

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

JANAÍNE MIODUSKI

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA SEMENTE DE *Moringa oleifera* LAM. FRENTE AOS ORGANISMOS *Daphnia magna* STRAUS. E *Artemia salina* LENCH.

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2014

JANAÍNE MIODUSKI

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA SEMENTE DE *Moringa oleifera* LAM. FRENTE AOS ORGANISMOS *Daphnia magna* STRAUS. E *Artemia salina* LENCH.

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosangela Bergamasco
Coorientadora: Prof^a Dr^a Fátima de Jesus Bassetti

CURITIBA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M669 Mioduski, Janaíne
Avaliação da toxicidade de extratos de semente de *Moringa oleifera* Lam. frente aos organismos *Daphnia magna* Straus. e *Artemia salina* Lench. / Janaíne Mioduski. — 2014.
80 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Rosangela Bergamasco.

Coorientadora: Fátima de Jesus Bassetti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Curitiba, 2014.

Bibliografia: f. 67-75.

1. *Moringa oleifera*. 2. Testes de toxicidade. 3. Coagulantes. 4. Água – Purificação – Coagulação. 5. Água – Purificação – Floculação. 6. Toxicologia ambiental. 7. Tecnologia ambiental – Dissertações. I. Bergamasco, Rosangela, orient. II. Bassetti, Fátima de Jesus, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD (22.ed.) 363.7

TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS DA SEMENTE DE Moringa oleifera LAM. FRENTE AOS ORGANISMOS Daphnia magna STRAUS. E Artemia salina LENCH.

por

JANAÍNE MIODUSKI

Dissertação apresentada às 14h00min do dia 27 de fevereiro de 2014, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Rosângela Bergamasco (Orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dr^a. Fatima de Jesus Bassetti (Coorientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Prof^a. Dr^a. Wanessa Algarte Ramsdorf

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Dr. Flávio Rubens Lapolli

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Visto da Coordenação: _____

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro

Coordenador do PPGCTA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se arquivada na Coordenação do Programa”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me proporcionado tantas oportunidades e por ter me iluminado em todos os momentos.

Agradeço à minha orientadora prof^a Rosangela Bergamasco e à minha coorientadora prof^a Fátima de Jesus Basseti pelo apoio e incentivo durante todas as etapas da pesquisa.

Agradeço também ao prof^o Thomaz Aurélio Pagioro, à prof^a Lúcia Regina Rocha Martins e à prof^a Wanessa Ramsdorf, por me auxiliarem nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia, e por me fornecerem o espaço e os equipamentos necessários ao desenvolvimento da pesquisa. Agradeço da mesma forma a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, em especial à prof^a Lucila Coral, que de uma forma ou de outra, contribuíram tanto com a minha formação profissional quanto pessoal. Agradeço também ao Laboratório de Análises de Solos, prof^o Maurício e prof^a Larissa por também permitirem a realização de parte desta pesquisa neste laboratório.

E é com muito carinho que agradeço a todos os meus colegas e amigos de laboratório, pessoas especiais que mesmo ocupadas em seus próprios trabalhos, sempre tiveram um tempinho para me ajudar em uma análise qualquer, discutir uma hipótese, tomar um cafezinho ou compartilhar um momento de diversão. Gostaria de agradecer em especial à Alejandra, que além de estar comigo em todos os momentos, sempre manteve meu estoque de café colombiano suprido, à Thalita, companheira de dificuldades e congressos, e à Janaina, pelo inestimável auxílio com o cultivo dos organismos, pelos livros e chocolates compartilhados e pelos inúmeros momentos de diversão nos intervalos da pesquisa. Agradeço também à Camila, Giovana, Maikon, Vanessa, Geni e Maiara pela ajuda e companhia nos laboratórios. Às meninas da UEM, em especial à Letícia, Priscila e Karina pelo conhecimento compartilhado e disponibilidade de tempo. Ao laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassas, prof^o José Domingos Fontana e as meninas Adélia, Marcela e Gisele, pelo auxílio nos ensaios. E a todos os demais colegas do programa.

Agradeço também com muito carinho aos amigos que estiveram sempre comigo do “lado de fora”, compartilhando as alegrias e as tristezas, os momentos bons e ruins. Um abraço especial para Tairine, Jéssica, Diego, Fernanda, Rafael, Letícia e Nickolas, sem vocês teria sido muito mais difícil, meus companheiros de trilha, mesa, livros e videogame.

Agradeço a toda minha família, minha mãe Sonia, meu pai Geraldo e minhas irmãs Karyne e Crystini pelo apoio e compreensão durante esta etapa. Em especial aos meus pais, por me auxiliarem sempre na realização desse sonho.

E principalmente ao meu noivo Rodrigo, pelo amor, compreensão, paciência e inesgotável companheirismo em todos os momentos. Se eu consegui chegar até onde cheguei, tenha certeza que foi graças ao seu apoio e carinho incondicional.

“Segundo o velho ditado, é melhor viajar com esperança do que chegar. Nossa busca de descobertas alimenta nossa criatividade em todos os campos, não só na ciência. Se atingíssemos a meta, o espírito humano definharia e morreria. Mas não acredito que um dia chegaremos a nos deter: cresceremos em complexidade, se não em profundidade, e sempre seremos o centro de um horizonte de possibilidades em expansão.”

Stephen Hawking

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

MIODUSKI, Janaíne. **Avaliação da toxicidade de extratos da semente de *Moringa oleifera* Lam. frente aos organismos *Daphnia magna* Straus. e *Artemia salina* Lench.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

A utilização de coagulantes naturais no tratamento de água vem sendo uma alternativa cada vez mais empregada a fim de evitar possíveis danos à saúde e ao meio ambiente causados por determinados coagulantes químicos. A *Moringa oleifera* é uma árvore de múltiplos usos, cujas sementes possuem uma eficiente atividade como coagulante natural. Entretanto, estudos apontam para uma possível toxicidade deste extrato. Baseando-se nisto, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a toxicidade de três diferentes extratos de *M. oleifera* (extrato aquoso, extrato salino da semente integral e extrato salino da semente sem óleo) e da água tratada com os mesmos extratos, frente a duas espécies de microcrustáceos utilizadas como bioindicadoras de toxicidade (*Daphnia magna* e *Artemia salina*). Nos ensaios de toxicidade aguda dos extratos utilizando *D. magna*, verificou-se uma CE50 de 314,05 mg.L⁻¹ para o extrato salino da semente integral e 346,76 mg.L⁻¹ para o extrato salino da semente sem óleo. O extrato aquoso não apresentou toxicidade nem mesmo nas maiores concentrações (400 a 600 mg.L⁻¹). Para o organismo *A. salina*, nenhum dos extratos mostrou-se tóxico. Nos ensaios realizados com a água tratada com os extratos de *M. oleifera*, foi encontrada toxicidade para *D. magna* nas frações sobrenadante (CE50=296,02 mg.L⁻¹) e sedimentada (CE50=291,04 mg.L⁻¹) da água tratada com o extrato salino da semente integral. Para a água tratada com o extrato salino da semente sem óleo, da mesma forma encontrou-se toxicidade nas frações sobrenadante (CE50=351,17 mg.L⁻¹) e sedimentada (CE50=342,32 mg.L⁻¹), o que indica que a toxicidade do extrato não é reduzida após a coagulação/floculação/sedimentação. No teste crônico realizado utilizando organismos de *D. magna* expostos durante 21 dias ao extrato salino da semente integral de *M. oleifera*, foram observadas alterações nos parâmetros avaliados (mortalidade, fecundidade e crescimento), sendo que quanto maior a concentração testada, maiores os efeitos tóxicos. Ao término dos 21 dias experimentais, havia ocorrido a mortalidade de 100% dos indivíduos expostos às maiores concentrações (10 e 15 mg.L⁻¹). Além disso, houve grande variação na fecundidade entre os grupos. Com base nestes resultados, é possível afirmar que a utilização de elevadas concentrações do extrato de *M. oleifera* (acima de 300 mg.L⁻¹) pode causar danos agudos ao organismo *D. magna*. Entretanto, na prática, as concentrações utilizadas deste coagulante são consideravelmente menores, variando principalmente entre 50 e 150 mg.L⁻¹, de acordo com dados da literatura. Da mesma forma, a diluição que ocorreria no meio hídrico dificilmente proporcionaria que a concentração permanecesse elevada, mesmo que grande quantidade do extrato chegasse ao meio ambiente. Com base nisso, é possível afirmar que o uso do extrato da *M. oleifera* pode ser incentivado, mas desde que utilizado com cautela, evitando-se concentrações elevadas.

Palavras-chave: Coagulantes naturais. Ecotoxicidade. Tratamento de água.

ABSTRACT

MIODUSKI, Janaína. **Evaluation of the toxicity of extracts of *Moringa oleifera* Lam. seed against *Daphnia magna* Straus. and *Artemia salina* Lench.** 2014. 80 f. Dissertation (Masters in Environmental Science and Technology) – Graduate Program in Environmental Science and Technology, Federal Technological University of Paraná, Curitiba, 2014.

The use of natural coagulants for water treatment has been an alternative increasingly employed in order to avoid possible damage to health and the environment caused by certain chemical coagulants. *Moringa oleifera* is a multipurpose tree whose seeds have an efficient activity as natural coagulant. However, studies point to a possible toxicity of this extract. Based on this, the objective of this study was to evaluate the toxicity of three different extracts of *M. oleifera* (aqueous extract, saline extract of the whole seed and saline extract of the seed without oil) and water treated with the same extracts, against two species of microcrustaceans used as bioindicators of toxicity (*Artemia salina* and *Daphnia magna*). In acute toxicity tests of the extracts using *D. magna*, there was an EC50 of 314.05 mg.L⁻¹ for the saline extract of the whole seed and 346.76 mg.L⁻¹ for the saline extract of the seed without oil. The aqueous extract showed no toxicity even at the highest concentrations (400 to 600 mg.L⁻¹). For the organism *A. salina*, none of the extracts proved toxic. In the tests performed with water treated with the extracts of *M. oleifera*, toxicity was found for *D. magna* in the supernatant fractions (EC50=296.02 mg.L⁻¹) and sedimented (EC50=291.04 mg.L⁻¹) of treated water with the saline extract of the whole seed. For the treated water with the saline extract of the seed without oil, was found toxicity in the supernatant fraction (EC50=351.17 mg.L⁻¹) and the sedimented fraction (EC50=342.32 mg.L⁻¹), which indicates that the toxicity of the extract is not reduced after coagulation/flocculation. In the chronic test performed using *D. magna* exposed during 21 days to the saline extract of the whole seed of *M. oleifera*, changes in the evaluated parameters (mortality, fertility and growth) were observed, and as higher the concentration tested, bigger was the toxicity. At the end of the 21 experimental days, there had been a 100% mortality of individuals exposed to higher concentrations (10 and 15 mg.L⁻¹). Furthermore, there was wide variation in fertility between the groups. Based on these results, we can say that the use of high concentrations of the extract of *M. oleifera* (above 300 mg.L⁻¹) can cause acute damage for *D. magna*. However in practice, the concentrations used of this coagulant are considerably smaller, ranging mainly between 50 and 150 mg.L⁻¹, according to literature data. Likewise, the dilution that occur in the aquatic environment, hardly provide high concentration of the extract in the water bodies. Based on this, we can say that the use of the extract of *M. oleifera* can be encouraged, but if used with caution, avoiding high concentrations.

Keywords: Natural coagulants. Ecotoxicity. Water treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: MORINGA OLEIFERA, ÁRVORE FRUTIFICADA (A), FLORES (B), FOLHAS (C) E SEMENTES (D).....	17
FIGURA 2: DAPHNIA MAGNA STRAUS.	25
FIGURA 3: DIFERENÇA ENTRE OS SEXOS EM <i>D. MAGNA</i> . MACHO (ESQUERDA) E FÊMEA (DIREITA).	26
FIGURA 4: EFÍPIO EM <i>D. MAGNA</i>	26
FIGURA 5: CISTOS (A), CISTOS EM ECLOSÃO (B) E NÁUPLIOS (C) DE <i>A. SALINA</i>	27
FIGURA 6: ESQUEMA DAS ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.	35
FIGURA 7: ESQUEMA DO PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>M. OLEIFERA</i>	36
FIGURA 8: LOTES COM MATRIZES DE <i>D. MAGNA</i> E FILHOTES EM BÉQUERES MENORES SEPARADOS PARA REALIZAÇÃO DE TESTES.	38
FIGURA 9: ESQUEMA DO BIOENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA DOS EXTRATOS DE <i>M. OLEIFERA</i> COM <i>D. MAGNA</i> OBSERVAÇÃO: FORAM TESTADOS 20 ORGANISMOS POR BÉQUER.	39
FIGURA 10: ESQUEMA DO BIOENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA DOS EXTRATOS DE <i>M. OLEIFERA</i> COM <i>A. SALINA</i> . OBSERVAÇÃO: FORAM UTILIZADOS 10 ORGANISMOS POR POÇO.	41
FIGURA 11: ESQUEMA DO BIOENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA (21 DIAS) DOS EXTRATOS DE <i>M.</i> <i>OLEIFERA</i> . OBSERVAÇÃO: FOI UTILIZADO 1 ORGANISMO POR BÉQUER.	42
FIGURA 12: ESQUEMA DO JAR TEST PARA OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA COM EXTRATOS DE <i>M. OLEIFERA</i>	45
FIGURA 13: ESQUEMA DO BIOENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA DA ÁGUA TRATADA COM EXTRATOS DE <i>M. OLEIFERA</i> UTILIZANDO <i>D. MAGNA</i> . SN: SOBRENADANTE, SD: SEDIMENTADO. OBSERVAÇÃO: FORAM UTILIZADOS 20 ORGANISMOS POR BÉQUER.	45
FIGURA 14: MORTALIDADE DE INDIVÍDUOS DE <i>D. MAGNA</i> CAUSADA PELO EXTRATO SALINO DE <i>M.</i> <i>OLEIFERA</i> EM TESTE CRÔNICO. NÚMERO INICIAL DE INDIVÍDUOS POR CONCENTRAÇÃO: 10. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM AUSÊNCIA DE DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS VALORES E LETRAS DIFERENTES SIGNIFICAM DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA.	52
FIGURA 15: SOBREVIVÊNCIA DE ORGANISMOS DE <i>D. MAGNA</i> EXPOSTOS AO EXTRATO SALINO DE <i>M. OLEIFERA</i> DURANTE TESTE CRÔNICO. NÚMERO INICIAL DE INDIVÍDUOS POR CONCENTRAÇÃO: 10.	53
FIGURA 16: NÚMERO DE POSTURAS DAS MATRIZES DE <i>D. MAGNA</i> EXPOSTAS DURANTE TESTE CRÔNICO AO EXTRATO SALINO DE <i>M. OLEIFERA</i> . NÚMERO INICIAL DE INDIVÍDUOS POR CONCENTRAÇÃO: 10. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM AUSÊNCIA DE DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS VALORES E LETRAS DIFERENTES SIGNIFICAM DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA.	54
FIGURA 17: NÚMERO TOTAL DE FILHOTES PRODUZIDOS POR MATRIZES DE <i>D. MAGNA</i> EXPOSTAS DURANTE TESTE CRÔNICO A EXTRATO SALINO DE <i>M. OLEIFERA</i> . NÚMERO INICIAL DE INDIVÍDUOS POR CONCENTRAÇÃO: 10. LETRAS IGUAIS SIGNIFICAM AUSÊNCIA DE DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE OS VALORES E LETRAS DIFERENTES SIGNIFICAM DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA.	55
FIGURA 18: CRESCIMENTO DE INDIVÍDUOS DE <i>D. MAGNA</i> APÓS EXPOSIÇÃO AO EXTRATO SALINO DE <i>M. OLEIFERA</i> DURANTE TESTE CRÔNICO. NAS CONCENTRAÇÕES DE 10 E 15 MG.L-1 NÃO HOVERAM SOBREVIVENTES.	56
FIGURA 19: ENSAIOS DE COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO/SEDIMENTAÇÃO EM JAR TEST	63
FIGURA 20: CARTA CONTROLE PARA MONITORAMENTO DA SENSIBILIDADE DE <i>D. MAGNA</i> , UTILIZANDO KCL COMO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA, NO PERÍODO DE MAIO A DEZEMBRO DE 2013. DP: DESVIO PADRÃO (-) NEGATIVO E (+) POSITIVO.	64

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1- TEMPOS E VELOCIDADES DE MISTURA RÁPIDA E LENTA.....	44
TABELA 2 - VALORES DOS COEFICIENTES DE VARIAÇÃO (CV) E CE50 DOS ENSAIOS REALIZADOS COM D. MAGNA.....	48
TABELA 3 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA BRUTA COLETADA NA REPRESA DO RIO PASSAÚNA.....	60
TABELA 4 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA TRATADA COM 250 MG.L ⁻¹ , 350 MG.L ⁻¹ E 450 MG.L ⁻¹ DO EXTRATO SALINO DA SEMENTE INTEGRAL DE M. OLEIFERA	61
QUADRO 1 - SOLUÇÕES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO E ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA D. MAGNA	76
QUADRO 2 - VOLUME DAS SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO MEIO DE CULTIVO PARA D. MAGNA..	77
QUADRO 3 - VOLUME DAS SOLUÇÕES PARA PREPARO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA D. MAGNA	78
QUADRO 4 - VOLUMES DA SOLUÇÃO INICIAL PARA PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO BIOENSAIO DE SENSIBILIDADE PARA D. MAGNA	79
QUADRO 5 - VOLUMES DA SOLUÇÃO INICIAL PARA PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO BIOENSAIO DE SENSIBILIDADE PARA A. SALINA.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CE50	Concentração mediana responsável pela imobilidade de 50% dos organismos testados
CENO	Maior concentração na qual não se observa efeito nos organismos testados
CEO	Menor concentração na qual se observa efeito nos organismos testados
CL50	Concentração mediana responsável pela letalidade de 50% dos organismos testados
CV	Coeficiente de variação
°C	Graus Celsius
DP+	Desvio padrão positivo
DP-	Desvio padrão negativo
DSS	Dodecil sulfato de sódio
ETA	Estação de Tratamento de Água
g	Gramas
g.kg ⁻¹	Gramas por quilograma
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Unidade de massa atômica – K Daltons
kg	Quilograma
L	Litro
m	Metro
M	Molar
m.m ⁻¹	Massa/Massa
mg	Miligrama
mg.L ⁻¹	Miligrama por litro
mg.kg ⁻¹	Miligrama por quilograma
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
microEqv.L ⁻¹	Micro equivalente por litro – Unidade de Alcalinidade

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{mol.g}^{-1}$	Micromol por grama
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
p	Valor de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RPM	Rotações por minuto
S	Desvio padrão
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFS	Universidade Federal de Sergipe
uH	Unidade Hazen – Unidade de Cor
US\$	Dólar
uT	Unidade de turbidez
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Comprimento de onda Ultravioleta
X	Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 COAGULANTES ALTERNATIVOS	16
3.2 <i>Moringa oleifera</i> LAM.	17
3.3 ECOTOXICOLOGIA	21
3.3.1 Testes Agudos e Crônicos	22
3.3.2 <i>Daphnia magna</i> Straus	25
3.3.3 <i>Artemia salina</i> Lench	27
3.4 TOXICIDADE DE <i>Moringa oleifera</i>	29
3.5 TRATAMENTO DE ÁGUA CONVENCIONAL	31
4 METODOLOGIA	35
4.1 PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>M. oleifera</i>	35
4.1.1 Extrato Aquoso	36
4.1.2 Extrato Salino da Semente Integral	37
4.1.3 Extrato Salino da Semente Sem Óleo	37
4.2 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO BRUTO	37
4.2.1 Toxicidade Aguda do Extrato Bruto Utilizando <i>D. magna</i>	37
4.2.2 Toxicidade Aguda do Extrato Bruto Utilizando <i>A. salina</i>	40
4.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DO EXTRATO BRUTO	41
4.3.1 Toxicidade Crônica do Extrato Bruto Utilizando <i>D. magna</i>	41
4.4 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA DA ÁGUA TRATADA COM OS EXTRATOS DE <i>M. oleifera</i>	43
4.4.1 Água Bruta	43
4.4.2 Ensaio de Coagulação/Floculação/Sedimentação	44
4.4.3 Toxicidade Aguda da Água Tratada com os Extratos de <i>M. oleifera</i> utilizando <i>D. magna</i>	44
4.5 TESTES COM SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA	46
4.5.1 Controle de Sensibilidade para <i>D. magna</i>	46
4.5.2 Controle de Sensibilidade para <i>A. salina</i>	47
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	48
5.1 TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO BRUTO	48
5.1.1 Toxicidade Aguda do Extrato Bruto para <i>D. magna</i>	48
5.1.2 Toxicidade Aguda do Extrato Bruto para <i>A. salina</i>	50
5.2 TOXICIDADE CRÔNICA DO EXTRATO BRUTO	50
5.2.1 Toxicidade Crônica do Extrato de <i>M. oleifera</i> frente à <i>D. magna</i>	51
5.2.1.1 Mortalidade	51
5.2.1.2 Fecundidade	53
5.2.1.3 Crescimento	55
5.2.2 Mecanismos de Toxicidade Propostos	56

5.3 TOXICIDADE AGUDA DA ÁGUA TRATADA COM OS EXTRATOS DE <i>M. oleifera</i> .	60
5.3.1 Caracterização Físico-Química da Água Bruta	60
5.3.2 Caracterização Físico-Química da Água Tratada com os Extratos de <i>M. oleifera</i> .	61
5.3.3 Toxicidade Aguda da Água Tratada com Extratos de <i>M. oleifera</i> utilizando <i>D. magna</i>	62
5.4 CARTA CONTROLE PARA MONITORAMENTO DE SENSIBILIDADE EM <i>D. magna</i>	64
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
6.1 RECOMENDAÇÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de água convencional ou de ciclo completo vem recebendo críticas nas últimas décadas devido à sua incapacidade de fornecer água de qualidade à população em algumas situações. Entre os principais motivos estão técnicas ineficientes de tratamento e a deterioração dos corpos hídricos (ACHON, 2008). Durante a etapa de coagulação/floculação são utilizados diferentes compostos químicos que, em determinadas situações, deixam substâncias residuais na água e no lodo. Um exemplo disso é o sulfato de alumínio, um dos coagulantes químicos mais utilizados nas Estações de Tratamento de Água (ETA) do país. O alumínio residual que está presente na água de abastecimento devido à utilização de sais de alumínio na coagulação vem levantando dúvidas sobre possíveis efeitos na saúde humana. Este alumínio residual tem sido objeto de estudo de diversos trabalhos por estar frequentemente associado ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer (McLACHLAN, 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998; BERGAMASCO et al., 2009; ROSALINO, 2011). Além disso, quando não há disposição correta do lodo das ETAs, o alumínio residual presente neste lodo acaba por retornar aos corpos hídricos agravando o problema da poluição.

Visando evitar estes possíveis danos, diversos coagulantes alternativos vêm sendo pesquisados no mundo todo, com o objetivo de serem utilizados como coagulantes principais ou auxiliares de coagulação. Dentro desta classe, estão os coagulantes naturais, que podem ser tanto de origem animal, como a quitosana, quanto de origem vegetal. Os coagulantes vegetais apresentam muitas vantagens, entre elas o baixo custo, a elevada biodegradabilidade, o pH que não sofre alterações extremas e a possibilidade de produção em larga escala (YIN, 2010).

O extrato da semente de *Moringa oleifera* tem sido estudado como um eficiente coagulante natural (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; OKUDA et al., 2000; GHEBREMICHAEL et al., 2005; PRITCHARD et al., 2010). Em comparação aos coagulantes químicos, o uso do extrato da semente de *M. oleifera* no tratamento de água, não necessita de ajuste do pH e alcalinidade da mesma e, também, não causa problemas de corrosividade, além de produzir menos lodo, que por sua vez, não apresenta riscos à saúde ou ao meio ambiente (NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998).

Entretanto, diversos trabalhos alertam para a possibilidade de toxicidade da *M. oleifera*. Estudos foram realizados com diferentes partes da planta, sendo encontrada nas sementes substâncias com capacidade antifúngica, antimicrobiana, inseticida, larvicida e repelente (CHUANG et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; PAIVA et al., 2011; PRABHU et al., 2011; ROCHA et al. 2011). Além disso, estudos realizados com o extrato da semente alertaram para a toxicidade em peixes (GRABOW et al., 1985; KAVITHA et al., 2012). Nestas pesquisas, foram observadas alterações bioquímicas, hematológicas e comportamentais nos organismos testados.

Devido à presença de substâncias potencialmente tóxicas no extrato das sementes de *M. oleifera*, os estudos de ecotoxicidade justificam-se por permitirem uma melhor compreensão do risco de utilização deste coagulante no tratamento de água. Estudos ecotoxicológicos geralmente envolvem várias classes de organismos, de diferentes níveis tróficos, para que seja possível ter uma visão sistêmica dos danos que a substância em questão poderia causar ao meio ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Na literatura, são escassos os estudos sobre a ecotoxicidade do extrato da semente de *M. oleifera*. Os trabalhos encontrados estão praticamente restritos a peixes, deixando à parte os outros níveis tróficos dos ecossistemas aquáticos. Os microcrustáceos, entre eles os cladóceros, são um importante elo na cadeia alimentar por servirem de alimento a peixes pequenos e por promoverem o controle populacional de algas através da alimentação. Baseando-se nisso, o presente trabalho objetivou avaliar uma importante classe de organismos, que até então não havia sido estudada. Para isto, foram testados três diferentes extratos de *M. oleifera* frente aos organismos *Daphnia magna* e *Artemia salina*, reconhecidos microcrustáceos bioindicadores de ecotoxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar a possível ocorrência de toxicidade em três diferentes extratos das sementes de *Moringa oleifera* utilizando os organismos *Daphnia magna* e *Artemia salina*;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos da semente de *Moringa oleifera* frente aos organismos *Daphnia magna* e *Artemia salina*;

- Verificar se há diferença na toxicidade entre os extratos de *Moringa oleifera* avaliados;

- Avaliar a toxicidade crônica dos extratos de *Moringa oleifera* frente ao organismo *Daphnia magna*;

- Avaliar a toxicidade aguda da água tratada pelos processos de coagulação/floculação com os extratos de *Moringa oleifera* frente ao organismo *Daphnia magna*;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 COAGULANTES ALTERNATIVOS

Atualmente, um grande número de estudos vem sendo desenvolvido a fim de minimizar a formação de subprodutos tóxicos no tratamento de água, assim como a redução do volume e da toxicidade do lodo gerado. Uma das principais correntes com esse propósito é a pesquisa de coagulantes naturais ou alternativos. As principais vantagens desses coagulantes, principalmente os de origem vegetal, são o baixo custo, a elevada biodegradabilidade, o pH que não sofre variações extremas e a possibilidade de produção em larga escala (YIN, 2010).

O extrato da semente de *M. oleifera* tem sido estudado como um eficiente coagulante natural (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; OKUDA et al., 2000; GHEBREMICHAEL et al., 2005; PRITCHARD et al., 2010). Esse extrato pode ser utilizado como um coagulante primário ou auxiliar de coagulação (MUYIBI; EVISON, 1995). Somando-se à remoção de turbidez, a coagulação com *M. oleifera* pode promover a redução de *Escherichia coli* em cerca de 97% (PRITCHARD et al., 2010).

Além do extrato da semente de *M. oleifera*, amplamente estudado (MUYIBI; EVISON, 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998; OKUDA et al., 2000; GHEBREMICHAEL et al., 2005; KALAVATHY; MIRANDA, 2010; PRITCHARD et al., 2010), diversos outros coagulantes naturais vêm sendo pesquisados e testados com eficiência em vários países, como o *Cactus latifaria* e a semente de *Prosopis juliflora*, ambas plantas nativas da Venezuela (DIAZ et al., 1999), sementes e pólen de palmeiras no Iraque (AL-SAMERAIY, 2012), quitosana sintetizada a partir da desacetilação da quitina de crustáceos (BERGAMASCO et al., 2009), sementes de nirmali (*Strychnospotatorum*) (YIN, 2010) e taninos vegetais (ÖZACAR; SENGIL, 2000; 2003; BELTRÁN-HEREDIA; SÁNCHEZ-MARTÍN; SOLERA-HERNÁNDEZ, 2010; SÁNCHEZ-MARTÍN; GONZÁLEZ-VELASCO; BELTRÁN-HEREDIA, 2010; BELTRÁN-HEREDIA; SÁNCHEZ-MARTÍN; DÁVILA-ACEDO, 2011).

3.2 *Moringa oleifera* LAM.

A *M. oleifera* Lam. é uma árvore tropical cujas sementes contêm uma substância solúvel em água e com propriedades coagulantes (MUYIBI; EVISON, 1995; NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; RAMOS, 2005) (Figura 1). No Brasil, é uma espécie já cultivada em várias regiões, sendo bastante popular no nordeste devido à sua utilização como uma solução alternativa para clarificação de água para abastecimento em zonas rurais (BORBA, 2001). A *M. oleifera* é uma espécie pantropical originária do Noroeste da Índia e apresenta rápido crescimento até mesmo em solos medianos com umidade relativamente baixa, podendo atingir até 10 m de altura (JAHN¹, 1991 *apud* NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; RAMOS, 2005).



**Figura 1: *Moringa oleifera*, árvore frutificada (A), flores (B), folhas (C) e sementes (D).
Fonte: www.tree-nation.com (Consultado em 03/06/2012)**

O mecanismo de coagulação de *M. oleifera* foi elucidado por Ndabigengesere, Narasiah e Talbot em 1995. Neste trabalho sugeriu-se que os agentes de coagulação seriam proteínas catiônicas diméricas com massa molecular de 12-14 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 10 e 11, sendo o seu principal mecanismo

¹JAHN, S. A. A. The traditional domestication of a multipurpose tree *Moringa tenopetala* in Ethiopian Rift Valley. **Ambio**, v.20, p. 244-247. 1991.

de coagulação a adsorção e neutralização de cargas. Entretanto, não há um consenso entre os pesquisadores, e atualmente existem diversos mecanismos alternativos de coagulação e de agentes coagulantes propostos para a *M. oleifera* (YIN, 2010). Okuda et al. (2000), por exemplo, obtiveram resultados que demonstravam que o agente coagulante presente em um extrato obtido por solução salina, seria um polieletrólito orgânico.

Ndabigengesere, Narasiah e Talbot (1995) testaram ainda o potencial de extração do agente coagulante da *M. oleifera* com diferentes solventes (água, éter, acetona, clorofórmio e hexano), sendo a água o solvente que apresentou maior potencial de extração. Desde então, a técnica comumente utilizada para a obtenção do extrato da semente de *M. oleifera* é a solução aquosa. Nesse processo, as sementes sem cascas são trituradas e homogeneizadas em água destilada (CARDOSO, 2007; ZABLONSKI, 2012). Outra técnica que vem mostrando resultados promissores, sendo estes superiores à extração aquosa, é a extração por solução salina, utilizando-se principalmente cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) (OKUDA et al., 2000; MADRONA et al., 2010). Entre as principais vantagens da extração salina, pode-se citar: não incremento de matéria orgânica após a coagulação, maiores índices de remoção de cor e turbidez e eficiência até mesmo em águas de baixa turbidez. Ambas as formas de extração podem ser seguidas ou não de purificação (YIN, 2010).

Em comparação com os coagulantes químicos, o uso do extrato da semente de *M. oleifera* no tratamento de água não necessita do ajuste do pH e alcalinidade da mesma e, também, não causa problemas de corrosividade, além de produzir menos lodo (NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998). Entretanto, o seu uso requer alguns cuidados. Recomenda-se que seja realizada a purificação do extrato a fim de evitar o incremento de matéria orgânica na água tratada, que resulta em odor, cor e sabor, além da capacidade de gerar trihalometanos a partir da reação com cloro (NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998). Outra alternativa consiste na aplicação de um pós-tratamento eficiente para polimento da água tratada, podendo ser utilizado o processo de separação por membranas.

Alguns estudos apontam que, apesar de apresentar alta eficiência na coagulação, o uso do extrato de *M. oleifera* pode não ser tão eficaz quanto os coagulantes com ferro e alumínio, como mostram os resultados de Pritchard et al. (2010). Entretanto, o extrato das sementes de *M. oleifera* possui capacidade de

remoção suficientemente alta para que seu uso seja encorajado em países subdesenvolvidos, que apresentam problemas com o tratamento de água, principalmente devido ao elevado custo com os produtos químicos. Além disso, há a questão da não adição de substâncias químicas que possam deixar residuais na água e no lodo.

Outra aplicação conhecida da espécie *M. oleifera* no tratamento de água, é o uso da madeira para produção de carbono ativado com fins de remoção de metais pesados, como cobre, níquel e zinco (KALAVATHY; MIRANDA, 2010).

Existem diversos parâmetros que podem afetar a eficiência de remoção de turbidez pelo extrato das sementes de *M. oleifera*. Katayon et al. (2006) testaram a eficiência do extrato sob diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e sob refrigeração em recipientes abertos e fechados) e tempo (um a cinco meses), variando a turbidez inicial da água (50 a 300 uT). O estudo apontou que o extrato armazenado por até um mês apresenta os melhores valores de remoção de turbidez, enquanto o armazenamento por até cinco meses ocasiona o aumento da turbidez residual, o que resulta em menor eficiência de remoção de turbidez. Em relação às condições de armazenamento (temperatura ambiente e sob refrigeração em recipientes abertos e fechados), não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Pritchard et al. (2010) também avaliaram os fatores que influenciam a eficiência da coagulação com *M. oleifera*. O principal parâmetro foi a turbidez inicial, sendo diretamente proporcional à eficiência da coagulação, apresentando pouca remoção de turbidez em águas de baixa turbidez.

A faixa de pH ideal da água para o tratamento com *M. oleifera*, gira em torno de 6,5, proporcionando valores de remoção de turbidez acima de 80% (PRITCHARD et al., 2010). Quanto mais próximo dos extremos de pH, menor é a remoção.

A temperatura também exerce grande influência, em geral, quanto maior a temperatura, maiores os valores de remoção de turbidez (entre 30 e 37°C) (PRITCHARD et al., 2010). Sob baixas temperaturas é necessário prolongar o tempo de mistura lenta ou aumentar a concentração de coagulante requerida para aumentar o potencial de coagulação.

O tempo de vida das sementes também foi avaliado afim de verificar a viabilidade de uso das sementes após a colheita. Para isto, foram testadas sementes com idades que variaram entre 12 e 24 meses. As sementes de 12 meses

apresentaram uma ampla faixa de concentração ótima do extrato para remoção de turbidez, enquanto as sementes de 18 meses apresentaram uma faixa de concentração ótima de extrato mais estreita, porém com melhores eficiências de remoção de turbidez (PRITCHARD et al., 2010). Na prática, isto significa que para sementes de 12 meses é possível utilizar uma faixa mais ampla de concentração do extrato para atingir os mesmos valores de remoção de turbidez. Já nas sementes de 18 meses, esta faixa de concentração é mais estreita, porém atingindo eficiências maiores que as sementes de 12 meses. Por sua vez, as sementes de 24 meses apresentam eficiência significativamente menor, ocasionando o aumento da turbidez residual (PRITCHARD et al., 2010).

Ainda de acordo com Pritchard et al. (2010), uma árvore não cultivada pode produzir cerca de 2000 sementes por ano, com capacidade de purificar aproximadamente 6000 L de água a partir de uma concentração de 50 mg.L⁻¹ de coagulante, tendo como base um peso médio por semente de 150 mg. Em condições ideais de cultivo, a produção de sementes pode aumentar de 5 a 10 vezes. Além das sementes, as bainhas e folhas podem ser utilizadas na alimentação tanto animal quanto humana, apresentando elevadas quantidades de proteínas, vitaminas e minerais.

Segundo Katayon et al. (2006) o custo de cultivo para produção de 1 kg de sementes de *M. oleifera* (aproximadamente 3400 unidades) é de aproximadamente US\$2. Em comparação com o custo de produção do alumínio (aproximadamente US\$ 1 por 1 kg), a *M. oleifera* pode ser considerada mais cara, porém apresenta maiores benefícios em relação à saúde e economia. Como a espécie pode ser utilizada para múltiplos fins, como a alimentação, o custo da produção pode ser dividido entre múltiplos setores, o que viabilizaria a sua produção em larga escala.

A *M. oleifera* possui inúmeros usos populares devido às suas aplicações nutricionais e propriedades farmacológicas. Na Ásia, suas folhas, flores e vagens são geralmente consumidas como vegetais. De acordo com Ferreira et al. (2008) todas as suas partes são fontes de compostos fenólicos, β -caroteno, vitamina C e proteínas totais, inclusive os aminoácidos essenciais sulfurados metionina e cisteína. Os conteúdos de proteínas e óleo nas sementes de *M. oleifera* são mais elevados que aqueles encontrados em legumes e em algumas variedades de soja, respectivamente. Ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oléico, carboidratos e minerais estão presentes nas sementes em quantidades razoáveis.

No geral, a planta possui baixas concentrações de fatores antinutricionais, embora as sementes possuam glucosinolatos ($65,5\mu\text{mol.g}^{-1}$), fitatos (41g.kg^{-1}) e atividade hemaglutinante, enquanto as folhas possuem consideráveis quantidades de saponinas (80g.kg^{-1}), além de fitatos (21g.kg^{-1}) e taninos (12g.kg^{-1}) (FERREIRA et al., 2008).

3.3 ECOTOXICOLOGIA

Nas últimas décadas, a sociedade vem produzindo, utilizando e descartando uma imensa variedade de substâncias químicas no meio ambiente. Muitas destas substâncias são utilizadas sem que estudos ecotoxicológicos tenham sido desenvolvidos. O conhecimento da toxicidade de substâncias a diferentes organismos aquáticos possibilita o estabelecimento de limites permissíveis de emissão e avaliação do impacto que estes compostos causam à biota dos corpos hídricos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico é avaliada por meio de ensaios ecotoxicológicos. Os organismos utilizados nestes ensaios devem ser representativos do ambiente, comprovadamente sensíveis ao agente estudado, o teste deve ser o mais realístico possível, de fácil realização e baixo custo, os resultados devem ser facilmente quantificáveis através de interpolação gráfica e análise estatística para que os resultados obtidos nos testes laboratoriais possam prever com a maior exatidão o possível efeito desse agente no meio ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O termo “ecotoxicologia” foi cunhado no início de 1970 pelo toxicologista francês, Professor René Truhaut, que o definiu como um ramo da toxicologia responsável pelo estudo de efeitos adversos causados por poluentes naturais ou sintéticos à biota aquática e terrestre (DEVILLERS, 2009). Além disso, a ecotoxicologia aborda a investigação de como e em que nível os organismos são afetados pela exposição a estes poluentes, assim como o estudo da maneira como esses compostos químicos são lançados no ambiente, transportados entre os diferentes compartimentos da biosfera, e transformados através de processos bióticos e abióticos (DEVILLERS, 2009).

Em geral, o termo Toxicologia Ambiental é utilizado nos estudos que abordam os efeitos das substâncias químicas sobre os seres vivos individualmente.

Já o termo Ecotoxicologia é usado nos estudos dos efeitos destes compostos sobre populações e seu comportamentos nos ecossistemas (CHASIN; PEDROSO, 2003).

Nos ensaios desenvolvidos em laboratório, podem ser utilizados diferentes organismos, sendo as algas, microcrustáceos e peixes os mais comuns. Embora sejam utilizadas diferentes espécies, as condições básicas são semelhantes e requerem condições ambientais específicas como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza da água e fotoperíodo. Nesses ensaios, os organismos-teste são expostos a várias concentrações da amostra a ser testada por determinado período de tempo. Em todos os ensaios são utilizados frascos-controle (controle negativo), nos quais se avalia a viabilidade do lote de organismos expostos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Após o período de teste verificam-se os efeitos da amostra sobre alguns parâmetros biológicos, como mortalidade, mobilidade, crescimento, reprodução, comportamento, entre outros.

3.3.1 Testes Agudos e Crônicos

Os ensaios podem avaliar a toxicidade aguda e crônica, dependendo das condições e do tempo de duração do teste. Os ensaios de toxicidade aguda podem ser definidos como aqueles que avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo, que varia de acordo com o organismo-teste (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (BIRGE et al., 1985).

Nos ensaios de toxicidade aguda usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade (principalmente para peixes) e imobilidade (principalmente para invertebrados). Esses critérios são utilizados por serem facilmente determinados e apresentarem significado biológico e ecológico para o ambiente (VAN LEEUWEN, 1988).

Em ensaios de toxicidade aguda, a partir dos resultados obtidos, pode-se calcular a concentração mediana que causa efeito adverso em 50% dos organismos testados durante um período de tempo predeterminado. Geralmente, para invertebrados, calcula-se a CE50, concentração mediana efetiva que imobiliza 50%

dos organismos-teste, e para peixes calcula-se a CL50, concentração mediana letal a 50% dos organismos testados. Utiliza-se o nível de efeito de 50% porque é a resposta mais reprodutível e pode ser estimada com maior confiança (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). A CL50 e a CE50 são expressas em termos de concentração da substância-teste e tempo de duração do teste.

No ambiente aquático, devido a fatores de diluição, em geral, os organismos estão expostos a níveis subletais dos agentes químicos. Esta forma de exposição dificilmente leva à morte do organismo, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Os testes crônicos avaliam essa forma de exposição, identificando e analisando os efeitos adversos mais sutis aos organismos.

Os testes crônicos podem ser divididos em: testes com todo o ciclo de vida de uma espécie, testes com parte do ciclo de vida de uma espécie (quando geralmente se utilizam os estágios de vida mais sensíveis ou críticos da espécie) e os testes funcionais nos quais são feitas as medidas dos efeitos do agente sobre funções fisiológicas específicas, como a reprodução (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Nos testes de toxicidade aguda e crônica, utilizam-se organismos nas fases mais sensíveis do seu ciclo de vida, como por exemplo, os estágios larvais ou embrionários. Deste modo, um contaminante que não apresente toxicidade na fase mais sensível do organismo, provavelmente não o causará nas demais fases do seu ciclo de vida (EPA, 2002).

Os ensaios de toxicidade crônica mais difundidos mundialmente são os testes com *Daphnia*, com duração de 21 dias, e com *Ceriodaphnia*, de 7 dias de duração. Este último tem sido utilizado para avaliação de toxicidade crônica de amostras ambientais (águas e efluentes líquidos), enquanto o teste com *Daphnia* é mais utilizado para avaliação da toxicidade de novas formulações químicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Em ensaios de toxicidade crônica, os efeitos avaliados são, em geral, sobrevivência e reprodução para invertebrados, enquanto para peixes observa-se a sobrevivência e a redução no crescimento, por meio do peso seco ou comprimento dos organismos-teste. No caso de testes embriolarvais com peixes, pode-se observar a porcentagem de eclosão dos ovos (EPA, 2002).

Ao final de um ensaio de toxicidade crônica estimam-se os efeitos de uma substância na reprodução, no crescimento e/ou na sobrevivência de uma espécie por um período prolongado de tempo. Com este tipo de teste, são calculadas a maior concentração que não causa efeito deletério aos organismos-teste (CENO) e a menor concentração que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos teste (CEO). O valor crônico é obtido pela média geométrica entre CEO e CENO (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Vários critérios têm sido utilizados para avaliar a “saúde” dos organismos e as condições de ensaios, como a taxa de reprodução e sobrevivência dos organismos em cultura e em testes, sobrevivência dos mesmos nos tratamentos-controle, presença de formas resistentes (cistos) nas culturas, teor de lipídeos nos organismos (GOULDEN et al., 1982) e uso de substâncias de referência para avaliação da sensibilidade do lote de organismos utilizados nos testes.

Substâncias de referência são utilizadas para avaliar as condições de “saúde” e sensibilidade dos organismos-teste. A realização periódica de testes de sensibilidade garante a obtenção de resultados comparáveis, isto é, que apresentem boa repetibilidade e reprodutibilidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Outra análise que pode ser realizada a fim de garantir a confiabilidade dos testes é o cálculo do coeficiente de variação (CV) (Equação 1). Esta medida avalia a variabilidade dos resultados obtidos, e de uma forma geral, um método ecotoxicológico é considerado bom, quando a variação dos resultados, expressa pelo CV, for \leq a 30% (ENVIRONMENTAL CANADA, 1990).

(1)

$$CV = \frac{S}{X} \cdot 100$$

Em que:

CV = coeficiente de variação

S = desvio padrão

X = média

3.3.2 *Daphnia magna* Straus.

Cladóceros são um grupo constituído por 8 ordens de branquiópodos de pequeno tamanho, 15 famílias, cerca de 80 gêneros e aproximadamente 400 espécies (DODSON; FREY, 2001). São conhecidos oito gêneros ao redor do mundo que compõe a Família Daphniidae, a qual a espécie *Daphnia magna* pertence (Figura 2).

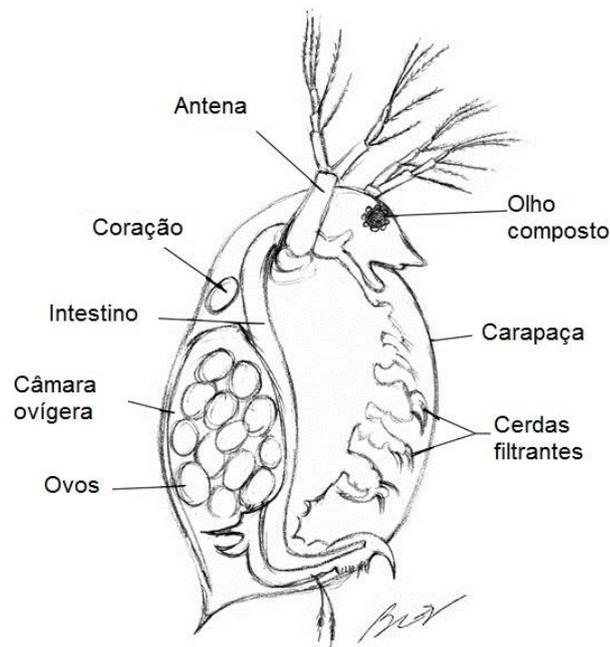


Figura 2: *Daphnia magna* Straus.
Fonte: adaptado de Rupert e Barnes, 1996.

As espécies do gênero *Daphnia*, também conhecidas como pulgas d'água, são microcrustáceos de água doce com hábito filtrador. Medem de 0,5 a 5,0 mm de comprimento e possuem uma carapaça bivalve que encerra todo o corpo, com exceção da cabeça e antenas. O primeiro par de antenas é geralmente não segmentado e pequeno, e possui função quimiosensorial. O segundo par é desenvolvido e usado para natação (DODSON; FREY, 2001).

Os cladóceros, grupo ao qual o gênero *Daphnia* pertence, reproduzem-se assexuadamente por partenogênese, sendo que a população constitui-se basicamente de fêmeas (RUPERT; BARNES, 1996). Os machos são facilmente reconhecidos por serem menores que as fêmeas. Os cladóceros incubam seus ovos dorsalmente por baixo da carapaça. O desenvolvimento é direto e os jovens são liberados da câmara incubatória por meio da flexão ventral do pós-abdômen da

fêmea. Nos cladóceros, os ovos diplóides partenogenéticos eclodem em fêmeas por várias gerações. Determinados fatores, como alteração na temperatura da água ou redução do suprimento alimentar, induzem o aparecimento de machos e são produzidos ovos fertilizados (Figura 3). Os ovos fertilizados são grandes, e são só produzidos dois em uma ninhada. As paredes da câmara incubatória transformam-se em uma cápsula protetora em forma de sela, chamada efípio (Figura 4). Esta é descartada na próxima muda ou pode ou não permanecer com o resto do exoesqueleto descartado. Os efípios flutuam, afundam ou aderem a objetos podendo suportar o ressecamento e o congelamento e até a passagem pelo intestino de animais predadores. Os ovos de resistência podem eclodir rapidamente quando as condições ambientais necessárias encontram-se presentes. Quando essas condições são reestabelecidas, os ovos de efípios eclodem, liberando fêmeas que irão se reproduzir partenogeneticamente (RUPPERT; BARNES, 1996).

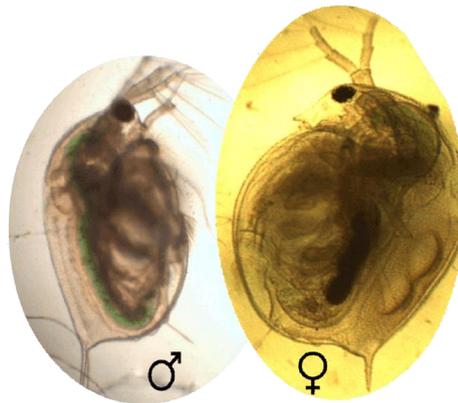


Figura 3: Diferença entre os sexos em *D. magna*. Macho (esquerda) e fêmea (direita).

Fonte: www.biology.ed.ac.uk (Consultado em 03/09/2013)



Figura 4: Efípio em *D. magna*.

Fonte: www.pubs.resc.org (Consultado em 03/09/2013)

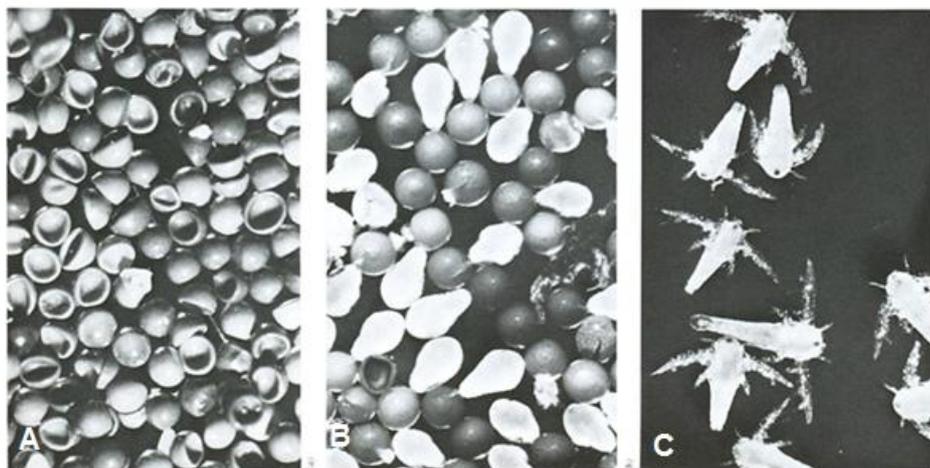
Cladóceros planctônicos, como o gênero *Daphnia*, são muito importantes no ecossistema aquático por controlarem a densidade populacional de algas através da regeneração de pastagem e nutrientes além de servir de alimento para peixes pequenos ou jovens (DODSON; FREY, 2001).

Segundo Knie e Lopes (2004), a escolha da *D. magna* como organismo-teste, fundamenta-se principalmente nos seguintes critérios:

- Os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura certa uniformidade de respostas nos ensaios;
- São organismos importantes dentro do ecossistema aquático;
- A cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes custos;
- O ciclo de vida e reprodução é suficientemente curto, o que permite a utilização destes organismos também em testes crônicos;
- A *D. magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em laboratórios ecotoxicológicos;

3.3.3 *Artemia salina* Lench.

O gênero *Artemia*, ordem Anostraca, classe Branchiopoda, apresenta o tronco composto de 11 a 18 segmentos com apêndices, carapaça ausente, olhos compostos com hastes e habitam ambientes salgados (RUPERT; BARNES, 1996) (Figura 5).



**Figura 5: Cistos (A), cistos em eclosão (B) e náuplios (C) de *A. salina*.
Fonte: Hentschel & Tata (1976)**

O status taxonômico do gênero *Artemia* tem sido muito discutido devido à variabilidade morfológica considerável existente dentro deste grupo. O consenso atual, é que existe uma única espécie cosmopolita, *Artemia salina*, com diversas cepas que variam fisiologicamente e morfológicamente entre si (PENNAK, 1989).

De acordo com a EPA (2002), as condições ambientais sob as quais a *A. salina* vive podem ser altamente variáveis. A salinidade pode ultrapassar 300‰, condição na qual a maior parte dos organismos é incapaz de sobreviver. Favorecidos pela ausência de predadores e de competição alimentar nestes ambientes, a *A. salina* desenvolve densas populações.

A temperatura ambiental ótima para *A. salina* gira em torno de 25 a 35°C, entretanto já foram reportados organismos vivendo em uma temperatura de 40°C. A maior parte das cepas não sobrevive a temperaturas inferiores à 6°C, com exceção dos cistos que podem suportar temperaturas muito abaixo de 0°C. Estes organismos também são capazes de sobreviver em uma ampla faixa de salinidade, que pode variar desde abaixo de 45‰ a acima de 200‰. A tolerância de pH varia entre neutro a altamente alcalino, sendo que o melhor porcentual de eclosão dos cistos ocorre em pH 8 ou superior (EPA, 2002).

A *A. salina* é um organismo filtrador que consome detritos orgânicos, algas e bactérias microscópicas. Ambientes eutrofizados onde ocorrem blooms algais são preferencialmente colonizados por cepas do gênero *Artemia*, que desenvolvem densas populações nestes locais (EPA, 2002). Em condições ambientais que permitem a existência de predadores, o gênero *Artemia* pode ser predado por zooplâncton, peixes, alguns grupos de insetos e pássaros (EPA, 2002).

Os cistos são formas de resistência que permanecem latentes enquanto estiverem desidratados. A partir do momento em que são hidratados, o embrião torna-se ativo dentro do cisto. Após algumas horas, surgem rupturas na membrana do cisto e o embrião emerge ainda preso à membrana. Quando o embrião liberta-se, emerge um náuplio com natação livre. O crescimento da larva passa por cerca de 15 mudas, tornando-se sexualmente diferenciado em macho ou fêmea na 10ª muda. Após a fecundação, os ovos fertilizados podem tanto se desenvolver diretamente em um náuplio com natação livre ou então ser recoberto por uma membrana grossa e depositados como cistos latentes (EPA, 2002).

A *A. salina* é largamente utilizada em testes laboratoriais devido principalmente à facilidade de manutenção e armazenagem, baixo custo e ampla

distribuição geográfica. Os cistos da espécie podem ser armazenados durante anos sob refrigeração e baixa umidade sem que percam o seu potencial de eclosão (VANHAECKE, 1981a, 1981b). Esta espécie é utilizada principalmente em estudos de toxicidade de extratos vegetais.

3.4 TOXICIDADE DE *Moringa oleifera*

Um dos primeiros estudos realizados com o objetivo de avaliar a toxicidade da *M. oleifera* foi realizado em 1985 por Grabow et al. Este trabalho utilizou diferentes modelos biológicos: peixes (*Poecilia reticulata*), protozoários (*Tetrahymena pyriformis*) e bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella sp*), além de avaliar os efeitos sobre a enzima acetilcolinesterase. Dentre os resultados, encontrou-se que concentrações equivalentes a 5 mg.L⁻¹ já eram capazes de afetar a taxa de consumo de oxigênio de *T. pyriformis*, 30 a 40 mg.L⁻¹ induziam padrões de locomoção anormais em *P. reticulata*, sendo a CL50 para este grupo de 196 mg.L⁻¹. Além disso, concentrações acima de 200 mg.L⁻¹ também foram capazes de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase. Apesar destes resultados, o extrato da semente de *M. oleifera* não foi considerado tóxico para humanos devido à natureza da contaminação e interações complexas que ocorrem no meio ambiente.

Após este estudo, outros foram desenvolvidos visando verificar a toxicidade de diversas partes da planta em diferentes organismos-teste. Adesina e Oguntuga (2009) estudaram a toxicidade crônica subletal do extrato aquoso da casca da raiz de *M. oleifera* sobre peixes juvenis (*Oreochromis niloticus*). Os autores analisaram os danos causados nas brânquias e, observaram o desenvolvimento de diferentes lesões, chegando até a sua completa degeneração.

Asare et al. (2012) avaliaram o potencial de toxicidade do extrato aquoso das folhas quando ingerido como nutracêutico em ratos. Apesar de ter sido encontrado um potencial citotóxico em concentrações acima de 20000 mg.L⁻¹, não foram comprovados danos hematológicos nos animais testados. Em razão disso, os autores consideram a ingestão segura, desde que seja mantida abaixo de 1000 mg/kg de peso corporal. Awodele et al. (2012) também avaliaram o efeito tóxico do extrato aquoso em ratos. Foi encontrada uma DL50 de 1585 mg.kg⁻¹, entretanto, não foram observadas diferenças significativas na qualidade do esperma e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos entre os ratos tratados com o extrato e os

do grupo controle. Desta forma, os autores afirmam que o extrato aquoso das folhas é relativamente seguro, desde que administrado oralmente.

Chuang et al. (2007) pesquisaram o potencial antifúngico do extrato das sementes e das folhas de *M. oleifera*. Os autores encontraram que tanto o extrato da semente quanto o óleo essencial das folhas apresentam atividade inibitória contra os fungos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium canis*. Entretanto, o extrato cru das folhas e suas frações mostraram-se pouco eficazes contra estes dermatófitos. Rocha et al. (2011) também encontraram atividade antifúngica do extrato das flores de *M. oleifera* frente à *Candida albicans* e *Microsporium canis*.

Paiva et al. (2011) avaliaram os efeitos de diferentes lectinas, entre elas a das sementes de *M. oleifera*, sobre cupins. Os autores encontraram que concentrações entre 1000 e 1500 mg.L⁻¹ do extrato das sementes de *M. oleifera* são ativas contra estes insetos. Nesta mesma linha, Prabhu et al. (2011) avaliaram o potencial larvicida e repelente da *M. oleifera* frente ao *Anopheles stephensi*, o mosquito vetor da Malária. O extrato metanólico da semente apresentou um elevado potencial contra as larvas e pupas do inseto, com concentrações que variaram entre 57,79 e 78,93 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de vida da larva. Para as pupas, a CL50 foi de 67,77 mg.L⁻¹. A atividade repelente também foi comprovada, sendo diretamente proporcional à concentração do extrato na solução.

Ferreira et al. (2009) avaliaram o potencial larvicida do extrato aquoso da semente frente ao mosquito *Aedes aegypti* e a toxicidade sobre ratos, camundongos e *Daphnia magna*. A solução inicial possuía uma concentração de 26% m/m. Uma concentração de 5200 mg.L⁻¹ foi responsável pela mortalidade de 99,2% das larvas no 3º estágio de desenvolvimento, sendo a mortalidade diretamente proporcional à concentração testada. Em termos de prevenção à eclosão, nenhuma das concentrações testadas mostrou-se eficaz. Entretanto, 100% das larvas recém-eclodidas morreram antes de atingir o 2º estágio de desenvolvimento. A atividade larvicida extinguiu-se após o aquecimento do extrato a 80°C por 10 min, o que pode ser um indicativo de que os compostos tóxicos sejam proteínas. Os mesmos autores ainda encontraram uma CE50 de 188,7 mg.L⁻¹ para *D. magna*, sendo a imobilidade diretamente proporcional à concentração testada. Nos ensaios com roedores foram utilizadas duas vias distintas de contaminação. Para os camundongos, a contaminação deu-se através de injeção intraperitoneal, enquanto para os ratos, a

exposição ocorreu através da ingestão de água com o extrato de *M. oleifera* solúvel. Para os camundongos a DL50 encontrada foi de 446,5 mg.kg⁻¹ peso corporal, enquanto nos ensaios realizados com ratos não foram observadas diferenças nos parâmetros analisados entre o grupo controle e o grupo exposto ao extrato de *M. oleifera*.

Oliveira et al. (2011) inferiram a ação inseticida das lectinas presentes no extrato da semente de *M. oleifera*. Os resultados comprovaram que a semente moída misturada à alimentação causa redução no crescimento e no peso das larvas de mariposa testadas, sem que cause mortalidade. Em uma dieta artificial, a adição de 0,1% de lectina proveniente do extrato de *M. oleifera*, causa uma redução de peso seco de 0,25 mg, equivalente a 13,5% do peso total.

Kavitha et al. (2012) avaliaram a toxicidade do extrato da semente de *M. oleifera* usando biomarcadores hematológicos e bioquímicos no peixe *Cyprinus carpio*. Os testes realizados apontaram um valor de CL50 de 124,0 mg.L⁻¹ em uma exposição de 96h. O presente estudo apontou que o extrato da semente de *M. oleifera* é tóxico para o *C. carpio* em altas concentrações.

Além da sua utilização como coagulante natural, o extrato da semente de *M. oleifera* esteve sempre presente na cultura popular como fitoterápico e, também, como recurso alimentar, devido às suas excelentes propriedades nutricionais (FERREIRA et al., 2008). Entretanto, a detecção de compostos tóxicos, substâncias com propriedades antifúngicas, antimicrobianas e inseticidas, trouxe à tona a necessidade de mais estudos para avaliar a existência ou não de toxicidade frente a diferentes organismos e diferentes formas de contaminação.

3.5 TRATAMENTO DE ÁGUA CONVENCIONAL

O tratamento de água consiste na execução de diversas etapas e processos, que têm como objetivo fornecer água potável de qualidade à população. Entretanto, a contínua deterioração dos corpos hídricos em conjunto com técnicas inadequadas de tratamento, vem tornando esse objetivo cada vez mais difícil de ser alcançado (ACHON, 2008).

Em 12 de dezembro de 2011, o Ministério da Saúde emitiu a Portaria Nº 2914, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2011). Em

consonância com os padrões de qualidade mundiais, essa Portaria recomenda que os padrões analíticos para a determinação dos parâmetros previstos na mesma, atendam às normas nacionais e internacionais mais recentes. Alguns dos parâmetros englobados pela Portaria nº 2914/2011 são: *Escherichia coli*, coliformes totais, concentração de cloro e de alumínio residual livre, densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas, além do valor máximo permitido para diversas substâncias químicas, como metais pesados, agrotóxicos e elementos radioativos.

No Brasil, há um predomínio do tratamento de ciclo completo ou convencional (ACHON, 2008). De acordo com Libânio (2010), esta forma de tratamento divide-se nas seguintes etapas:

1. Coagulação: consiste na desestabilização das partículas coloidais e suspensas, realizada pela junção de ações físicas e reações químicas, com duração de poucos segundos, entre o coagulante (usualmente um sal de alumínio ou de ferro), a água e as impurezas presentes. Nessa etapa, espera-se remover especialmente a turbidez, matéria orgânica coloidal, substâncias tóxicas, e outras passíveis de conferir odor e sabor à água, microrganismos em geral e os precursores da formação de trihalometanos.
2. Floculação: consiste em um conjunto de fenômenos físicos, nos quais se objetiva reduzir o número de partículas suspensas e coloidais presentes na massa líquida. Para tanto, são fornecidas condições, em termos de tempo de mistura e agitação, para que ocorram os choques entre as partículas anteriormente desestabilizadas pela ação do coagulante, objetivando a formação de flocos, que serão posteriormente removidos por sedimentação/flotação.
3. Sedimentação: ocorre a deposição dos flocos formados nas etapas anteriores pela ação da gravidade. Esta etapa objetiva diminuir o afluxo de partículas às unidades filtrantes.
4. Filtração: constitui-se no processo que tem como função primordial a remoção das partículas responsáveis pela cor e turbidez remanescentes. Essa etapa pode ser considerada a mais relevante no tratamento de água, na qual as falhas que porventura tenham ocorrido na coagulação, floculação e sedimentação possam ser corrigidas, assegurando a qualidade da água tratada.
5. Desinfecção: tem como objetivo produzir água de consumo isenta de microrganismos patogênicos, cuja inativação realiza-se por intermédio de agentes

físicos e/ou químicos, sendo praticamente a última etapa do tratamento de água. Existem dois grupos principais de desinfetantes, os agentes químicos e físicos. Os agentes químicos são elementos ou compostos com potencial de oxidação, incluindo o cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ácido acético, bromo, iodo, permanganato de potássio, cloreto de bromo e ozônio. Os agentes físicos apresentam ação referenciada à energia de radiação, destacando-se radiação UV, radiação gama, radiação solar e, em nível domiciliar, a fervura.

Como pode ser observado, durante o processo de tratamento de água, ocorre a aplicação de diversos compostos químicos, como por exemplo, os agentes coagulantes, que podem permanecer na água ou no lodo gerado, ou ainda, reagir formando subprodutos tóxicos, como é o caso do cloro, altamente reativo na presença de grandes concentrações de matéria orgânica (ACHON, 2008).

A deterioração dos corpos hídricos é um dos fatores responsáveis pelo aumento da demanda por produtos químicos nas ETAs. As descargas de esgoto doméstico e efluentes industriais são responsáveis pelo processo de eutrofização artificial, que consiste no enriquecimento desses ecossistemas aquáticos através do aumento das concentrações de nutrientes, principalmente nitratos e fosfatos (JÚLIO et al., 2009).

O decaimento da qualidade de um manancial resulta para a ETA em maior necessidade de aplicação de produtos químicos, com conseqüente aumento na produção de resíduos e maior custo. Por esta razão, de acordo com Achon (2008), é importante caracterizar os recursos hídricos utilizados, a fim de reduzir a quantidade de coagulante aplicado, buscando a otimização do processo de coagulação, com conseqüente redução do volume de lodo gerado e redução de custos.

A produção de lodo é outro problema enfrentado pelas ETAs. Esses resíduos gerados constituem-se basicamente das águas de lavagem dos filtros e partículas dispostas nos tanques de sedimentação/decantação (ROSÁRIO, 2007). As características e quantidades dos resíduos gerados dependem do tipo de tratamento de água adotado, das características da água bruta, das dosagens e qualidade dos produtos químicos utilizados, das reações químicas ocorridas no processo, da forma de remoção e do tempo de retenção desses resíduos nas ETAs (SUNDEFELD JUNIOR, 2007).

Nos tratamentos que utilizam sais metálicos (sais de alumínio e ferro) os lodos gerados nos decantadores contêm, essencialmente, as substâncias em

suspensão na água bruta, como siltes, argilas e substâncias orgânicas, os hidróxidos metálicos (de ferro ou alumínio), outros precipitados provenientes da coagulação (óxidos metálicos) e demais aditivos utilizados no tratamento, tais como polieletrólitos, cal e carvão ativado (ROSÁRIO, 2007).

No Brasil, em algumas situações, a disposição do lodo ocorre em corpos d'água sem nenhum cuidado específico, podendo provocar graves impactos ambientais. Essa prática é responsável por gerar um círculo vicioso, pois os rios que são os principais fornecedores de água para o abastecimento público, também são receptores de todo e qualquer tipo de resíduo gerado nas próprias ETAs (ACHON, 2008). Devido ao grande volume e complexidade do lodo produzido, são necessárias pesquisas voltadas à redução da quantidade e toxicidade, assim como alternativas de tratamento e disposição final.

Neste sentido, a utilização de coagulantes naturais ganha espaço, devido às diversas vantagens que apresenta. Entretanto, devido à falta de conhecimentos sobre alguns aspectos, como a ecotoxicidade, a sua utilização deve ser realizada com cautela. Devido a isto, o presente trabalho teve como objetivo verificar a existência de toxicidade em diferentes extratos das sementes de *M. oleifera*, um dos coagulantes naturais mais utilizados.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi dividido em três etapas que podem ser melhor observadas na Figura 6. A primeira etapa constituiu-se na avaliação da toxicidade aguda dos extratos, utilizando *D. magna* e *A. salina*. Na segunda etapa, buscou-se avaliar a toxicidade crônica dos extratos utilizando apenas o organismo *D. magna*. Já na terceira e última etapa, avaliou-se a toxicidade aguda da água tratada com os extratos de *M. oleifera* utilizando o bioindicador *D. magna*.

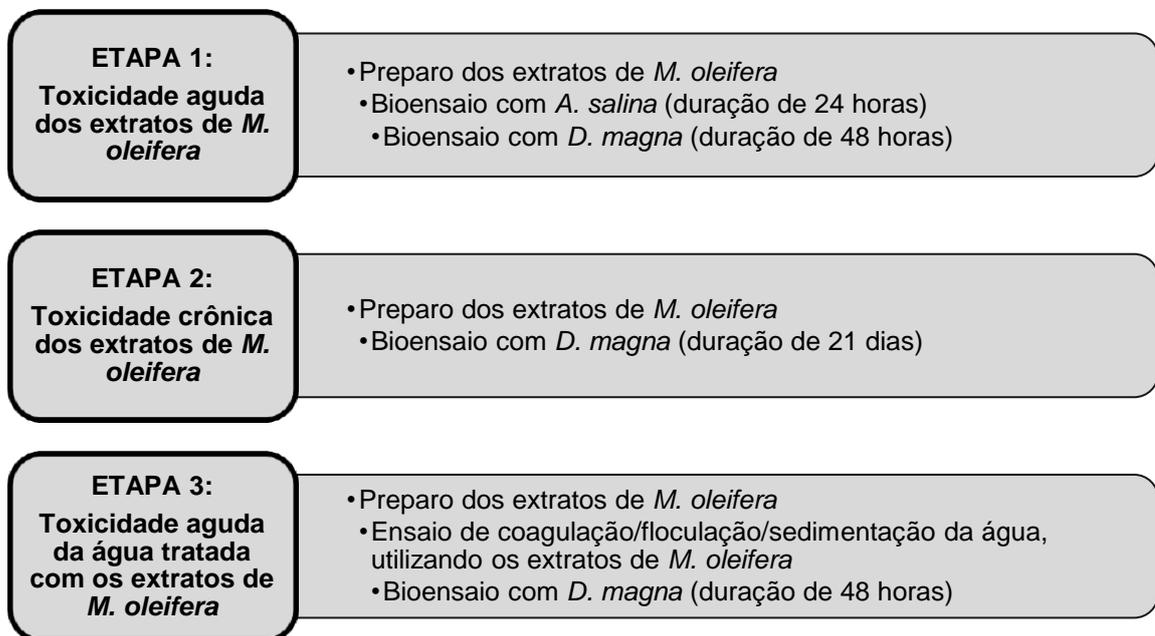


Figura 6: Esquema das etapas de desenvolvimento da pesquisa.

4.1 PREPARO DOS EXTRATOS DE *M. oleifera*

As sementes de *M. oleifera* foram fornecidas pela Universidade Federal de Sergipe (UFS) em novembro de 2012. Foram preparados três extratos a partir das sementes denominados extrato aquoso, extrato salino da semente integral e extrato salino da semente sem óleo. Todos os extratos possuíam uma concentração de 1%, ou seja, 10000 mg.L⁻¹. Os extratos foram preparados no dia de cada ensaio para evitar a degradação da matéria orgânica da semente. O preparo dos extratos encontra-se esquematizado na Figura 7, sendo explicado em detalhes nos itens

4.1.1 (extrato aquoso), 4.1.2 (extrato salino da semente integral) e 4.1.3 (extrato salino da semente sem óleo).

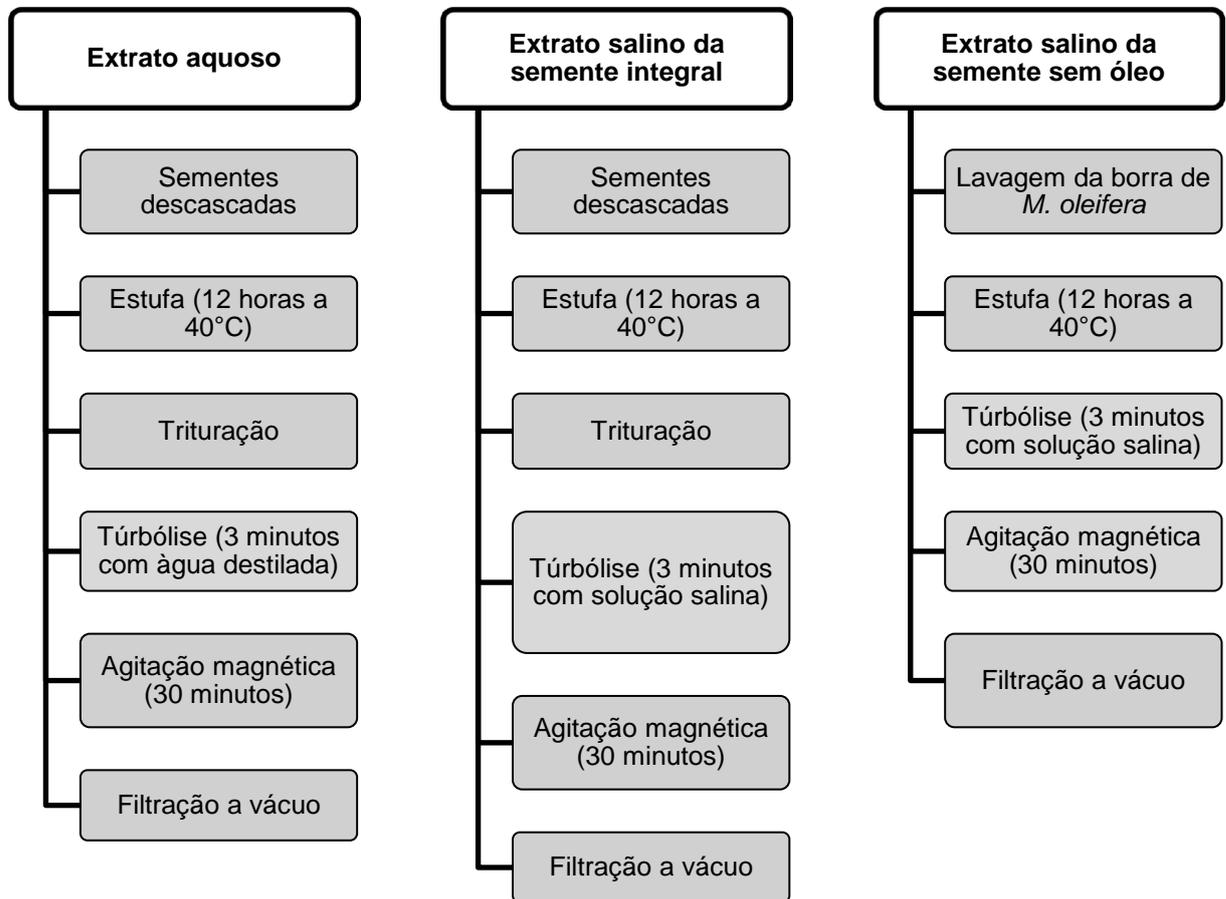


Figura 7: Esquema do preparo dos extratos de *M. oleifera*.

4.1.1 Extrato Aquoso

As sementes foram descascadas e deixadas em estufa a 40°C durante 12 horas. Em seguida, as sementes foram trituradas em liquidificador até formar um pó. Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 1 g do pó de *M. oleifera*, completando o volume para 100mL com água destilada. A solução foi então deixada em turbólise no liquidificador por 3 minutos. Em seguida, o extrato permaneceu em agitação magnética por 30 minutos, sendo a última etapa a filtração a vácuo em filtro

de papel de 14 μm de diâmetro do poro. O extrato resultante foi imediatamente utilizado nos bioensaios de toxicidade.

4.1.2 Extrato Salino da Semente Integral

O pó das sementes foi obtido da mesma maneira descrita para o extrato aquoso (item 4.1.1). Em seguida, preparou-se uma solução salina de cloreto de sódio (NaCl) 1M (58,4 mg.L^{-1}). Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 1 g do pó de *M. oleifera*, completando o volume para 100mL com a solução salina. As etapas seguintes foram as mesmas descritas para o extrato aquoso (item 4.1.1). O extrato resultante foi imediatamente utilizado nos bioensaios de toxicidade.

4.1.3 Extrato Salino da Semente Sem Óleo

A borra das sementes sem óleo foi fornecida pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). O óleo das sementes foi retirado com o auxílio de um Extrator Soxhlet, no qual o óleo e a gordura de materiais sólidos são extraídos após repetidas lavagens com um solvente orgânico sob refluxo em um vidro especial (BRUM; ARRUDA; REGITANO D'ARCE, 2009). Para o preparo deste extrato, a borra das sementes sem óleo foi lavada com água quente (60°C) em filtro a vácuo para retirar as impurezas resultantes da extração do óleo. O pó lavado foi deixado em estufa por 12 horas e o procedimento repetiu os passos realizados para a extração salina (item 4.1.2). O extrato resultante foi imediatamente utilizado nos bioensaios de toxicidade.

4.2 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA DOS EXTRATOS DE *M. oleifera*

4.2.1 Toxicidade Aguda dos Extratos de *M. oleifera* Utilizando *D. magna*

Os filhotes de *D. magna* utilizados nos testes foram obtidos do cultivo mantido pelo Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da UTFPR que é conduzido de acordo com as normas da ABNT NBR 12713 (2009).

As fêmeas ovígeras (matrizes) foram mantidas em béqueres de 2L em concentrações de até 30 matrizes por litro de meio de cultivo (ANEXO B) em câmara incubadora climatizada, com temperatura entre 18°C e 22°C e fotoperíodo de 16 horas claro/8 horas escuro (Figura 8). Cada béquer com as matrizes e o meio de cultivo, constituiu o que é chamado de lote ao longo do trabalho. As matrizes foram alimentadas com solução da alga *Desmodesmos subspicatus* em concentração celular de aproximadamente $4,6 \times 10^6$ células.mL⁻¹. A limpeza dos lotes, alimentação e troca do meio de cultivo foi realizada diariamente.



Figura 8: Lotes com matrizes de *D. magna* e filhotes em béqueres menores separados para realização de testes.

Os filhotes utilizados nos testes eram retirados dos lotes e deixados em recipiente com meio de cultivo separado das matrizes, sem alimentação, durante 2 horas para que atingissem a idade necessária (2 a 26 horas) para a realização dos testes.

A partir da solução inicial dos extratos de *M. oleifera* (10000 mg.L⁻¹), foram obtidas as soluções com diferentes concentrações para a realização do bioensaio. As concentrações de *M. oleifera* testadas foram: 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg.L⁻¹, preparadas em água de diluição (ANEXO C), específica para *D. magna*. O bioensaio foi realizado em béqueres de 50 mL, adicionando-se 40 mL da solução

(água de diluição + extrato de *M. oleifera*) e 20 filhotes (Figura 9). Cada concentração foi testada em triplicata, inclusive o controle negativo (apenas com água de diluição). O teste permaneceu em câmara incubadora climatizada (20°C) sem fotoperíodo, durante 48 horas, seguindo-se posteriormente a leitura.



Figura 9: Esquema do bioensaio de toxicidade aguda dos extratos de *M. oleifera* com *D. magna*
Observação: foram testados 20 organismos por béquer.

Tanto no teste de toxicidade aguda com *D. magna* quanto com *A. salina*, o parâmetro que se avalia é a imobilidade, e não a mortalidade. Deste modo o resultado é expresso em CE50, concentração mediana responsável pela imobilidade em 50% dos organismos.

Após a leitura dos testes, que foi realizada através da observação do número de organismos imóveis por concentração, os dados foram analisados pelo programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977) para a obtenção da CE50.

Durante todo o período dos testes com *D. magna* foram realizados ensaios de controle de sensibilidade com cloreto de potássio (KCl), como pode ser observado mais detalhadamente no item 4.5.1.

4.2.2 Toxicidade Aguda dos Extratos de *M. oleifera* Utilizando *A. salina*

Os cistos de *A. salina* de alta eclosão foram obtidos em comércio especializado e armazenados em geladeira, ao abrigo da luz e umidade, até o seu uso. A metodologia utilizada foi adaptada de Lindsay, Metcalf e Codd (2006), Andriolli et al. (2007), Freitas et al. (2011), Grzybowski et al. (2012) e Palácio et al. (2012). Para a eclosão foi utilizada uma solução de água do mar artificial (*Aqua Salt/Sea Salt®*) com uma concentração de 35 g.L^{-1} , deixada em aeração por no mínimo 24 horas. Em seguida, cerca de 250 mg de cistos foram adicionados em 125 mL de água do mar artificial, e colocados para eclodir. O béquer contendo os cistos e a água do mar artificial permaneceu durante 24 horas sob iluminação e aquecimento com lâmpadas fluorescentes. Após 24 horas, os náuplios I com natação ativa foram retirados e colocados em outro béquer com água do mar artificial nova e aerada e deixados por mais 24 horas sob as mesmas condições até atingirem o estágio de náuplios II, fase em que podem ser utilizados nos bioensaios.

A partir da solução inicial de *M. oleifera* (10000 mg.L^{-1}), foram obtidas as soluções com diferentes concentrações para a realização do bioensaio. Foram testadas seis concentrações do extrato das sementes de *M. oleifera* (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg.L^{-1}) preparadas usando água do mar artificial. O bioensaio foi realizado em placas de 24 poços (Figura 10), adicionando-se $1500 \mu\text{L}$ da solução (água do mar artificial + extrato de *M. oleifera*) em cada poço. Os náuplios II foram retirados dos béqueres em que foram deixados para eclodir, e separados em grupos de 10 com o auxílio de uma placa de porcelana de poços rasos. O conteúdo de cada poço (aproximadamente $500 \mu\text{L}$) foi transferido para os poços da placa do bioensaio. A placa foi então coberta com papel alumínio e permaneceu em câmara incubadora sem fotoperíodo à temperatura de 24°C durante 24 horas. Cada concentração foi testada em triplicata, incluindo-se o controle negativo (apenas com água do mar artificial).

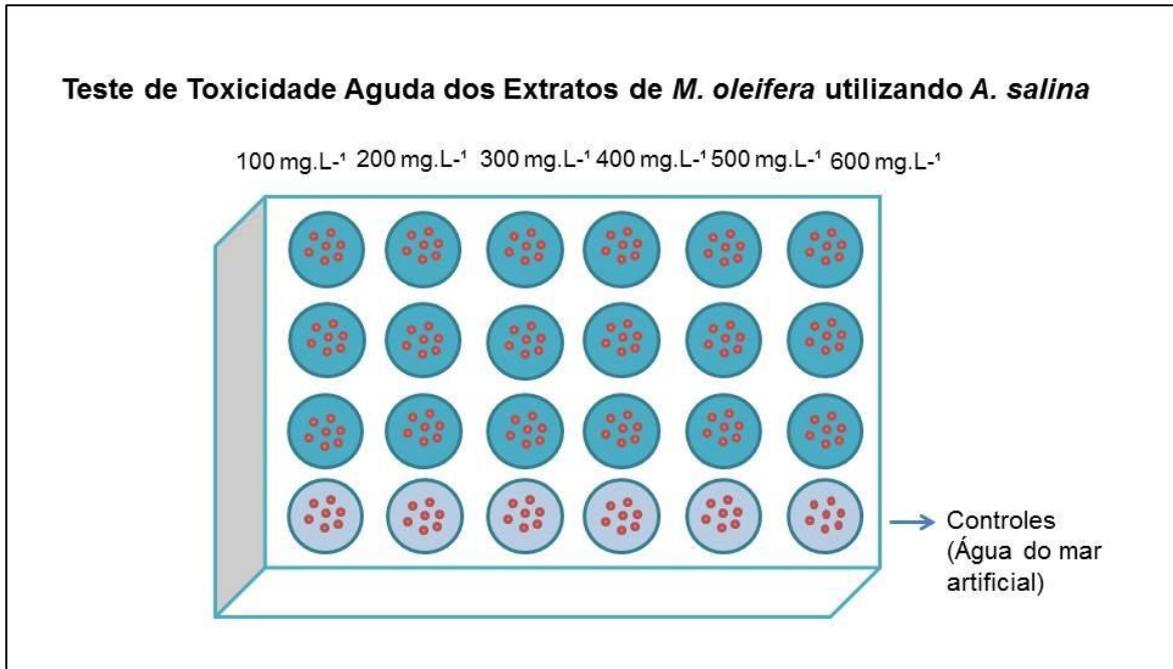


Figura 10: Esquema do bioensaio de toxicidade aguda dos extratos de *M. oleifera* com *A. salina*. Observação: foram utilizados 10 organismos por poço.

Após o término do teste (24 horas), observou-se se havia ou não imobilidade dos organismos nas diferentes concentrações do extrato de *M. oleifera* testados. Os dados foram anotados para serem analisadas pelo programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977) a fim de obter o cálculo da CE50.

Durante todo o período dos experimentos foram realizados testes de controle de sensibilidade com substâncias de referência. Para *A. salina* foi utilizado o dodecil sulfato de sódio (DSS), como pode ser observado mais detalhadamente no item 4.5.2.

4.3 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DOS EXTRATOS DE *M. oleifera*

4.3.1 Toxicidade Crônica dos Extratos de *M. oleifera* Utilizando *D. magna*

Antes do teste definitivo, realizou-se um ensaio preliminar denominado teste crônico de curta duração (7 dias), que teve como objetivo determinar as concentrações a serem testadas e a otimização das condições de manutenção. Neste teste, foram mantidas as mesmas condições adotadas para o bioensaio crônico de 21 dias, com exceção do tempo de duração e das concentrações

avaliadas. No teste crônico de curta duração (7 dias) foram testadas cinco concentrações de extrato de *M. oleifera* (20, 40, 60, 80 e 100 mg.L⁻¹) com 10 repetições cada, inclusive o controle negativo apenas com meio de cultivo. Como ao término do teste havia ocorrido a morte de grande número de indivíduos, para o teste crônico definitivo (21 dias), optou-se por utilizar menores concentrações de extrato de *M. oleifera*, a fim de que parâmetros como crescimento e fecundidade pudessem ser analisados.

Para o ensaio de toxicidade crônica com duração de 21 dias, foram testadas quatro concentrações do extrato de *M. oleifera* (1, 5, 10 e 15 mg.L⁻¹) (Figura 11), em meio de cultivo. Cada béquer de 50 mL recebeu um filhote de *D. magna* com idade de 2 a 26 horas em 50 mL de meio de cultivo acrescido do extrato de *M. oleifera*. Cada concentração foi avaliada com 10 repetições (OECD, 2012), inclusive o controle negativo (apenas com meio de cultivo). Os béqueres foram acondicionados em caixas de plástico com tampa para evitar a evaporação da solução e possíveis contaminações, e mantidos em câmara incubadora climatizada nas mesmas condições das matrizes (item 4.2.1). Os organismos foram alimentados com solução da alga *Desmodesmos subspicatus* em concentração celular de aproximadamente $4,6 \times 10^6$ células.mL⁻¹.

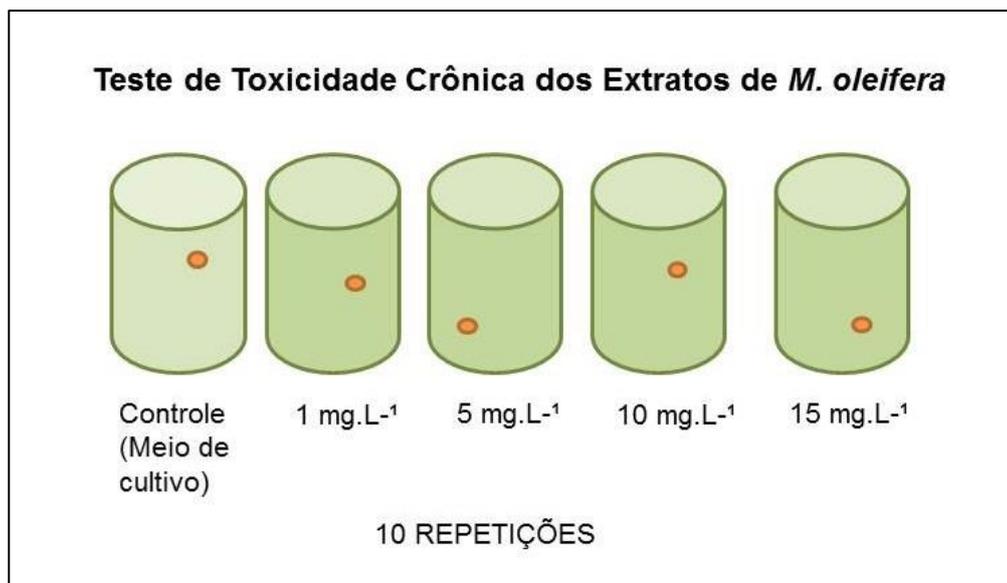


Figura 11: Esquema do bioensaio de toxicidade crônica (21 dias) dos extratos de *M. oleifera*. Observação: foi utilizado 1 organismo por béquer.

Realizou-se a manutenção do bioensaio e observação dos organismos três vezes durante a semana, momento no qual era efetuada a limpeza dos béqueres, troca do meio (meio de cultivo + extrato de *M. oleifera*), alimentação, contagem e retirada dos filhotes. Todos os dados foram plotados em uma planilha para monitorar a mortalidade dos organismos e número de filhotes produzidos. No último dia do teste (21º dia), com o auxílio de um paquímetro, foi avaliado o crescimento nos organismos sobreviventes.

O teste crônico foi realizado de acordo com a norma OEDC (2012) sobre Testes de Reprodução em *D. magna*, assim como os trabalhos produzidos por Brentano (2006) e Flohr, Castilhos Jr e Matias (2012), com adaptações.

4.4 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA DA ÁGUA TRATADA COM OS EXTRATOS DE *M. oleifera*

4.4.1 Água Bruta

A água utilizada nos ensaios foi coletada na Represa do Rio Passaúna na cidade de Curitiba, Paraná. A represa localiza-se na porção oeste da cidade e abastece parte do município e Região Metropolitana de Curitiba, tendo grande importância no fornecimento de água na região (ZABLONSKI, 2011).

Após a coleta, foram realizadas as seguintes análises: cor (aparente e verdadeira), turbidez, pH, temperatura, compostos orgânicos com absorção em UV 254 nm, alcalinidade, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos fixos e sólidos suspensos voláteis. As metodologias utilizadas estão de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 1999).

Além das análises físico-químicas, foi realizado um ensaio de toxicidade aguda utilizando o organismo *D. magna* para verificar a existência de substâncias tóxicas na água.

4.4.2 Ensaio de Coagulação/Floculação/Sedimentação

Baseando-se em dados da literatura (BORBA, 2001; CARDOSO, 2007; CARDOSO et al., 2008; NISHI et al., 2011; ZABLONSKI, 2011) foram estabelecidas as condições do processo de coagulação/floculação (Tabela 1), que foram: tempos e velocidades de mistura rápida (coagulação) e lenta (floculação). O tempo de sedimentação escolhido foi de 90 minutos.

Tabela 1- Tempos e velocidades de mistura rápida e lenta

	Tempo	Velocidade
Mistura rápida	3 min	95 RPM
Mistura lenta	15 min	10 RPM

4.4.3 Toxicidade Aguda da Água Tratada com os Extratos de *M. oleifera* utilizando *D. magna*

Com o objetivo de avaliar a toxicidade da água após o tratamento com extratos da semente de *M. oleifera*, foram realizados ensaios agudos utilizando o organismo *D. magna*. O procedimento para obtenção dos filhotes, montagem e desenvolvimento do experimento foi o mesmo descrito no item 4.2.1.

Após a sedimentação (90 min.), foram coletadas amostras da água tratada no *jar test*, compreendendo duas frações: sobrenadante e sedimentado (Figura 12). Nestes ensaios, foram reduzidas as concentrações de extrato de *M. oleifera* testadas, estando limitadas a 250, 350 e 450 mg.L⁻¹. Esta redução foi realizada com base nos resultados obtidos nos ensaios agudos do extrato bruto.

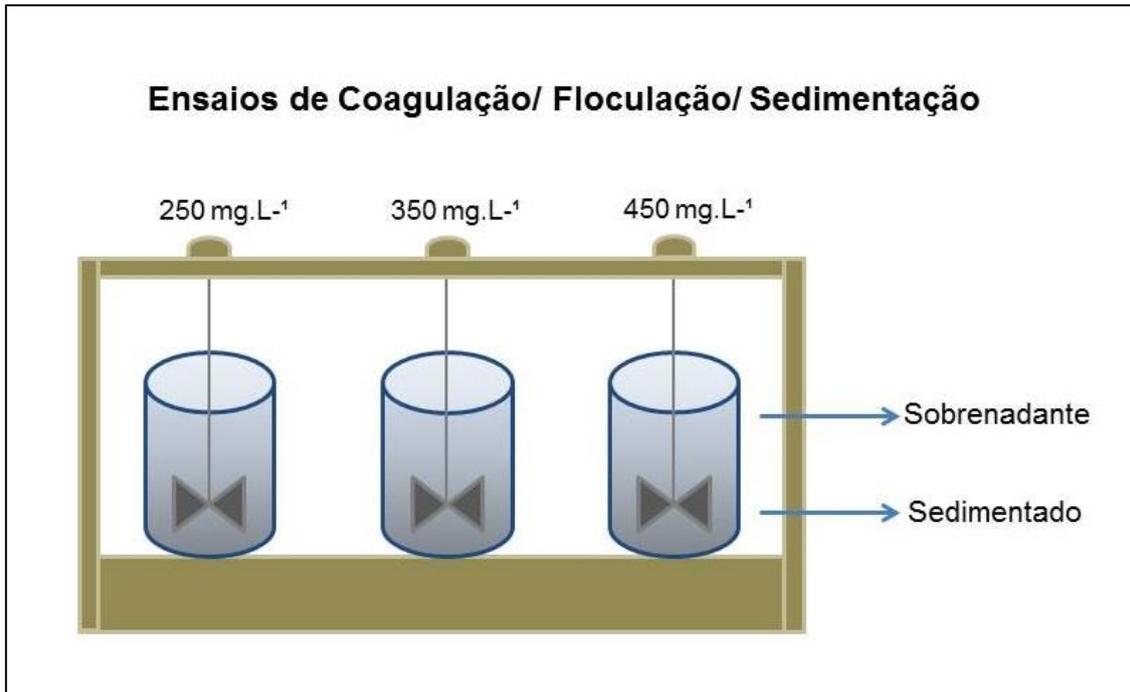


Figura 12: Esquema do *Jar Test* para obtenção das amostras de água tratada com extratos de *M. oleifera*.

As amostras de sobrenadante e sedimentado foram transferidas para béqueres de 50 mL para realização do bioensaio de toxicidade aguda (Figura 13). Cada fração de cada concentração foi testada em triplicata, sendo o mesmo feito para o controle negativo (água de diluição).

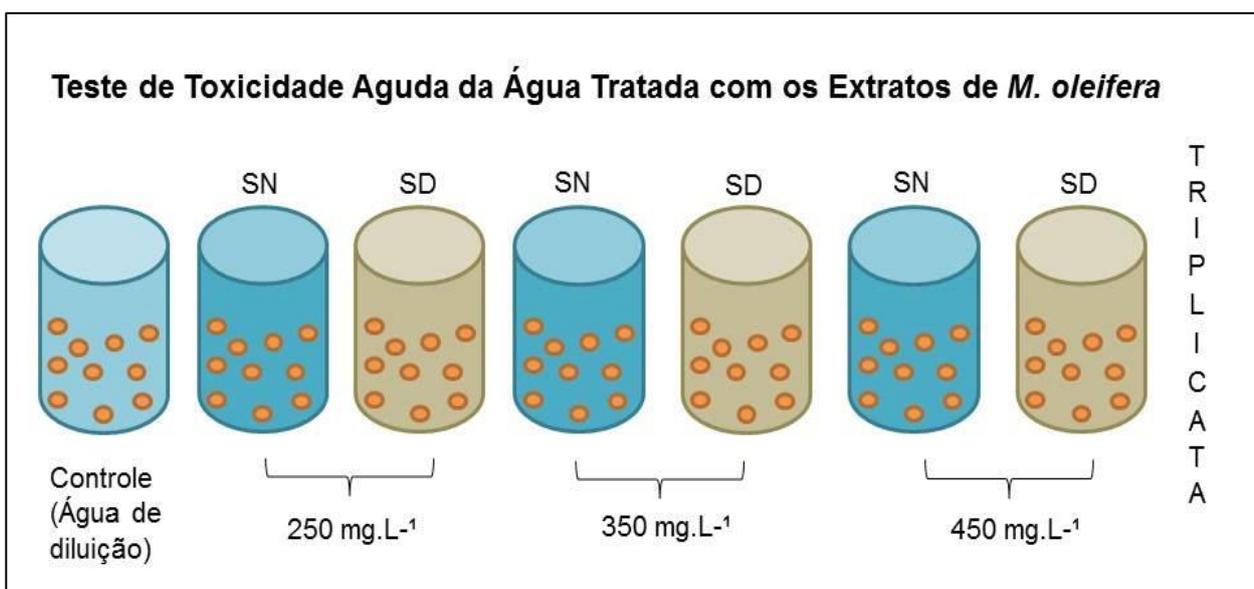


Figura 13: Esquema do bioensaio de toxicidade aguda da água tratada com extratos de *M. oleifera* utilizando *D. magna*. SN: sobrenadante, SD: sedimentado. Observação: foram utilizados 20 organismos por béquer.

4.5 TESTES COM SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Os ensaios de controle de sensibilidade com substâncias de referência permitem maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos ao longo do tempo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Para *D. magna*, são necessários no mínimo cinco testes ao longo do tempo de manutenção de cada lote (cerca de 40 dias), enquanto que para *A. salina* os testes de sensibilidade são realizados no período de tempo em que os testes com a substância em estudo forem desenvolvidos.

4.5.1 Controle de Sensibilidade para *D. magna*

A substância de referência para este teste é o cloreto de potássio, sendo preferencialmente utilizado por não sofrer interferência da qualidade da água além de ser seguro em relação à sua disposição no ambiente (BURATINI, 2002).

As concentrações testadas foram: 570, 660, 700, 750 e 840 mg.L⁻¹. Cada concentração, inclusive o controle negativo apenas com água de diluição, foi realizada em triplicata. O desenvolvimento do teste foi o mesmo descrito no item 4.2.1.

O valor de referência é obtido com base na carta controle, onde são plotados todas as CE50 e calculadas as médias e os desvios padrões (item 5.4). Para o Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia Ambiental, a sensibilidade ao KCl ideal mantêm-se em torno de 700 mg.L⁻¹.

A *D. magna* possui uma sensibilidade bastante variável, dependendo de fatores ambientais como disponibilidade de alimento, densidade populacional, qualidade da água utilizada no preparo do meio de cultivo, temperatura do cultivo e do ambiente exterior (KNIE; LOPES, 2004), entre outros. Deste modo, é necessária a realização contínua de testes para controle de sensibilidade. Caso seja observada que, em uma determinada semana, o controle esteve fora do desvio padrão determinado pela carta-controle, os resultados dos testes com as substâncias em avaliação, como o extrato da *M. oleifera*, por exemplo, devem ser descartados e repetidos. Caso a mudança de sensibilidade seja persistente, é necessário encerrar o lote, descartando as matrizes, e abrir um novo lote a partir dos filhotes.

4.5.2 Controle de Sensibilidade para *A. salina*

Este ensaio baseou-se no teste aplicado por Vanhaecke (1981a; 1981b). A substância de referência foi o dodecil sulfato de sódio (DSS), também conhecido como lauril sulfato de sódio. As concentrações testadas foram: 10; 13,5; 18; 24 e 32 mg.L⁻¹, de acordo com a literatura (VANHAECKE, 1981a; 1981b). O controle negativo foi feito apenas com água do mar artificial. Cada concentração, inclusive o controle, foi realizada em triplicata. O desenvolvimento do teste foi o mesmo descrito no item 4.2.2, com adaptações das metodologias propostas por Resgalla e Laitano (2002) e PETROBRAS (2002).

De acordo com Vanhaecke (1981a; 1981b), a faixa de sensibilidade ideal para *A. salina* varia de 13,33 a 22,52 mg.L⁻¹ de DSS. Estando fora desta faixa, os testes devem ser descartados e refeitos. Caso persista o problema, o lote deve ser descartado e providenciado um lote novo, o qual deve ser submetido a testes com a mesma substância de referência para determinação da sensibilidade.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados utilizou-se o programa STATISTICA® Versão 10. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda, foi aplicado o Teste t Rápido para análises de diferença entre duas médias. No teste crônico, para os dados paramétricos foram utilizados ANOVA e Tukey, enquanto para os dados não paramétricos foram utilizadas as análises de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de confiança adotado foi o de 95%, e foram considerados significativos os resultados com um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TOXICIDADE AGUDA DOS EXTRATOS DE *M. oleifera*

Nesta seção, serão apresentados os resultados referentes aos ensaios de toxicidade aguda com os extratos aquoso, salino da semente integral de *M. oleifera* e salino da semente sem óleo. Estes experimentos foram realizados no período de abril a junho de 2013.

5.1.1 Toxicidade Aguda dos Extratos de *M. oleifera* para *D. magna*

Durante todo o período dos experimentos, a sensibilidade dos organismos foi monitorada através de ensaios com KCl. Em posse dos valores de CE50, das médias e desvios padrões, foi confeccionada a carta controle de sensibilidade para *D. magna* (item 5.4). Nas semanas em que os resultados mostraram um aumento da sensibilidade ou resistência dos organismos, os ensaios com *M. oleifera* foram descartados e repetidos quando a CE50 retornava à normalidade.

Os resultados do coeficiente de variação para os extratos de *M. oleifera* e o controle de sensibilidade com KCl, podem ser observados na Tabela 2. O CV manteve-se abaixo de 30%, o que garante a confiabilidade dos resultados (ENVIRONMENTAL CANADA, 1990).

Tabela 2 - Valores dos coeficientes de variação (CV) e CE50 dos ensaios realizados com *D. magna*

Teste	Substância	CV (%)	CE50
Controle de sensibilidade	Cloreto de Potássio	9,77%	713,58 mg.L ^{-1*}
Toxicidade aguda dos extratos de <i>M. oleifera</i>	Extrato Aquoso	no	no
	Extrato salino da semente integral	3,24%	314,05 mg.L ⁻¹
	Extrato salino da semente sem óleo	6,31%	346,76 mg.L ⁻¹

Legenda: (*) valor médio calculado a partir dos valores de CE50 obtidos durante todo o período dos experimentos. NO = não observado.

O organismo *D. magna* mostrou-se sensível aos extratos, apresentando uma CE50 diferenciada para cada um destes (Tabela 2). Para o extrato salino da semente integral foi obtida uma CE50 de 314,05 mg.L⁻¹, para o extrato salino da

semente sem óleo a CE50 foi de 346,76 mg.L⁻¹, enquanto o extrato aquoso não foi tóxico nem mesmo nas maiores concentrações (400, 500 e 600 mg.L⁻¹).

Por se tratar de um organismo de água doce, foram realizados ensaios apenas com a solução salina NaCl 1M, mesma molaridade usada na obtenção dos extratos, para avaliar a possibilidade de ser a salinidade a responsável pela toxicidade dos extratos. Neste teste, preparou-se uma solução salina de NaCl 1M e não foram adicionados extratos das sementes de *M. oleifera* nesta solução. Foram utilizados os mesmos volumes de solução salina que foram tomados para os testes com o extrato. O desenvolvimento do bioensaio também foi o mesmo. Ao final do teste, não foi observada imobilidade em nenhum dos volumes testados, indicando que provavelmente a salinidade não foi o fator responsável pela morte dos indivíduos do teste.

É possível observar que as CE50 do extrato salino da semente integral (314,05 mg.L⁻¹) e da semente sem óleo (346,76 mg.L⁻¹) foram bastante próximas, não diferindo significativamente uma da outra ($p = 0,20$). Isto pode ser um indicativo de que a presença de óleo não seja um fator importante para a ocorrência de toxicidade, mas sim o método de extração, tendo em vista que a extração aquosa não apresentou toxicidade para *D. magna*.

Diferentes trabalhos vêm apontando o maior potencial de remoção de proteínas coagulantes da semente com a extração salina quando comparados à extração aquosa. Okuda et al. (1999) mostraram que o extrato salino (NaCl 1M) pode alcançar os seus melhores valores de remoção de turbidez com um volume 7,4 vezes menor do que seria necessário para o extrato aquoso. Para uma água com 50 uT (baixa turbidez), 4 mg.L⁻¹ do extrato salino resultaram em uma eficiência de 95% na remoção da turbidez, enquanto 32 mg.L⁻¹ do extrato aquoso apresentaram uma eficiência de apenas 78% na mesma turbidez avaliada. Madrona et al. (2010), demonstraram que a extração salina possui maior potencial de remoção de proteínas coagulantes, o que proporciona uma eficiência de remoção de cor e turbidez maior, sendo necessário um volume menor do extrato.

A concentração ótima do coagulante depende principalmente da turbidez inicial da água. Para a *M. oleifera*, reconhece-se que esta é mais eficiente para águas de média a alta turbidez, ainda que o extrato salino seja bastante eficiente também em baixa turbidez (OKUDA et al., 2000). Quanto maior a turbidez inicial da água, maior é a concentração de coagulante requerida. De uma forma geral,

recomenda-se que para águas com turbidez entre 50 e 150 uT sejam utilizadas concentrações de 50 a 150 mg.L⁻¹ de extrato das sementes de *M. oleifera* (NDABIGENGESERE, NARASIAH, TALBOT, 1994; NDABIGENGESERE, NARASIAH, 1998; OKUDA et al., 1999; RAMOS, 2005; FRANCO, 2010; PRITCHARD et al., 2010; SENGUPTA et al., 2012; ZABLONSKI, 2012). Entretanto, para águas de turbidez mais elevada, maiores concentrações de *M. oleifera* podem ser necessárias. Neste caso, deve-se considerar a aplicação de outro coagulante a fim de evitar a toxicidade observada nos bioensaios quando são utilizadas concentrações de extrato de *M. oleifera* superiores a 300 mg.L⁻¹.

5.1.2 Toxicidade Aguda dos Extratos de *M. oleifera* para *A. salina*

Os extratos de *M. oleifera* não apresentaram toxicidade para o organismo *A. salina*, nem mesmo nas maiores concentrações avaliadas (400, 500 e 600 mg.L⁻¹). Para confirmação, foram realizadas leituras em 24 e 48 horas, sem que fosse detectada imobilidade causada pelo extrato.

Nos ensaios de controle de sensibilidade utilizando o DSS, foi encontrada uma CE50 de 16,98 mg.L⁻¹, valor que está de acordo com a faixa ideal de sensibilidade proposta por Vanhaecke (1981a, 1981b), que varia entre 13,33 a 22,52 mg.L⁻¹.

Apesar de ser um bioensaio que pode ser realizado com bastante facilidade e confiabilidade, o organismo *A. salina* não foi considerado recomendado para testes com *M. oleifera* por não apresentar sensibilidade frente ao composto. Devido à inadequação do organismo, foram realizados apenas os ensaios com toxicidade aguda dos extratos, sem que se desse prosseguimento aos ensaios posteriores com este organismo.

5.2 TOXICIDADE CRÔNICA DOS EXTRATOS DE *M. oleifera*

Nesta seção, serão apresentados os resultados do ensaio crônico realizado com o extrato das sementes de *M. oleifera*. Por ser um teste mais dispendioso, em termos de materiais, espaço e tempo, além de ser mais trabalhoso, optou-se por avaliar apenas um extrato. Para a escolha, os requisitos foram: apresentar

toxicidade e ser de fácil preparo. Desta forma, o extrato escolhido foi o salino da semente integral por ter apresentado toxicidade aguda, ser de fácil preparo e devido também à disponibilidade de material (sementes integrais de *M. oleifera*). Este experimento foi realizado no período de setembro a outubro de 2013.

5.2.1 Toxicidade Crônica do Extrato Salino da Semente Integral de *M. oleifera* frente à *D. magna*

O principal objetivo do teste crônico foi o de avaliar o efeito do extrato salino da semente integral de *M. oleifera* frente à mortalidade, crescimento e fecundidade da espécie *D. magna*. Para isto, foram acompanhados 50 indivíduos, divididos entre concentrações diferentes de extrato de *M. oleifera*, mais o grupo controle. Cada concentração foi analisada com 10 repetições, totalizando 10 organismos por concentração, inclusive no grupo controle. Os indivíduos foram acompanhados até o 21º dia do seu ciclo de vida.

De acordo com a Norma OECD (2012) para Testes de Reprodução em *Daphnia magna*, o bioensaio é considerado válido quando:

- (a) A mortalidade nas matrizes do controle não excede 20% até o final do teste e;
- (b) O número médio de filhotes produzidos por indivíduo sobrevivente até o final do teste é maior que 60.

Como estes critérios foram satisfeitos, o ensaio crônico realizado foi considerado válido.

5.2.1.1 Mortalidade

O parâmetro mortalidade indica o efeito mais tardio e irreversível causado por uma substância tóxica. Os resultados obtidos no teste crônico podem ser observados na Figura 14.

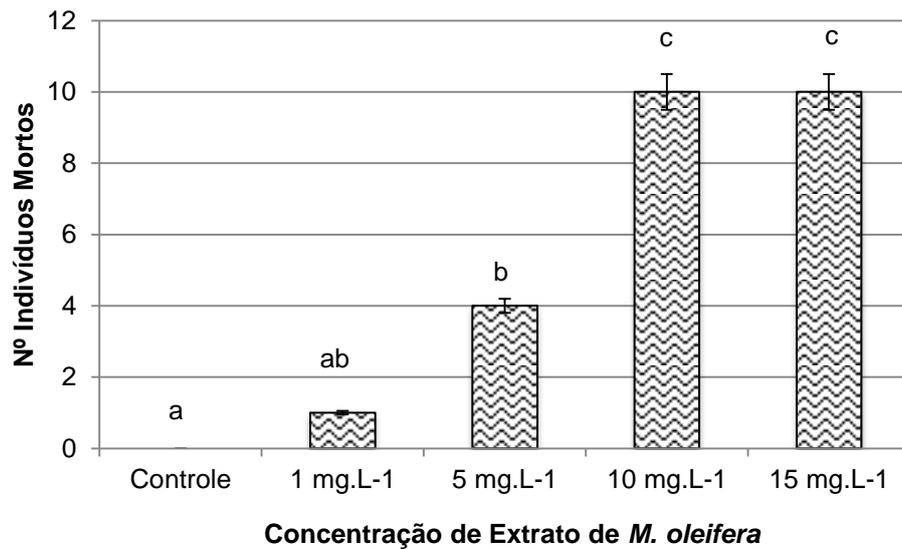


Figura 14: Mortalidade de indivíduos de *D. magna* causada pelo extrato salino de *M. oleifera* em teste crônico. Número inicial de indivíduos por concentração: 10. Letras iguais significam ausência de diferença estatística entre os valores e letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa.

Ao longo dos 21 dias de teste, não foram observadas mortes no grupo controle. Na menor concentração testada (1 mg.L⁻¹) houve uma morte e na segunda menor concentração (5 mg.L⁻¹) foram observadas quatro mortes. Já nas duas maiores concentrações (10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹) foi constada a morte de 100% dos indivíduos até o término do experimento.

Na maior parte dos organismos que morreram, foi possível observar que inicialmente notava-se o pequeno crescimento, menor taxa de alimentação, menor frequência de postura e reduzido número de filhotes. Enquanto os organismos do grupo controle cresceram rapidamente até o 10º dia, os indivíduos das maiores concentrações (10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹), apresentaram um crescimento muito lento, estando pouco maiores que filhotes até o momento da sua morte. A maior parte dos indivíduos morreu antes de realizar a primeira postura, que ocorreu entre o 7º e 12º dia.

É possível afirmar então que o parâmetro mortalidade diferiu significativamente ($p = 0,000$) entre os grupos, sendo que quanto maior a concentração avaliada, maior é a mortalidade entre os indivíduos. A análise entre os grupos revelou que o controle é um grupo isolado, onde não houve nenhuma morte, enquanto 1 mg.L⁻¹ é um grupo em interseção entre o controle e o grupo 5 mg.L⁻¹, que por apresentar mortalidade um pouco maior, também foi considerado um grupo

isolado. As maiores concentrações (10 e 15 mg.L⁻¹) também foram considerados grupos isolados pela análise, devido à elevada mortalidade observada.

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar a relação entre concentração e sobrevivência, como pode ser observado na Figura 15.

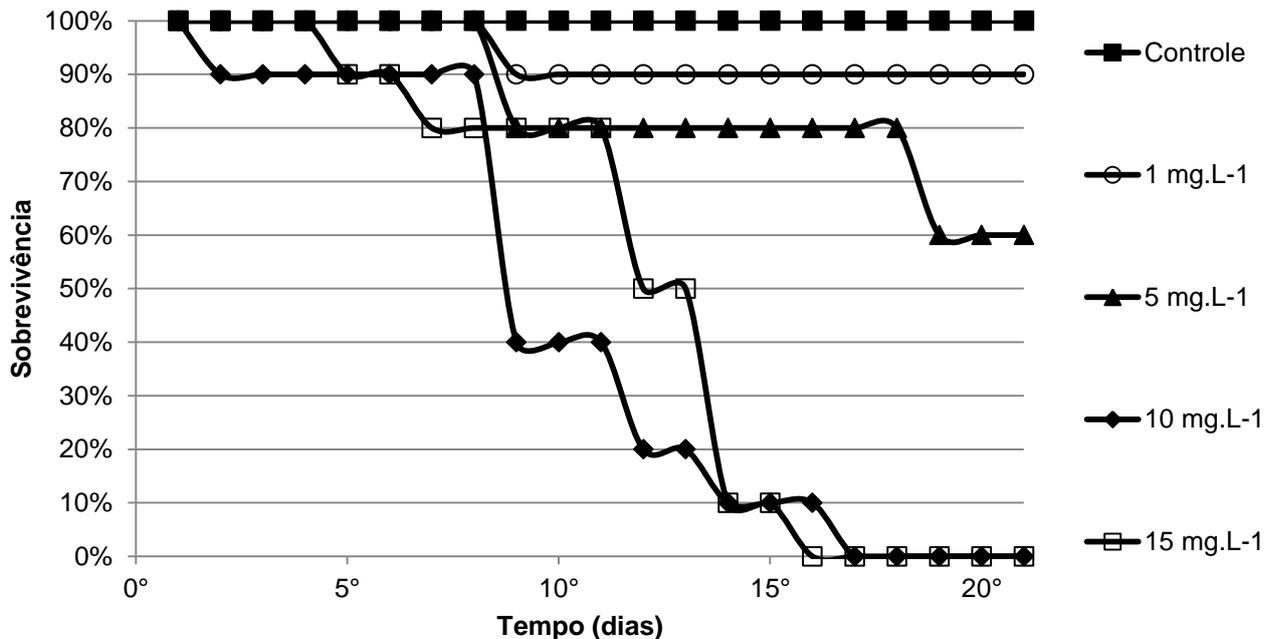


Figura 15: Sobrevivência de organismos de *D. magna* expostos ao extrato salino de *M. oleifera* durante teste crônico. Número inicial de indivíduos por concentração: 10.

Desta forma, é possível afirmar que elevadas concentrações de extrato das sementes de *M. oleifera* durante um longo período de tempo diminuem a possibilidade de sobrevivência de um organismo exposto. A discussão sobre os possíveis mecanismos responsáveis por este fato será apresentada no item 5.5.2.

5.2.1.2 Fecundidade

A fecundidade é um dos principais parâmetros para a comprovação de efeitos tóxicos. De acordo com Flohr, Castilhos Jr e Matias (2012), mesmo que seja observado decréscimo no consumo de oxigênio e redução no tamanho corporal, em alguns casos, não é possível atribuir estes efeitos ao composto tóxico sem que sejam constatados efeitos sobre a reprodução.

O parâmetro fecundidade pode ser analisado a partir de três aspectos:

- (a) Data da primeira postura;
- (b) Número de posturas e;
- (c) Número total de filhotes;

De acordo com Rand (1995), o amadurecimento sexual das matrizes ocorre entre o sexto e o décimo dia de vida. A data da primeira postura diferiu entre os cinco grupos. Nos grupos controle, 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹ a primeira postura ocorreu em média no 7º dia. No grupo 10 mg.L⁻¹ foi no 9º dia, enquanto no grupo 15 mg.L⁻¹ a primeira postura só aconteceu no 12º dia, cinco dias depois do grupo controle.

O número de posturas ao longo dos 21 dias de teste também diferiu entre os grupos ($p = 0,000$), como pode ser observado na Figura 16. Ao longo do teste, ocorreram 57 posturas no grupo controle, 61 no grupo 1 mg.L⁻¹, 44 no grupo 5 mg.L⁻¹, 6 no grupo 10 mg.L⁻¹ e 2 no grupo 15 mg.L⁻¹.

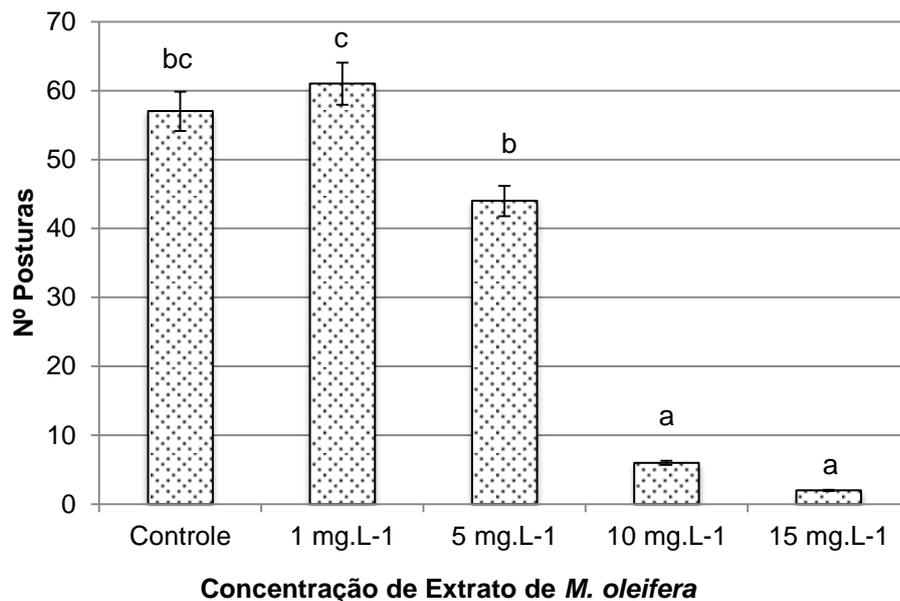


Figura 16: Número de posturas das matrizes de *D. magna* expostas durante teste crônico ao extrato salino de *M. oleifera*. Número inicial de indivíduos por concentração: 10. Letras iguais significam ausência de diferença estatística entre os valores e letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa.

O número total de filhotes vivos foi contabilizado até o término do teste, e pode ser visto na Figura 17. Neste parâmetro também houve diferença entre as concentrações avaliadas ($p = 0,000$), principalmente entre o grupo controle e as menores concentrações (1 e 5 mg.L⁻¹) na comparação com os grupos das maiores

concentrações (10 e 15 mg.L⁻¹). O número total de filhotes entre os grupos foram, respectivamente: 1047, 1085, 800, 25 e 12, nos grupos controle, 1 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹.

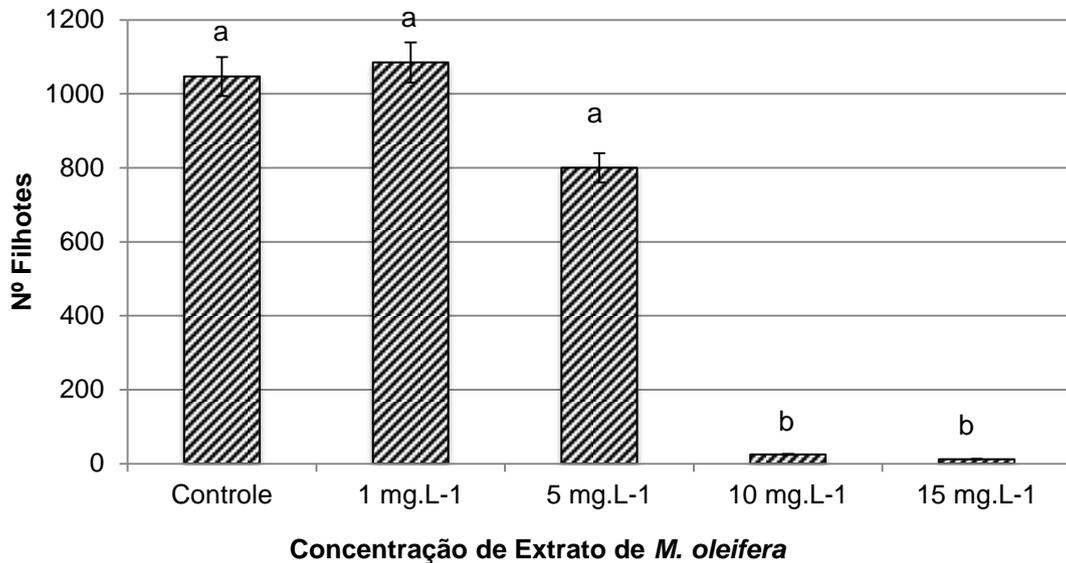


Figura 17: Número total de filhotes produzidos por matrizes de *D. magna* expostas durante teste crônico a extrato salino de *M. oleifera*. Número inicial de indivíduos por concentração: 10. Letras iguais significam ausência de diferença estatística entre os valores e letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa.

Como pode ser observado, o parâmetro fecundidade também foi fortemente afetado pela concentração do extrato. Quanto maior a concentração avaliada, menor o número de posturas e menor o número total de filhotes. Além disso, a data da primeira postura ficou cada vez mais tardia conforme aumentava-se a concentração do extrato de *M. oleifera*.

5.2.1.3 Crescimento

O crescimento foi mensurado apenas no último dia do teste. A *D. magna* é um organismo bastante sensível e que necessita da menor manipulação possível, a fim de evitar estresse e danos às suas estruturas frágeis, como as antenas. Deste modo, para evitar possíveis mortes acidentais, durante o desenvolvimento do teste, apenas observou-se e estimou-se o tamanho aproximado das matrizes, deixando a medição para o último dia, no momento em que os indivíduos seriam descartados.

Sendo assim, o parâmetro crescimento foi analisado apenas para os organismos sobreviventes. O tamanho final pode ser observado na Figura 18:

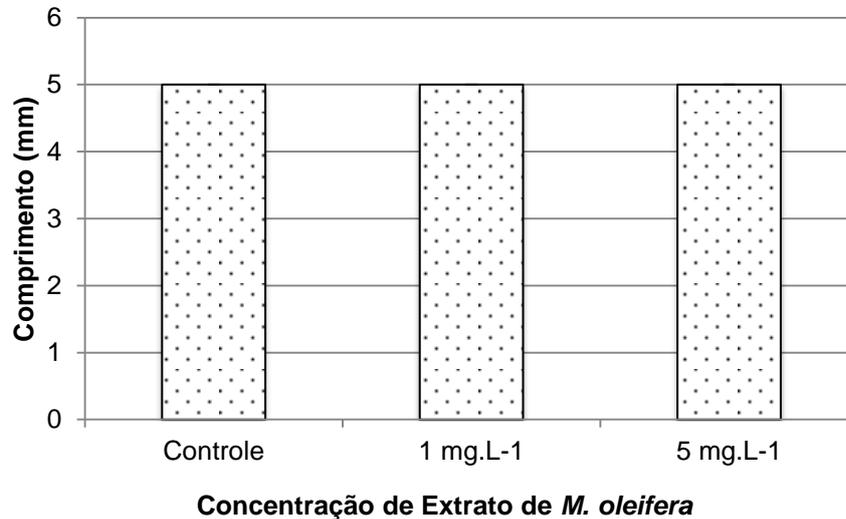


Figura 18: Crescimento de indivíduos de *D. magna* após exposição ao extrato salino de *M. oleifera* durante teste crônico. Nas concentrações de 10 e 15 mg.L⁻¹ não houveram sobreviventes.

Para este parâmetro, só foi possível analisar os três primeiros grupos, visto que apenas estes possuíam indivíduos sobreviventes ao término do teste. Como o objetivo era verificar o crescimento total até o 21º dia do teste, não foi computado o crescimento dos organismos que morreram antes desta data. Como pôde ser observado, não houve diferença no crescimento entre os organismos do grupo controle, 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹, visto todos os indivíduos possuíam o comprimento de 5 mm no momento da medição.

5.2.2 Mecanismos de Toxicidade Propostos

Baseando-se nos resultados obtidos através do teste crônico, é possível inferir sobre a toxicidade encontrada no extrato de *M. oleifera*. A *D. magna* é um organismo consumidor de suspensão que coleta partículas alimentares com cerdas finas nos apêndices do tronco. Estas cerdas filtrantes geralmente organizam-se no apêndice para formar um pente distinto. A corrente hídrica passa por este pente e as partículas coletadas são transferidas para o interior do sulco alimentar por meio de cerdas especiais na parte basal dos apêndices (RUPPERT; BARNES, 1996). Sendo

assim, a capacidade de alimentação da *D. magna* está limitada ao tamanho da partícula alimentar (GLIWICZ; LAMPERT, 1990; MULLER NAVARRA; LAMPERT, 1996) e à boa condição das cerdas filtrantes. Além disso, o tipo de alimento e a sua abundância afetam a sensibilidade dos organismos aos poluentes, assim como a sua taxa de reprodução (EPA, 2002).

Dito isto, sugere-se três possíveis mecanismos de toxicidade do extrato salino da semente integral de *M. oleifera* frente ao organismo *D. magna*. Na primeira hipótese, o aumento da turbidez devido às partículas do coagulante pode ter causado a obstrução das cerdas de alimentação. Os flocos agregados às cerdas diminuiriam a sua capacidade filtrante, o que reduziria o aporte de partículas alimentares para o sulco alimentar. Quanto menos alimento ingerido, menor a produção de energia. Os processos de crescimento e reprodução requerem grande parte da energia de um organismo. Deste modo, um indivíduo que se encontra com baixa reserva energética, não é capaz de crescer adequadamente ou reproduzir-se. Permanecendo neste estado por longo tempo, a capacidade de sobrevivência do organismo também é comprometida. Somando-se a isto, ainda é possível que tenha ocorrido a ingestão de partículas de coagulante ao invés de partículas alimentares, que serviriam para fornecer energia ao organismo. Sabe-se que o gênero *Daphnia* é considerado não seletivo em relação à natureza da partícula ingerida (DEMOTT, 1982; LAMPERT, 1974; PORTER et al., 1983), ou seja, os estudos não comprovaram a preferência por uma classe específica de alimento, como por exemplo um determinado gênero de algas. Devido a isto, é possível que os organismos testados tenham ingerido tanto partículas alimentares (algas), quanto não alimentares (partículas do coagulante).

Neste caso, é possível estabelecer uma comparação entre as partículas suspensas do coagulante com as partículas suspensas normalmente encontradas no meio aquático, principalmente argila e demais sedimentos. Sabe-se que se o excesso de partículas suspensas na coluna d'água ocorre com frequência no meio ambiente, devido principalmente às chuvas que transportam uma elevada quantidade de sedimentos para os corpos hídricos e ao despejo de efluentes. O excesso de partículas em suspensão pode ser muito estressante para os organismos aquáticos (JEON et al., 2010), podendo reduzir significativamente a capacidade de sobrevivência de cladóceros em estudos crônicos, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento (KIRK; GILBERT, 1990; ANTUNES; CASTRO,

GONÇALVES, 2004). As partículas de sedimento suspensas na coluna d'água podem desempenhar um papel ambíguo através do ponto de vista ecotoxicológico. Estas partículas podem tanto amenizar a toxicidade através da absorção/adsorção de contaminantes (HUCKINGS et al., 1991; SMIT; VAN GESTEL, 1998), quanto prejudicar os organismos aquáticos através da adsorção/absorção de nutrientes e minerais essenciais e também, por interferir na taxa de ingestão alimentar (HARTMAN; MARTIN, 1984; HERBRANDSON et al., 2003a). Esta interferência ocorre, pois os organismos podem acabar ingerindo maior número de partículas de sedimentos do que partículas alimentares, assim como é possível que ocorra a obstrução das cerdas filtrantes. Comportamentos anormais de alimentação induzidos pela presença de partículas não alimentares podem levar a um déficit energético para o organismo, o que o torna mais vulnerável a compostos químicos estressores (JEON et al., 2010). Além disso, sob uma exposição aguda, os sólidos suspensos podem aumentar o estresse dos organismos aquáticos, quando em exposição simultânea com um composto tóxico. O estresse fisiológico adicional pode afetar a susceptibilidade do organismo ao composto tóxico através da mudança na toxicodinâmica da interação entre o organismo e o composto (HERBRANDSON et al., 2003a).

Uma segunda hipótese é a de que as proteínas coagulantes da *M. oleifera* poderiam ligar-se às algas formando flocos. À medida que aumentam de tamanho, estes flocos sedimentam-se, tornando as algas indisponíveis para a alimentação das matrizes, devido principalmente ao aumento de tamanho da partícula e envolvimento nos polímeros do coagulante.

O hábito alimentar do gênero *Daphnia* pode ser considerado como não seletivo em relação à natureza da partícula filtrada (DeMOTT, 1982; LAMPERT, 1974; PORTER et al., 1983), mas seletivo ao tamanho da partícula (GLIWICZ; LAMPERT, 1990; MULLER NAVARRA; LAMPERT, 1996). Desde modo, o organismo é incapaz de ingerir partículas muito grandes, como poderia ser o caso de um floco formado pela interação do coagulante com as algas.

A toxicidade de um determinado contaminante pode ser aumentada pela presença de partículas ou compostos com caráter coagulante no meio, que ocasionam a formação de flocos e a consequente sedimentação de recursos alimentares (JEON et al., 2010). Uma menor ingestão de alimento leva à diminuição das reservas energéticas. Como a carência energética compromete seriamente a

capacidade de detoxificação de um organismo (HERBRANDSON et al., 2003b), um ambiente que apresente tanto substâncias coagulantes (que diminuem a disponibilidade de alimento) quanto substâncias tóxicas, potencializa a toxicidade do estressor. É possível que este fenômeno seja o responsável pela toxicidade observada no teste crônico com *D. magna*, em que efeitos tóxicos foram observados (mortalidade e redução da fertilidade) mesmo em baixas concentrações do extrato de *M. oleifera*.

Estudam mostram a importância da disponibilidade de alimento para a redução de efeitos tóxicos causados por alguns contaminantes, seja devido ao fornecimento de energia para detoxificação ou pela capacidade de absorção/adsorção dos contaminantes (ENSERINK et al., 1995; BOENIGK et al., 2005). Além disso, matrizes sujeitas a uma restrição na alimentação tendem a produzir um menor número de filhotes (ENSERINK; LUTTMER; MAAS-DIEPEVEEN, 1990). Baseando-se nisso, é possível relacionar que a restrição na alimentação que pode ter ocorrido nas maiores concentrações de extrato de *M. oleifera* testados (10 e 15 mg.L⁻¹), através dos mecanismos acima citados, pode ter sido uma das responsáveis pela diferença no número de filhotes produzidos nestas concentrações (Figura 16).

Por fim, a última hipótese é de que a mortalidade tenha sido causada apenas por alguma substância tóxica presente no extrato, desconsiderando possíveis interações. Esta substância seria concentração-dependente e teria se manifestado mais fracamente em 5 mg.L⁻¹ e fortemente a partir de 10 mg.L⁻¹. Neste caso, o crescimento e a reprodução estariam reduzidos não pelo baixo valor energético do organismo devido ao comprometimento da alimentação, mas sim porquê, em resposta ao composto tóxico, a energia do organismo estaria sendo deslocada para detoxificação. De maneira semelhante, com a energia transferida para a detoxificação, o organismo não é capaz de crescer ou reproduzir-se normalmente. Permanecendo neste estado e persistindo a toxicidade, o indivíduo não sobrevive.

Distúrbios na homeostase de um organismo levam a processos compensatórios, adaptativos e patológicos que demandam gasto energético (KNOPS; ALTENBURGER; SEGNER, 2001). Portanto, a taxa metabólica de um organismo deve ser aumentada sob estresse tóxico (CALOW; SIBLY, 1989). Devido aos recursos energéticos limitados dos organismos, o custo metabólico adicional

resulta em uma realocação de recursos energéticos que só pode ser satisfeita à custa de outros processos que exigem energia (BEYERS et al., 1999) ou por um consumo de energia maior. Caso estas necessidades não possam ser supridas, o organismo é incapaz de sobreviver neste ambiente.

5.3 TOXICIDADE AGUDA DA ÁGUA TRATADA COM OS EXTRATOS DE *M. oleifera*

Esta seção apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade aguda da água tratada com os extratos de *M. oleifera*. Estes experimentos foram inicialmente realizados no período de julho a agosto de 2013, entretanto, devido a mudanças na sensibilidade dos organismos, os testes foram repetidos no período de novembro de 2013 a janeiro de 2014.

Logo após a coleta da água foram realizadas análises físico-químicas, a fim de caracterizar a água bruta. Da mesma forma, na água após o processo de coagulação/floculação com o extrato das sementes de *M. oleifera*, também foram realizadas análises para caracterização.

5.3.1 Caracterização Físico-Química da Água Bruta

A água coletada apresentou os seguintes valores para os parâmetros analisados (Tabela 3):

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos da água bruta coletada na Represa do Rio Passaúna

Parâmetro	Valor
Cor Aparente	61 uH
Cor Verdadeira	32 uH
Turbidez	125 uT
pH	7,05
Temperatura	15°C
UV 254 nm	0,1891 cm ⁻¹
Alcalinidade	4,789E ⁴ MicroEqv.L ⁻¹ *
Sólidos Suspensos Totais	33,5 mg.L ⁻¹
Sólidos Suspensos Fixos	24 mg.L ⁻¹
Sólidos Suspensos Voláteis	9,5 mg.L ⁻¹

* Valor obtido através do programa BGM for Windows Versão 1.0 (1994)

A coleta foi realizada após um longo período de chuvas, o que justifica os valores relativamente elevados de cor aparente e verdadeira, compostos orgânicos com absorção em 254 nm, turbidez e sólidos. Os outros parâmetros, pH e temperatura, foram considerados normais.

No ensaio de toxicidade utilizando *D. magna*, realizado com a água bruta no dia da coleta, não foi observada imobilidade em nenhuma das repetições. Portanto, é possível afirmar que a água estava livre de substâncias que poderiam causar efeitos tóxicos agudos que interferissem nos experimentos com a água tratada.

5.3.2 Caracterização Físico-Química da Água Tratada com os Extratos de *M. oleifera*

Foram realizadas na água tratada algumas análises físico-químicas a fim de verificar as alterações resultantes do processo de coagulação/floculação com extratos de *M. oleifera*.

Os resultados obtidos para a água tratada com 250 mg.L⁻¹, 350 mg.L⁻¹ e 450 mg.L⁻¹ do extrato de *M. oleifera*, podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos da água tratada com 250 mg.L⁻¹, 350 mg.L⁻¹ e 450 mg.L⁻¹ do extrato salino da semente integral de *M. oleifera*

Parâmetro	Valor		
	250 mg.L ⁻¹	350 mg.L ⁻¹	450 mg.L ⁻¹
Cor Aparente	10,41 uH	10,70 uH	11,18 uH
Cor Verdadeira	0 uH	2,32 uH	2,71 uH
Turbidez	16,0 uT	21,0 uT	22,8 uT
pH	7,32	7,34	7,38
Temperatura	27°C	27°C	27°C
UV 254 nm	0,0212 cm ⁻¹	0,1180 cm ⁻¹	0,1735 cm ⁻¹
Alcalinidade	4,919E ⁴ MicroEq.L ⁻¹	4,921E ⁴ MicroEq.L ⁻¹	4,92E ⁴ MicroEq.L ⁻¹

* Valor obtido através do programa BGM for Windows Versão 1.0 (1994)

Como pode ser observado, houve redução nos parâmetros cor (aparente e verdadeira), turbidez e compostos orgânicos com absorção em 254 nm através da coagulação/floculação utilizando 250 mg.L⁻¹ do extrato salino da semente integral de *M. oleifera*. Aumentando-se a concentração utilizada para 350 mg.L⁻¹, é possível observar que a redução de cor, turbidez e compostos orgânicos com absorção em 254 nm foi menor do que quando utilizou-se 250 mg.L⁻¹ do extrato de *M. oleifera*. Isto

está de acordo com dados da literatura que afirmam que a utilização de concentrações elevadas do extrato ocasiona o aumento da turbidez residual, além de menor capacidade de remoção de cor e turbidez (MUYBI; EVISON, 1995; MADRONA, 2010).

Quando foi testada uma concentração de 450 mg.L^{-1} , pode ser visto que a remoção de cor, turbidez e compostos com absorção em 254 nm foi ainda menor do que quando utilizou-se 350 mg.L^{-1} . Com base nisto, é possível inferir que concentrações elevadas (acima de 350 mg.L^{-1}) do extrato salino da semente integral de *M. oleifera* além de apresentarem riscos de toxicidade para os organismos testados, possuem menor eficiência de remoção de cor e turbidez nos ensaios realizados.

A remoção de turbidez, um dos principais parâmetros a serem avaliados, foi de 87,2% para a concentração de 250 mg.L^{-1} , 83,2% para 350 mg.L^{-1} e de 81,76% quando utiliza-se a concentração de 450 mg.L^{-1} . Com isto pode-se observar que a remoção de turbidez decresce conforme a concentração utilizada do extrato aumenta.

Madrona (2010) encontrou um valor de remoção de turbidez de aproximadamente 82% para águas com turbidez inicial de 150 uT utilizando 250 mg.L^{-1} de extrato salino (NaCl 1M) de *M. oleifera*, o que está de acordo com os resultados encontrados neste trabalho. Já Okuda et al (1999) encontraram uma remoção de turbidez acima de 95% em uma água com turbidez inicial de 50 uT, utilizando 4 mg.L^{-1} de extrato salino (NaCl 1M) de *M. oleifera*, fato este que comprovou a eficiência do extrato salino quando comparado ao extrato aquoso, do qual foram necessárias 32 mg.L^{-1} para promover a remoção de apenas 78% da turbidez.

5.3.3 Toxicidade Aguda da Água Tratada com Extratos de *M. oleifera* utilizando *D. magna*

Nesta etapa, foi realizada a coagulação/floculação/sedimentação da água bruta em *Jar Test* (Figura 19) com cada um dos extratos (aquoso, salino da semente integral e salino da semente sem óleo). Em seguida, foram coletadas duas frações da amostra (sobrenadante e sedimentado) e testadas separadamente nos bioensaios.



Figura 19: Ensaio de coagulação/floculação/sedimentação em Jar Test

A água tratada com o extrato aquoso não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações e em nenhuma das frações, o que pode ser justificado, como explicado no item 5.1.1, pelo baixo potencial de remoção de proteínas coagulantes da semente pela extração aquosa. Este resultado está de acordo com o obtido no bioensaio de toxicidade aguda do extrato aquoso (item 5.1.1), onde também não houve toxicidade.

Por outro lado, a água tratada com o extrato salino da semente integral apresentou uma CE50 de 296,02 mg.L⁻¹ na fração sobrenadante e 291,04 mg.L⁻¹ na fração sedimentada. A água tratada com o extrato salino da semente sem óleo também apresentou toxicidade tanto na fração sobrenadante quanto na sedimentada. Verificou-se uma CE50 de 351,17 mg.L⁻¹ para a fração sobrenadante e 342,32 mg.L⁻¹ para a fração sedimentada.

Para comparação, nos ensaios de toxicidade aguda dos extratos, encontrou-se uma CE50 de 314,05 mg.L⁻¹ para o extrato salino da semente integral, e CE50 de 346,76 mg.L⁻¹ para o extrato salino da semente sem óleo. Estes valores não diferem muito da toxicidade encontrada na água tratada com os mesmos extratos, o que indica que não há redução da toxicidade após o processo de coagulação/floculação/sedimentação quando é utilizada uma concentração elevada de extrato de *M. oleifera*.

5.4 CARTA CONTROLE PARA MONITORAMENTO DE SENSIBILIDADE EM *D. magna*

Na Figura 20 pode-se observar a carta controle para *D. magna* cultivada no Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia da UTFPR, no período de maio a dezembro de 2013. A substância de referência utilizada foi o cloreto de potássio (KCl).

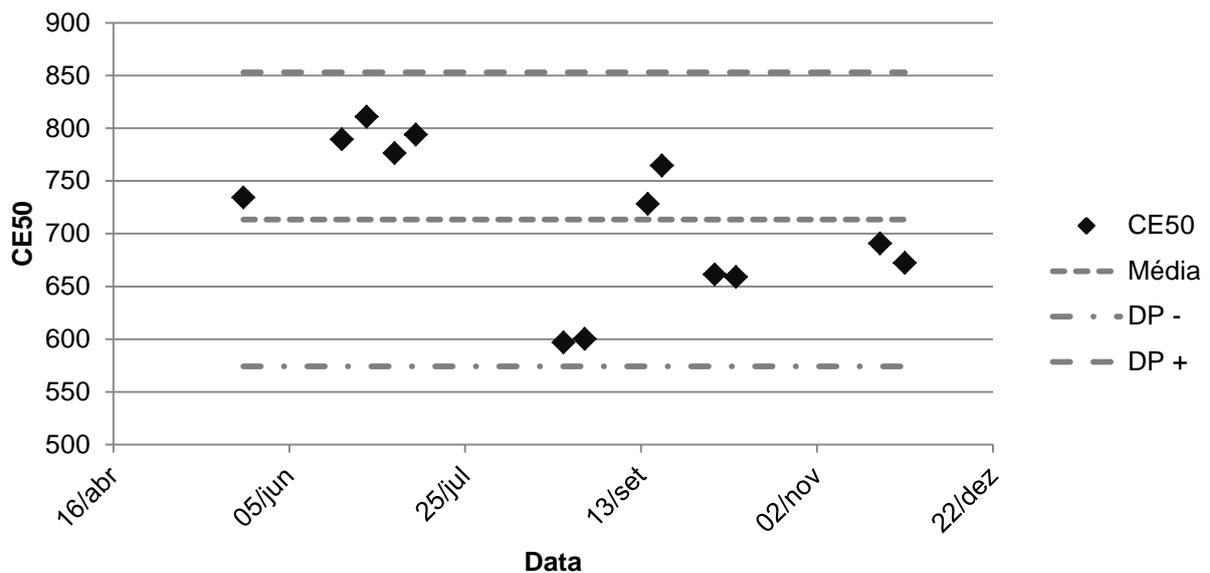


Figura 20: Carta controle para monitoramento da sensibilidade de *D. magna*, utilizando KCl como substância de referência, no período de maio a dezembro de 2013. DP: desvio padrão (-) negativo e (+) positivo.

Para a confecção da carta controle, os resultados de CE50 são plotados em uma planilha e calculados os valores da média e desvio padrão. Os resultados que se encontram fora ou muito próximos do desvio padrão positivo (DP +) ou negativo (DP -) indicam que a sensibilidade estava alterada. Quanto menor for o valor de CE50, mais sensíveis estavam os organismos, e quanto maior, mais resistentes. Caso tenham sido realizados testes no período em que os valores de CE50 tenham se aproximado muito dos desvios padrões, os mesmos devem ser descartados e repetidos quando a sensibilidade voltar ao normal (próxima à média).

Com base na carta controle obtida, é possível observar que houve alteração na sensibilidade dos organismos entre os períodos do ano, entretanto, os valores mantiveram-se dentro dos desvios padrões, o que permitiu a realização dos testes e assegurou a confiabilidade dos resultados.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é possível afirmar que:

- Os extratos salinos das sementes de *M. oleifera* (semente integral e semente sem óleo) apresentam toxicidade aguda frente ao organismo *D. magna* em concentrações elevadas (acima de 300 mg.L⁻¹).
- A água tratada com os extratos salinos da semente integral de *M. oleifera* e da semente sem óleo, também apresentou toxicidade, tanto na fração sobrenadante quanto na sedimentada, o que indica que a toxicidade não é reduzida após o processo de coagulação/floculação/sedimentação.
- No teste crônico realizado com *D. magna*, mesmo utilizando concentrações baixas, que variaram de 1 a 15 mg.L⁻¹, foram verificados danos causados pelo extrato de *M. oleifera*. Os grupos que foram mantidos em concentrações de 1 e 5 mg.L⁻¹ do extrato de *M. oleifera*, apresentaram valores de mortalidade, fecundidade e crescimento muito próximos aos do grupo controle. Já nos grupos de 10 e 15 mg.L⁻¹ a mortalidade havia chegado a 100% antes do término do experimento (21 dias). Além disso, o parâmetro fecundidade também foi muito afetado. Neste teste não foi possível distinguir o processo responsável pela mortalidade dos organismos, podendo ser devido à interações entre as algas utilizadas como alimento e o coagulante, ou então devido exclusivamente à presença de compostos tóxicos.
- A diferença de toxicidade entre os extratos salinos e o extrato aquoso foi constatada, sendo o primeiro tóxico em concentrações elevadas (acima de 300 mg.L⁻¹), enquanto o último não apresentou toxicidade nem mesmo nas maiores concentrações avaliadas (400, 500 e 600 mg.L⁻¹). Isto deve-se, provavelmente, ao maior potencial de remoção de proteínas coagulantes através da extração salina do que quando comparada à extração aquosa.

- Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que os extratos da *M. oleifera* podem ser considerados seguros desde que utilizados em baixas concentrações (de 50 a 200 mg.L⁻¹ aproximadamente). Apesar da toxicidade encontrada, as concentrações são relativamente elevadas, realidade difícil de ser encontrada no meio ambiente devido às diluições que ocorrem nos corpos hídricos. Entretanto, os resultados encontrados no teste crônico, alertam que até mesmo em baixas concentrações, durante períodos prolongados, é possível identificar alterações causadas pelo extrato, inclusive mortalidade dos organismos.

6.1 RECOMENDAÇÕES

Como recomendações para trabalhos posteriores, sugere-se:

- Sabe-se que em organismos expostos a uma mistura de compostos, como é o caso de partículas sólidas suspensas e substâncias tóxicas, é difícil prever e interpretar os resultados de toxicidade. Devido a isto, sugere-se que mais estudos sejam desenvolvidos, a fim de diferenciar os efeitos tóxicos causados pelas partículas de coagulante suspensas no meio hídrico, dos efeitos causados por possíveis substâncias tóxicas presentes no extrato. Uma sugestão, é que sejam realizados bioensaios com *D. magna* após a etapa de filtração para que seja minimizada a interferência das partículas suspensas do coagulante.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713:** Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2009.
- ACHON, C. L. **Ecoeficiência dos sistemas de tratamento de água à luz dos conceitos da ISO 14.001.** 2008. 227 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- ADESINA, B. T.; OGUNTUGA, A. O. Histopathological changes in the gills of freshwater fish, *Oreochromis niloticus* (L.) juveniles exposed to *Moringa oleifera* (Lam.) fresh root-bark extract. **Toxicology Letters.** v. 189S, 2009.
- AL-SAMERAIY, M. A novel water pretreatment approach for turbidity removal using date seeds and pollen sheath. **Scientific Research.**v.4, p. 79-92, 2012.
- ANDRIOLLI, A. C.; SANTOS, D. S.; TEIXEIRA, S. C. G.; TEIXEIRA, L. R.; BERALDO, H.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridiniformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe (III) utilizando *Artemia salina*. **Revista Saúde e Ambiente.** v. 8, n. 2, p. 19-23, 2007.
- ANTUNES, S. C.; CASTRO, B. B.; GONÇALVES, F. Effect of food level on the acute and chronic responses of Daphnids to lindane. **Environmental Pollution.** v. 127, p. 367-375, 2004.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater.** 20th ed., Washington, D.C. 1999.
- ASARE, G. A.; GYAN, B.; BUGYEI, K.; ADJEI, S.; MAHAMA, R.; ADDO, P.; OTU-NYARKO, L.; WIREDU, E. K.; NYARKO, A. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 139, p. 265– 272, 2012.
- AWODELE, O.; OREABBA, I. A.; ODOMA, S.; SILVA, J. A. T.; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). **Journal of Ethnopharmacology.** v. 139, p. 330– 336, 2012.
- BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; SOLERA-HERNÁNDEZ, C. Surface water and wastewater treatment using a new tannin-based coagulant - Pilot plant trials. **Journal of Environmental Management.** v. 91, p. 2051-2058, 2010.
- BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; DÁVILA-ACEDO, M. A. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. **Journal of Hazardous Materials.** v.186, p. 1704-1712, 2011.
- BERGAMASCO, R.; BOUCHARD, C.; SILVA, F. V.; REIS, M. H. M.; FAGUNDES-KLEIN, M. R. An application of chitosan as a coagulant/flocculant in a microfiltration process of natural water. **Desalination.** v. 245, p. 205–213, 2009.

BEYERS, D.W.; RICE, J.A.; CLEMENTS, W.H.; HENRY, C.J. Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 56, p. 814–822, 1999.

BGM FOR WINDOWS, Versão 1.0. Copyright Camargo's Cor. Programa baseado no livro de Carmouse, 1994.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 49, p. 807-821, 1985.

BOENIGK, J.; WIEDLROITHER, A.; PFANDL, K. Heavy metal toxicity and bioavailability of dissolved nutrients to a bacterivorous flagellate are linked to suspended particle physical properties. **Aquatic Toxicology**. v. 71, p. 249-259, 2005.

BORBA, L. R. **Viabilidade do uso da *Moringa oleifera* Lam. no tratamento simplificado de água para pequenas comunidades**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 2914 de 12/12/2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de março. 2011.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem animal e vegetal. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

BURATINI, S. V. Utilização do cloreto de potássio como substância de referência no controle da sensibilidade das culturas de *Daphnia similis*. **Resumo VII ECOTOX**, Vitória, ES. 2002.

CALOW, P.; SIBLY, R.M. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. **Functional Ecology**. v. 4, p. 283–288, 1989.

CARDOSO, K. C. **Estudo do processo de coagulação/floculação por meio da *Moringa oleifera* Lam. para obtenção de água potável**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2007.

CARDOSO, K. C.; BERGAMASCO, R.; COSSICH, E. S.; MORAES, L. C. K. Otimização dos tempos de mistura e decantação no processo de coagulação/floculação da água bruta por meio da *Moringa oleifera*. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 30, n. 2, p. 193-198, 2008.

CHASIN, A. A. M.; AZEVEDO, F. A. **As bases ecotoxicológicas da toxicologia**. São Carlos: RIMa. 2003.

CHUANG, P. H.; LEE, C. W.; CHOU, J. Y.; MURUGAN, M.; SHIEH, B. J.; CHEN, H. M. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 232–236, 2007.

DeMOTT, W. R. Feeding selectivities and relative ingestion rates of *Daphnia* and *Bosmina*. **Limnology and Oceanography**. v. 27, n. 3, p. 518-527, 1982.

DEVILLERS, J. **Ecotoxicology Modeling. Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approches and Perspectives**. Volume 2. Rillieux La Pape, França: Editora Springer, 2009.

DIAZ, A.; RINCON, N.; ESCORIHUELA, A.; FERNANDEZ, N.; CHACIN, E.; FORSTER, C. B. A preliminary evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela. **Process Biochemistry**. v.35, p. 391–395, 1999.

DODSON, S. I.; FREY, D. G. Cladocera and other Branchiopoda. In: **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**. THORP, J. H.; COVICH, A. P. 2ª ed. Califórnia:Academic Press. 2001.

ENSERINK, L.; LUTTMER, W.; MAAS-DIEPEVEEN, H. Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. **Aquatic Toxicology**. v. 17, p. 15-26, 1990.

ENSERINK, L.; KERKHOLFS, M. J. J.; BALTUS, C. A. M.; KOEMAN, J. H. Influence of food quantity and lead-exposure on maturations on *Daphnia magna* – Evidence for a trade-off mechanism. **Functional Ecology**. v. 9, p. 175-185, 1995.

ENVIRONMENTAL CANADA. **Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants**. Environmental Technology Centre. Ottawa, Ontario, Canada. 1990.

EPA – U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. EPA-821-R-02-012. Office of Water . Washington DC, 2002.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 2, n. 81, p. 207-216, 2009.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**. v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.

FERREIRA FILHO, S. S.; MARCHETTO, M. Otimização multi-objetivo de estações de tratamento de águas de abastecimento: remoção de turbidez, carbono orgânico total, gosto e odor. **Engenharia Sanitária Ambiental**. v. 11, n. 1, p. 7-15, 2005.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológicos com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FLOHR, L.; CASTILHOS JR, A. B.; MATIAS, W. G. Acute and Chronic Toxicity of Soluble Fractions of Industrial Solid Wastes on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **The Scientific World Journal**. v. 2012, 2012.

FRANCO, M. **Uso de coagulantes extraídos de sementes de *Moringa oleifera* como auxiliar no tratamento de água por filtração em múltiplas etapas**. 2010. 90 f. Dissertação (Faculdade de Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FREITAS, M. C. R.; ANTÓNIO, J. M. S.; ZIOLLI, R. L.; YOSHIDA, M. I.; REY, N. A.; DINIZ, R. Synthesis and structural characterization of a zinc(II) complex of the mycobactericidal drug isoniazid – Toxicity against *Artemia salina*. **Polyhedron**. v. 30, p. 1922-1926, 2011.

GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA, K. R.; HENRIKSSON, H; BRUMER, H.; DALHAMMAR, G. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**. v. 39, p. 2338–2344, 2005.

GLIWICZ, Z. M.; LAMPERT, W. Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. **Ecological Society of America**. v. 71, n. 2, p. 691-702, 1990.

GOULDEN, C. E.; COMOTTO, R. M.; HENDRICKSON, J. A.; HORNIG, L. L.; JOHNSON, K. L. Procedures and recommendation for the culture and use of *Daphnia* in bioassay studies. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment**. PEARSON, J. G.; FOSTER, R. B.; BISHOP, W. E. 1982.

GRABOW, W.O.K.; SLABBERT, J.L.; MORGAN, W.S.G.; JAHN, S.A.A. Toxicity and mutagenicity evaluation of water coagulated with *Moringa oleifera* seed preparation using fish protozoan, bacterial coliphage, enzyme and salmonella assay. **Water SA**. v. 11, n. 1, p. 9-14, 1985.

GRZYBOWSKI, A.; TIBONI, M.; SILVA, M. A. N.; CHITOLINA, R. F.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. The combined action of phytolavicides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 22, n. 3, p. 549-557, 2012.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THRUSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**. v. 11, n. 7, p.714-719, 1977.

HARTMAN, W. A.; MARTIN, D. B. Effect of suspended bentonite clay on the acute toxicity of glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 33, p. 355-361, 1984.

HENTSCHEL, C. C.; TATA, J. T. The molecular embryology of the brine shrimp. **REVIEWS TIBS**. National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, UK. 1976.

HERBRANDSON, C.; BRADBURY, S. P.; SWACKHAMER, D. L. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: I. Interactive effects. **Aquatic Toxicology**. v.63, p. 333-342, 2003a.

HERBRANDSON, C.; BRADBURY, S. P.; SWACKHAMER, D. L. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: II An evaluation of potential interactive mechanisms. **Aquatic Toxicology**. v.63, p. 343-355, 2003b.

HUCKINS, J. N.; FAIRCHILD, J. F.; BOULE, T. P. Role of exposure mode in the bioavailability of triphenyl phosphate to aquatic organism. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 21, p. 481-485, 1991.

JAHN, S. A. A. The traditional domestication of a multipurpose tree *Moringa tenopetala* in Ethiopian Rift Valley. **Ambio**. v.20, p. 244-247, 1991.

JEON, J.; RA, J. S.; LEE, S. H.; LEE, M. J.; YU, S. H.; KIM, S. D. Role of food and clay particles in toxicity of copper and diazinon using *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 73, p. 400-406, 2010.

JÚLIO, M.; FIORAVANTE, D. A.; SELHORST FILHO, O. ; JÚLIO, T. S.; OROSKI, F. I. Avaliação da remoção de cianobactérias e saxitocinas da água bruta afluenta à ETA Pitangui de Ponta Grossa, PR, utilizando os diagramas de coagulação para o cloreto férrico e o reagente de Fenton. **Holos Environment**.v. 9, n. 2, p. 254-273, 2009.

KALAVATHY, M. H.; MIRANDA, L. R. *Moringa oleifera*: A solid phase extract for the removal of copper, nickel and zinc from aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**. v.158, p. 188–199, 2010.

KATAYON, S.; MEGAT MOHD NOOR, M. J.; ASMA, M.; ABDUL GHAN, L. A.; THAMER, A. M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B. C.; SULEYMAN, A. M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 1455-1460, 2006.

KAVITHA, C.; RAMESH, M.; KUMARAN, S. S.; LAKSHMI, S. A. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a fresh water fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v.4, n.7-8, p.681-687, 2012.

KIRK, K. L.; GILBERT, J. J. Suspended clay and the populations dynamics of planktonic rotifers and cladocerans. **Ecological Society of America**. V. 71, n. 5, p.1741-1755, 1990.

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

KNOPS, M.; ALTENBURGER, R.; SEGNER, H. Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. **Aquatic Toxicology**. v.53, p.79-90, 2001.

LAMPERT, W. A method for determining food selection by zooplankton. **Limnology and Oceanography**. v. 19, n. 6, p. 995-998, 1974.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. 3ª ed. Campinas: Átomo, 2010.

LINDSAY, J.; METCALF, J. S.; CODD, G. A. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia spp.* by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). **Toxicon**. v. 38, 995-1001, 2006.

McLACHLAN, C.R.D., Aluminium and the risk for Alzheimer Disease. **Environmetrics**, v. 6, p. 233 – 275, 1995.

MADRONA, G. S. **Extração/Purificação do composto ativo da semente da *Moringa oleifera* Lam. e sua utilização no tratamento de água para consumo humano**. 2010. 196 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná. 2010.

MADRONA, G. S.; SERPELLONI, G.B.; VIEIRA, A. M. S.; NISHI, L.; CARDOSO, K. C.; BERGAMASCO, R. Study of the effect of saline solution on the extraction of the *Moringa oleifera* seed's active component for water treatment. **Water Air Soil Pollut.** v. 211, p. 409-415, 2010.

MÜLLER-NAVARRA, D.; LAMPERT, W. Seasonal patterns of food limitations on *Daphnia galeata*: separating food quality and food quantity effects. **Journal of Plankton Research**. v. 18, n. 7, p. 1137-1157, 1996.

MUYIBI, S. A.; EVISON, L. M. Optimizing physical parameters affecting coagulation of turbid water with *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**. v.29, n.12, p. 2689-2695, 1995.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**. v.32, n.3, p. 781-791, 1998.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**. v.29, n.2, p. 703-710, 1995.

NISHI, L.; MADRONA, G. S.; GUILHERME, A. L. F. VIEIRA, A. M. S.; ARAÚJO, A. A.; UGRI, M. C. B. A.; BERGAMASCO, R. Cyanobacteria removal by coagulation/flocculation with seeds of the natural coagulant *Moringa oleifera* Lam. **Chemical Engineering Transactions**. v. 24, 2011.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for Testing of Chemicals. **Daphnia magna reproduction test**. Paris, 2012.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry** . v. 46, p. 498–504, 2011.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Improvement of extraction method of coagulation active components from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**. v. 33, n. 15, p. 3373-3378, 1999.

OKUDA, T.; BAES, A. U.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa oleifera* seed by salt solution. **Water Research**. v.35, n.2, p. 405-410, 2000.

ÖZACAR, M.; SENGIL, I. A. Effectiveness of tannins obtained from *Valonia sp* as a coagulant aid for dewatering of sludge. **Water Research**. v.34, n. 4, p. 1407-1412, 2000.

ÖZACAR, M.; SENGIL, I. A. Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for coagulation of colloidal particles. **Colloids and surfaces**. v.229, p. 85–96, 2003.

PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 65, p. 982-989, 2011.

PALÁCIO, S. M.; NOGUEIRA, D. A.; MANENTI, D. R.; MÓDENES, A. N.; QUINONES, F. R. E.; BORBA, F. H. Estuda da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina*. **ENGEVISTA**. v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012.

PENNAK, R. W. **Fresh-water invertebrates of the United States**. 3^a ed. Protozoa to Mollusca. John Wiley & Sons. New York. 1989.

PETROBRAS – Petróleo Brasileiro S. A. Avaliações da toxicidade e da biodegradabilidade do Fluorene R2 (Fluoresceína). **Comunicação técnica**. Centro de Pesquisas e desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello. Rio de Janeiro, 2002.

PORTER, K. G.; ORCUTT, J. D.; GERRITSEN, J. Functional response and fitness in a generalist filter feeder, *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea). **Ecological Society of America**. V. 64, n. 4, p. 735-742, 1983.

PRABHU, K.; MURUGAN, K.; NARESHKUMAR, A.; RAMASUBRAMANIAN, N.; BRAGADEESWARAN, S. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 124-129, 2011.

PRITCHARD, M.; CRAVEN, T.; MKANDAWIRE, T.; EDMONDSON, A. S.; O'NEIL, J. G. A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water: An alternative sustainable solution for developing countries. **Physics and Chemistry of the Earth**. v.35, p. 798-805, 2010.

RAMOS, R. O. **Clarificação de água com turbidez baixa e cor moderada utilizando sementes de *Moringa oleifera***. 2005. 248 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2ª ed. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995.

RESGALLA, Jr., C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. **Notas Técnicas Facimar**. v. 6, p. 153-163, 2002.

ROCHA, M. F. G.; AGUIAR, F. L. N.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A. *Moringa oleifera* and *Vernonia* sp. extracts against *Candida albicans* and *Microsporium canis* isolates from dogs and cats and analysis of toxicity to *Artemia* sp. **Ciência Rural**. v. 41, n. 10, p. 1807-1812, 2011.

ROSALINO, M. R. R. **Potenciais efeitos da presença de alumínio na água de consumo humano**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

ROSÁRIO, C. G. A. **Avaliação da disposição de lodo gerado numa estação de tratamento de água em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manto de lodo (UASB)**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Sanitária) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-VELASCO, M.; BELTRÁN-HEREDIA, J. Surface water treatment with tannin-based coagulants from Quebracho (*Schinopsis balansae*). **Chemical Engineering Journal**. v.165, p. 851-858, 2010.

SENGUPTA, M. E.; KERAITA, B.; OLSEN, A.; BOATENG, O. K.; THAMSBORG, S. M.; PÁLSDÓTTIR, G. R.; DALSGAARD, A. Use of *Moringa oleifera* seed extracts to

reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. **Water Research**. v. 46, p. 3646-3656, 2012.

SMIT, C. E.; VAN GESTEL, C. A. M. Effects of soil type, prepercolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 17, n. 6, p. 1132-1141, 1998.

SUNDEFELD JUNIOR, G. C. **Efeitos do recebimento do lodo de estação de tratamento de água pelo sistema de tratamento de esgoto por lodo ativado em bateladas e aeração prolongada do município de Juquitiba, SP**. 2007.108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VAN LEEUWEN, C. J. Short-term toxicity testing and GLP. In: KRUIJF, H. A. M.; ZWART, D.; VISWANATHAN, P. N.; RAY, P. K. **Manual on Aquatic Ecotoxicology**. 1988.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 5, 382-387, 1981a.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G. Report on an intercalibration exercise on a short-term standard toxicity test with *Artemia* nauplii. **INSERM**. v. 106, p. 359-376, 1981b.

YIN, C. Y. Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. **Process Biochemistry**. v.45, p. 1437–1444, 2010.

ZABLONSKI, J. R. **Avaliação da remoção de cianobactérias e cianotoxinas de ambientes eutrofizados por coagulação e membranas filtrantes**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2ª ed. São Carlos: Editora RiMa, 2008.

ANEXO A – SOLUÇÕES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO E ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA *D. magna*

As soluções para preparo do meio de cultivo e água de diluição para *D. magna*, estão listados na Quadro 1, de acordo com a norma ABNT NBR 12713 (2009).

Solução	Reagentes	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123300	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
3	KCl	5800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
4	NaHCO ₃	64800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
5	MnCl ₂ .4H ₂ O	7210	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	LiCl	6120	
	RbCl	1420	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3040	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	335	
	ZnCl ₂	260	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	200	
6	NaNO ₃	548	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	H ₃ BO ₃	5719	
	NaBr	32	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	126	
	NH ₄ VO ₃	1,15	
	KI	6,5	
	Na ₂ SeO ₃	4,38	
7	Na ₂ SiO ₃	21465	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada, deixando em agitação até o clareamento da solução
8	Na ₂ EDTA.7H ₂ O	500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada. Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água processada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121°C por 15 min.
	FeSO ₄ .7H ₂ O	199,1	
9	KH ₂ PO ₄	286	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
10	Hidrocloreto de tiamina	750	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada. Congelar em volume adequado para uso
	Cianocobalamina (vitamina B12)	10	
	D (+) Biotina	7,5	

Quadro 1 - Soluções para preparo de meio de cultivo e água de diluição para *D. magna*

ANEXO B – VOLUME DAS SOLUÇÕES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTIVO PARA *D. magna*

Para preparo de 1 L de meio de cultivo utilizam-se as 10 soluções preparadas no Anexo A, nos volumes apresentados na Quadro 2, de acordo com a norma ABNT NBR 12713 (2009).

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume (mL)	3,2	0,8	0,8	0,8	0,1	0,5	0,2	5,0	0,5	0,1*
* Descongelada e adicionada imediatamente										

Quadro 2 - Volume das soluções para o preparo do meio de cultivo para *D. magna*

O meio de cultivo deve ser aerado para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 hrs, antes da sua utilização.

Caso o pH do meio não esteja entre 7,6 e 8,0 ajustar com soluções de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

Antes de utilizar o meio de cultivo, registrar os valores de oxigênio dissolvido, pH e dureza total.

ANEXO C – VOLUME DAS SOLUÇÕES PARA PREPARO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO PARA *D. magna*

Para preparo de 1 L de água de diluição utilizam-se as 4 primeiras soluções preparadas no Anexo A, nos volumes apresentados na Quadro 3, de acordo com a norma ABNT NBR 12713 (2009).

Solução	1	2	3	4
Volume (mL)	3,2	0,8	0,8	0,8

Quadro 3 - Volume das soluções para preparo da água de diluição para *D. magna*

A água de diluição deve ser aerada para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 hrs, antes da sua utilização.

Caso o pH da água não esteja entre 7,6 e 8,0 ajustar com soluções de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

Antes de utilizar a água de diluição, registrar os valores de oxigênio dissolvido, pH e dureza total.

ANEXO D – PROTOCOLO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE EM *D. magna* UTILIZANDO KCl COMO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

- Preparo da solução inicial:
 - Pesar 1 g de KCl;
 - Dissolver em 200 mL de água de diluição (ANEXO C);

- Preparo das concentrações para o biensaio:

Utilizar os seguintes volumes da solução inicial (Quadro 4) para obtenção das concentrações abaixo:

Solução	Concentração	Volume da Solução Inicial
A	570 mg.L ⁻¹	11,4 mL
B	660 mg.L ⁻¹	13,2 mL
C	700 mg.L ⁻¹	14,0 mL
D	750 mg.L ⁻¹	15,0 mL
E	840 mg.L ⁻¹	16,8 mL

Quadro 4 - Volumes da solução inicial para preparo das concentrações utilizadas no bioensaio de sensibilidade para *D. magna*

- Em balões de 100 mL, completar o volume com água de diluição para obtenção de cada uma das soluções (A, B, C, D e E);
- Passar a solução para béqueres de 50 mL, adicionando 20 ou 40 mL de solução em cada um. Para 20 mL, devem ser utilizados 10 filhotes de *D. magna*, enquanto para 40 mL devem ser utilizados 20 filhotes;
- As concentrações devem ser avaliadas em triplicata;
- O controle negativo deve ser feito apenas com água de diluição;
- O desenvolvimento do ensaio é o mesmo descrito no item 4.2.1;

**ANEXO E – PROTOCOLO PARA TESTE DE SENSIBILIDADE EM *A. salina*
UTILIZANDO DSS COMO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA**

- Preparo da solução inicial:
 - Pesar 10 mg de DSS;
 - Dissolver em 100 mL de água do mar artificial (item 4.2.2);

- Preparo das concentrações para o biensaio:

Utilizar os seguintes volumes da solução inicial (Quadro 5) para obtenção das concentrações abaixo:

Solução	Concentração	Volume da Solução Inicial
A	10,0 mg.L ⁻¹	10,0 mL
B	13,5 mg.L ⁻¹	13,5 mL
C	18,0 mg.L ⁻¹	18,0 mL
D	24,0 mg.L ⁻¹	24,0 mL
E	32,0 mg.L ⁻¹	32,0 mL

Quadro 5 - Volumes da solução inicial para preparo das concentrações utilizadas no bioensaio de sensibilidade para *A. salina*

- Em balões de 100 mL, completar o volume com água do mar artificial para obtenção de cada uma das soluções (A, B, C, D e E);
- Na placa de 24 poços, passar as soluções para os poços de 2 mL e adicionar 10 indivíduos de *A. salina* em cada poço;
- As concentrações devem ser avaliadas em triplicata;
- O controle negativo deve ser feito utilizando apenas água do mar artificial;
- O desenvolvimento do ensaio é o mesmo descrito no item 4.2.2;