Saneamento do meio**. São Paulo: FUNDACENTRO, 1982.

GONÇALVES, L.M.; CONCEIÇÃO, M.B.; RESGALLA-JUNIOR, C. Avaliação do potencial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão *Perna perna* através do Ensaio do Cometa. In: **II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**, Itajaí, SC. Livro de Resumos. Vol.1. Itajaí: UNIVALI, p 384, 2003.

IANISTCKI, M.; BENVENU, V. C.; GROFF, A. A.; SCHRODER, N. T.; SILVA, J. O ensaio cometa em *Cantareus aspersus* no biomonitoramento da genotoxicidade dos poluentes atmosféricos no campus da ULBRA. In: **II Jornada de Iniciação Científica - Meio Ambiente - Fundação Zoobotânica do RS e FEPAM**. Porto Alegre, 2006.

INFOPÉDIA, sulfato de cobre (II). Porto: Porto Editora, 2003-2012. Disponível em <[http://www.infopedia.pt/\\$sulfato-de-cobre-\(ii\)](http://www.infopedia.pt/$sulfato-de-cobre-(ii))>. Acesso: 29/01/2013.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 6341**: Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*. Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Ed 4, 22 p, 2012

KAPCZINSKI, F.; SANTIN A.; ANDREAZZA, A.C.; FREY, N.B.; ERDTMANN, B.; CERESER, M.M.K.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; COSTA, C.S. **Avaliação de Danos Oxidativos ao DNA de Pacientes Portadores de Transtorno do Humor Bipolar em Comparação com Controles Comunitários**, p 1-2., 2004

KHANGAROT, B.S.; RAY, P.K. Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus, **Ecotoxicological Environmental Safety**, New York, v.18 p. 109-120, 1989.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA, 288 p., 2004.

KUBTIZA, F. Qualidade Da Água Na Produção De Peixes - Parte I, **Panorama da Aqüicultura**, Janeiro/fevereiro, 1998

LEE S.; MAN S.; CHOI J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Vol. 28, p86-91, 2009

LEMOS, C.T; TERRA, N.R. Poluição – causas, efeitos e controle. In: Silva, J; Erdtmann, B; Henriques, J.A.P. (Ed.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, p. 117-144, 2003.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. vol 12, n. 3, p. 355-381. 2008.

MANSANO A. Avaliação Da Toxicidade Aguda Do Antibiótico Ciprofloxacina Aos Cladóceros *Daphnia magna* E *Ceriodaphnia silvestrii* - **VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 12, p. 76-88. , 2012.

MARTINS, L.M.; OLIVEIRA, L.L.D.; ROCHA, O. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes** 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 58p., 1997.

MOREIRA L.L. **Avaliação Ecotoxicológica Preliminar De Efluentes Contendo Brometo De Etídeo**. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), 33p. 2010.

MOUNT, D.I.; NORBERG T.J. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, New York, Vol. 3, p.425-433, 1984.

MÜLLER O.F. World Register of Marine Species. Disponível em: < <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=148372>> Acesso em: 20 set. 2011 13:00.

MULLER. A. C., **Introdução à Ciência Ambiental**, Curitiba – PUC-PR. Pág. 67 a 73., 2007. Disponível em: < ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/impactos_sobre_as_aguas/a_origem_da_poluicao_hidrica.html?query=materia+organica+agua> Acesso em: 04 de Nov. 2011, 20:30.

NASCIMENTO R. Substituição De Cloreto De Sódio Por Cloreto De Potássio: Influência Sobre As Características Físico-Químicas E Sensoriais De Salsichas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Vol.18, n.3, p. 297-302, jul./set. 2007

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; LOPES, R.M.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, Oxford, v. 56,p. 369-374, 2004.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environmental International**, Vol. 33, p. 817-822, 2007

PAUW; LAUREYS; MORALES. Mass cultivation of *Daphnia magna* Straus on rice bran. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 25, p. 141-142, 1981.

RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, environmental fate, and risk assessment**. 2ed. Ed. Taylor & Francis, 1148p, 1995.

ROCHA, C. A. M.; CUNHA, L. A.; PINHEIRO, R. H. S.; ALMEIDA, V. H. C.; SAGICAJUNIOR, J. C.; SOUZA, Y. S. R.; MORAES, L. S. Avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa em *Aequidens tetramerus* (Perciformes: Cichlidae) expostos ao metilmercúrio. **Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética**. Águas de Lindóia, SP. 2009.

ROJAS, J.R., TRIEVEL, R.C., ZHOU, J., MO, Y., LI, X., BERGER, S.L., ALLIS, MARMORSTEIN, R. Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. **Nature** 401, 93–98, 1999

SANTOS, D; COSTA,G. **Preparação Do Dicromato De Potássio (K₂Cr₂O₇)**. Relatório Técnico. UNUCET, 2010.

SECOGORDILLO, S.I.; FERNÁNDEZ PEREIRA, C.; VLE PARAPAR, J.F. Evaluacion de la ectoxicidade aguda de metales pesados com *Daphnia magna* Straus, Universidad de Sevilla Espanã, **Restoratin** Vol.1 n.1, p.3-12, 1998.

SETAC. Report of the aquatic risk assess ment and mitigation dialgue grupe: Pensacola,FL: **STAC Foundation for Education**, 44p., 1994.

SILVA, J. C. Biomarcadores Morfológicos E Análise Química Da Bile Em Peixes Para A Avaliação Da Qualidade Da Água Do Rio Iguçu. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) p.2., 2010.

SILVA, J. da. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**. vol 2, n. 2, p. 30-33. 2007.

SILVA, P.S. **Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio criciúma (sc) utilizando como organismos bioindicadores *Artemia* sp., *Daphnia magna* e *Allium cepa***. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas UNESC, 2008.

SINGH, N. P.; MACCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; Rocha, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. Rima Editora, São Carlos, Brasil, 106pp., 2001.

SLOW-K Potassium Chloride Tablet, Extended Release. Novartis Pharmaceuticals Corporations. Disponível em: <<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=D22A9867-B638-4150-9DE4-CBC7D9398827>>. Acesso em: 15 nov. 2012, 23:00.

SOUZA, J.P. **Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Aqüicultura, Jaboticabal – São Paulo, UNESP, pg-38., 2008

STECKERT, A.V. **Análise ecotoxicológica da água e verificação de dano ao DNA em peixes expostos a agrotóxicos em Cultura de arroz irrigado, Araranguá (SC)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas), 41p., 2007.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, p.206-221, 2000.

USEPA. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. Fifth edition, 266 p, 2002

VALENT, G.U. Histórico da importância e utilização dos testes de genotoxicidade no Brasil. In: **Congresso De Ecotoxicologia**. Itajaí-SC, 1998.

ZAGATTO, P. A. et al. Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. In: **Revista SABESP**, n. 166, p. 01-06, 1992.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – **Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 464 p., 2006.

APÊNDICES**APÊNDICE A- Parâmetros do meio de cultivo M4.**

Nº Lote	pH	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Dureza (mg/L)
1	7,88	0,93	215,35
2	7,65	0,88	213,28
3	7,42	0,75	220,53
4	7,36	0,82	216,79
5	7,21	0,69	214,45
6	7,82	0,72	217,32
7	7,69	0,80	222,15
8	7,15	0,89	218,65
9	7,27	0,77	221,48
10	7,46	0,88	219,89
11	7,84	0,83	213,87
12	7,92	0,90	222,54
13	7,33	0,87	215,87
14	7,46	0,82	220,14
15	7,81	0,75	216,35
16	7,90	0,68	221,87
17	7,42	0,84	219,31
18	7,53	0,68	214,58
19	7,13	0,75	216,46
20	7,49	0,81	223,78
21	7,82	0,82	219,49
22	7,95	0,95	221,32
23	7,77	0,78	217,84
24	7,64	0,68	219,37
25	7,32	0,74	223,68
26	7,24	0,82	218,65

APÊNDICE A - Parâmetros do meio de cultivo M4

Nº Lote	pH	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Dureza (mg/L)
27	7,94	0,90	217,32
28	7,88	0,87	221,26
29	7,46	0,71	217,50
30	7,39	0,86	223,72
31	7,25	0,64	219,41
32	7,82	0,75	217,37
33	7,65	0,87	221,12
34	7,19	0,82	217,62
35	7,32	0,71	220,43
36	7,58	0,68	215,24

APÊNDICE B - Parâmetros da água de diluição.

Nº Lote	pH	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	Dureza (mg/L)
1	7,44	0,69	212,22
2	7,52	0,75	214,35
3	7,42	0,72	216,17
4	7,48	0,82	213,68
5	7,69	0,67	217,74
6	7,72	0,88	213,49
7	7,77	0,87	220,24

ANEXOS

ANEXOS A - Soluções e estoque para o preparo do Meio Básico e do Meio M4.

MEIO BÁSICO			
Solução nº	Sal	Massa	Método
1.1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73,5 g	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar em balança semi-analítica. • Dissolver para 1 L de água bidestilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. • Guardar em geladeira.
1.2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3 g	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar em balança semi-analítica. • Dissolver para 1 L de água bidestilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. • Guardar em geladeira.
1.3	KCl	5,8 g	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar em balança semi-analítica. • Dissolver para 1 L de água bidestilada ou deionizada. Aferir em Balão Volumétrico. • Guardar em geladeira.
1.4	NaHCO ₃	64,8 g	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar em balança semi-analítica. • Dissolver para 1 L de água bidestilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. • Guardar em geladeira.
1.5 - Catiônica	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,21 g	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar os sais com massa maior do que 1 grama em balança semi-analítica separadamente. • Pesar em balança analítica separadamente, sais <i>com</i> massa inferior a 1 g. • Para este sal, usar somente vidro ou plástico na pesagem. Não usar papel alumínio. • Dissolver cada sal separadamente em um Béquer com pouco de água. Ir adicionando um a um em um Balão Volumétrico também com água, completar para 1000 mL de água bidestilada ou deionizada. • Guardar em geladeira.
	LiCl	6,12 g	
	RbCl	1,42 g	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3,04 g	
	ZnCl ₂	0,26 g	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g	
	CuCl ₂ .2H ₂ O _a	0,335g	
1.6 - Aniônica	NaNO ₃	0,548 g	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar os sais com massa maior do que 1000 mg em balança semi-analítica separadamente. • Pesar em balança analítica separadamente, sais com massa inferior a 1000 mg. • Dissolver cada sal separadamente em um Béquer com pouco de água. Ir adicionando um a um em um balão volumétrico também com água, completar para 1000 mL de água bidestilada ou deionizada. • Guardar em geladeira.
	H ₃ BO ₃	5,719 g	
	NaBr	0,032 g	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,126 g	
	NH ₄ VO ₃	0,00115 g	
	KI	0,0065 g	
	NaSe ₂ O ₃	0,00438 g	
1.7- Silicato	Na ₂ SiO ₃ (Líquido ou sólido)	28 mL (se líquido). 21,475 g (se sólido)	<ul style="list-style-type: none"> • Se líquido: Pipetar de silicato de sódio com pipeta volumétrica. Dissolver para 1 L de água bidestilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. • Se sólido: Pesar em balança semi-analítica. Dissolver para 1 L de água bidestilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. Agitar até o clareamento da solução. • Guardar em geladeira
1.8 - Fe/EDTA	Na ₂ .2H ₂ O-EDTA	1,000 g	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar as soluções separadamente para cada

MEIO BÁSICO			
Solução nº	Sal	Massa	Método
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,3980 g	<p>substância.</p> <ul style="list-style-type: none"> Diluir cada uma para 1000 ml de água bidestilada em balão volumétrico. Após, misturar as duas soluções em um balão de fundo chato de pelo menos 3000 ml. Tampar e autoclavar a 1,1 kgf/cm² de pressão por no mínimo 15 minutos. Deixar esfriar. Guardar em geladeira em 2 litros.
1.9 - Fosfato	KH ₂ PO ₄	0,286g	<ul style="list-style-type: none"> Dissolver sequencialmente as substâncias, uma a uma, para 1 L de água bidestilada, destilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. Guardar em geladeira,
	K ₂ HPO ₄	0,368 g	
1.10- Vitamínica	Hidrocloreto de Tiamina	0,75 g	<ul style="list-style-type: none"> Dissolver sequencialmente as substâncias, uma a uma, para 1 L de água bidestilada, destilada ou deionizada. Aferir em balão volumétrico. Estocar no freezer em pequenas porções de 10 ml, em tubos eppendorf ou tubos de ensaio cobertos.
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	0,01 g	
	D (+)Biotina	0,0075 g	

Fonte : Adaptado de KNIE; LOPES, 2004.

ANEXOS B - Método de preparo do meio básico.

SOLUÇÃO	UTILIZAR VIDRARIA:
280 ml da solução básica 1.1	Proveta de 100 ml ou pipetas graduadas ou volumétricas de 50 ml, 20ml e 10 ml
80 ml da solução básica 1.2	Pipeta graduada ou volumétrica 10 ml ou 20 ml
80 ml da solução básica 1.3	Pipeta graduada ou volumétrica 10 ml ou 20 ml
80 ml da solução básica 1.4	Pipeta graduada ou volumétrica 10 ml ou 20 ml
10 ml da solução catiônica 1.5	Pipeta graduada ou volumétrica 10 ml ou 20 ml
50 ml da solução aniônica 1.6	Pipeta volumétrica de 50 ml ou Proveta de 100 ml
20 ml da solução de Silicato 1.7	Pipeta volumétrica ou graduada de 10 ml ou 20 ml
500 ml da solução Fe/EDTA 1.8	Proveta de 500 ml ou 1000 ml
50 ml da solução Fosfato 1.9	Proveta de 100 ml ou pipeta volumétrica de 50 ml
10 ml da solução Vitamínica 1.10	Descongelar e imediatamente adicionar.

Fonte: Adaptado de KNIE; LOPES, 2004.

ANEXOS C - Critérios para aprovação do meio de cultivo.

Parâmetro	Critério	Correção
Dureza total	175 a 225 mg/L CaCO ₃	Se estiver fora dos valores especificados descartar o lote de água e preparar um novo lote.
pH	7,0 a 7,8	A correção do pH deve ser feita para $7,0 \pm 0,6$, com soluções de NaOH ou HCl 1N. Efetuar reinspeção neste item se for realizada a correção do pH
Oxigênio Dissolvido (OD) mínimo	4,0 mg/L	A correção pode ser feita através da aeração com bomba aeradora para aquário.

Fonte : Adaptado de KNIE; LOPES, 2004.