

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL  
MESTRADO EM SANEAMENTO AMBIENTAL**

**SUIANNE PRISCILLA PASSOS BARBOSA MONTEIRO**

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA  
UTILIZANDO COMO ORGANISMO-TESTE *Daphnia magna***

**FORTALEZA**

**2009**

SUIANNE PRISCILLA PASSOS BARBOSA MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA  
UTILIZANDO COMO ORGANISMO-TESTE *Daphnia magna***

Dissertação submetida à  
Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Engenharia Civil, da  
Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Engenharia Civil.

Área de concentração: Saneamento  
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra  
dos Santos

FORTALEZA

2009

M779d Monteiro, Suianne Priscilla Passos Barbosa  
Desenvolvimento e aplicação de teste de toxicidade aguda  
utilizando como organismo – teste *Daphnia magna* / Suianne  
Priscilla Passos Barbosa Monteiro , 2009.  
81 f. ; il.; enc.

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos  
Área de concentração: Saneamento Ambiental  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro  
de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental,  
Fortaleza,2009

1. Saneamento. 2. Toxicidade - testes. 3. Águas residuais.  
4. Toxicologia ambiental. I. Santos, André Bezerra dos (orient.) II.  
Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós – Graduação em  
Engenharia Civil. III.Título.

CDD 628

SUIANNE PRISCILLA PASSOS BARBOSA MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA  
UTILIZANDO COMO ORGANISMO-TESTE *Daphnia magna***

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Civil, na área de concentração em Saneamento Ambiental.

Aprovada em:        /        /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Francisco Suetônio Bastos Mota (Examinador interno)

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Eduardo Bosco Mattos Cattony (Examinador externo)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

À minha avó Ana, que durante sua vida sempre torceu pela realização dos meus sonhos. À minha mãe Lúcia, ao meu pai Guilherme, aos meus irmãos Karine e Guilherme Júnior e ao meu esposo Carlo Rannyêr, por compreenderem a necessidade de minhas ausências, pelos incentivos e acima de tudo por acreditarem em mim.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para não desistir.

À minha família, especialmente à minha mãe Lúcia e ao meu esposo Rannyêr, pela ajuda e compreensão durante a pesquisa e a elaboração da dissertação.

Ao Prof. André Bezerra dos Santos, por viabilizar e acreditar na execução desta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFETCE), na pessoa do Prof. Benvindo Gomes, por ter doado *D. magna* e *P. subcaptata*.

À Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (CPRH), na pessoa da Sr<sup>a</sup> Maria do Carmo, por ter doado *S. subspicatus* e por ter auxiliado no início do cultivo.

Ao Prof<sup>o</sup> Vladmir, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC), por ter doado *S. platensis*, e por ter auxiliado na implantação do cultivo das algas.

À Prof<sup>a</sup> Letícia Lotufo do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da UFC, por dirimir dúvidas desta pesquisa.

Ao Prof<sup>o</sup> Denis Abessa da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pela disciplina de Ecotoxicologia, ministrada no Labomar.

À Prof<sup>a</sup> Suzana Loureiro, da Universidade de Aveiro, por dirimir dúvidas sobre o cultivo de *D. magna*.

À Prof<sup>a</sup> Mabel Calina, pelo incentivo no desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro da bolsa de mestrado.

Aos bolsistas do Laboratório de Saneamento (Labosan) da UFC, especialmente, Germana Paiva, Márcia Rodrigues, Inês Cals e Marcos Erick.

A todo corpo docente e aos funcionários do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA).

E a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

## RESUMO

No estado do Ceará, não se tem conhecimento da aplicação de testes de toxicidade, quer com esgoto sanitário, quer com esgoto industrial. Assim, o presente trabalho objetivou implantar o cultivo e o teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia magna* no Laboratório de Saneamento (LABOSAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), conforme Norma Brasileira 12713/2004. Com base nas recomendações desta norma, conseguiu-se cultivar e realizar ensaios de sensibilidade e testes de toxicidade com *D. magna* em efluentes domésticos e industriais. Devido à quantidade insuficiente de neonatos gerados no início do cultivo, elaborou-se curva de crescimento das algas que foram utilizadas como alimento: *Pseudokirchneriella subcaptata* (ex-*Selenastrum capricornutum*), *Scenedesmus subspicatus* e *Spirulina platensis*, fundamentais para o estudo sobre a reprodução de *D. magna*, quando submetida a três diferentes dietas. Neste estudo foi observado que a quantidade de alimento influenciou diretamente na reprodução de *D. magna*. Tanto a *P. subcaptata*, quanto a *S. subspicatus* (algas indicadas pela NBR 12713/2004) se mostraram adequadas na alimentação de *D. magna* na concentração de  $6,5E+06$  céls./mL. *Daphnia*. Também comprovou-se que a *S. platensis* não é tão adequada para a alimentação de *D. magna* quanto as indicadas pela Norma Brasileira. A carta controle foi elaborada e o valor de  $CE_{50_{24h}}$  médio obtido foi comparado com valores reportados na literatura, comprovando que a carta poderia ser utilizada e que os organismos do cultivo estiveram dentro do intervalo de segurança no período dos testes. Os resultados dos testes de toxicidade com o efluente real contendo corantes revelaram que o sistema anaeróbio, além de reduzir cor e DQO, contribuiu para a detoxificação do efluente e que o pós-tratamento aeróbio aumentou a toxicidade. Por fim, os testes de toxicidade com esgoto têxtil mostraram-se ser uma ferramenta imprescindível na avaliação de subprodutos gerados em condições anaeróbias e aeróbias, melhorando o entendimento dos processos de tratamento.

Palavras-chave: teste de toxicidade, esgoto, *D. magna*.

## ABSTRACT

In the Ceará state, as far as we know, toxicity tests were never conducted before, either with sewage or industrial wastewater. Thus the present work aimed to implement the cultivation and application of acute toxicity tests with *Daphnia magna* as test-organism in the Laboratory of Sanitation (LABOSAN) of the Federal University of Ceará (UFC), according to the Brazilian guideline NBR 12713/2004. Based on the recommendations of this guideline, it was possible to cultivate and conduct sensibility experiments and toxicity tests with *D. magna* with both sewage and industrial wastewaters. Because the amount of neonates in the beginning of cultivation was not enough, a growth curve was developed for each of the algae used to feed *D. magna*: *Pseudokirchneriella subcaptata* (ex- *Selenastrum capricornutum*), *Scenedesmus subspicatus* and *Spirulina platensis*. They were tested with three different diets. In this study the amount of food influenced directly *D. magna* reproduction. Both *P. subcaptata* and *S. subspicatus* (algae suggested in the NBR 12713/2004) showed to be a good food source to *D. magna* when the concentration was  $6,5E+06$  cels./mL.Daphnia. It was also verified that *S. platensis* was not good to feed *D. magna* compared to the other algae tested and reported in the guideline. The sensibility letter was created and the EC 50<sub>24h</sub> average achieved was comparable to the values reported in literature, which confirm that the letter could be used and the cultivation organisms were in the security interval of the test period. The toxicity test results using real dye-containing wastewater showed that the anaerobic system decrease color and COD and helped to detoxify the effluent. The aerobic post-treatment increased the toxicity. Finally, the ecotoxicity tests with textile wastewater showed to be an important tool to assess sub-products generated on anaerobic and aerobic conditions, therefore improving the process treatment understanding.

Keywords: toxicity tests, wastewaters, *D. magna*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ecotoxicologia: ciência multidisciplinar .....	16
Figura 2 – A) Esquema geral da Daphnia. B) Daphnia do cultivo do Laboratório de Saneamento Ambiental – Labosan (UFC). .....	22
Figura 3 - Reprodução assexuada e a reprodução sexuada de Daphnia. A) Daphnia fêmea com ovos partenogenéticos. B) Ovo partenogenético. C) Clone de Daphnia A. D) Daphnia fêmea fecundada. E) Daphnia macho. F) Espermatozóides. G) Ovo (reprodução sexuada).....	24
Figura 4 - Fotos das algas indicadas para alimentação de <i>D. magna</i> . A) <i>P. subcaptata</i> . B) <i>S. subspicatus</i> . C) <i>S. Platensis</i> . .....	33
Figura 5 - Vidrarias utilizadas no setor de ecotoxicologia do LABOSAN. A) Azul - para o cultivo de <i>Daphnia</i> . B) Verde - para o cultivo das algas. C) Vermelha - para os testes de toxicidade. ....	39
Figura 6 - Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	46
Figura 7 - Curva de crescimento da alga <i>P. subcaptata</i> .....	47
Figura 8 - Curva de crescimento da alga <i>S. subspicatus</i> .....	48
Figura 9 - Curva de crescimento da alga <i>S. platensis</i> .....	48
Figura 10 - Recipientes contendo quantidades pré-estabelecidas de alimento para <i>D. magna</i> .....	48
Figura 11 - Média de neonatos gerados quando <i>D. magna</i> foi submetida 1,0E+05, 1,0E+06 e 1,0E+07 céls./mL Daphnia da alga <i>P. subcaptata</i> .....	49
Figura 12 - Média de neonatos gerados quando <i>D. magna</i> foi submetida 3,0E+06, 6,5E+06 e 1,0E+07 céls./mL Daphnia da alga <i>P. subcaptata</i> .....	50
Figura 13 - Média de neonatos gerados quando <i>D. magna</i> foi submetida 3,0E+06, 6,5E+06 e 1,0E+07 céls./Daphnia da alga <i>S. Subspicatus</i> .....	52
Figura 14 - Média de neonatos gerados quando <i>D. magna</i> foi submetida 3,0E+03, 3,0E+04 e 3,0E+05 céls/mL da alga <i>S. platensis</i> . ....	55
Figura 15 - Comparação da coloração de <i>D. magna</i> submetida a diferentes dietas: A) <i>S. subspicatus</i> , B) <i>P. subcaptata</i> e C) <i>S. platensis</i> .....	55
Figura 16 - Média de neonatos gerados quando <i>D. magna</i> é submetida 3,0E+06 céls./mL daphnia de <i>P. subcaptata</i> , 3,0E+06 céls./mL daphnia de <i>S. subspicatus</i> e 1,5E+06 céls./mL daphnia de <i>P. subcaptata</i> + 1,5E+06 céls./mL daphnia de <i>S. subspicatus</i> . ....	56
Figura 17 - Carta-controle da <i>D. magna</i> . ....	58
Figura 18 – Incubação das amostras para teste de toxicidade preliminar.....	59
Figura 19 - Teste de toxicidade definitivo.....	59
Quadro 1 - Representantes típicos dos grupos mais importantes do ambiente aquático.....	18
Quadro 2 - Espécies mais utilizadas em testes de toxicidade .....	19
Quadro 3 – Taxonomia da <i>Daphnia magna</i> . ....	21
Quadro 4 - Classificação taxonômica dos organismos utilizados.....	32
Quadro 5 - Normas brasileiras referentes às metodologias para realização dos testes. ....	36
Quadro 6 - Dietas utilizadas para avaliar o tipo de alimento sobre a reprodução de <i>D. magna</i> . ....	44

Tabela 1 - Estatística descritiva dos dados de reprodução de <i>D. magna</i> submetida à diferentes concentrações da alga <i>P. subcaptata</i> .....	49
Tabela 2 - Estatística descritiva dos dados de reprodução da <i>D. magna</i> para a alga <i>S. Subspicatus</i> .....	52
Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados de reprodução da <i>D. magna</i> para a alga <i>S. platensis</i> .....	54
Tabela 4 - Estatística descritiva dos dados de reprodução da <i>D. magna</i> .....	56
Tabela 5 - Resultados de EC50 obtidos em diferentes pesquisas.....	58
Tabela 6 - Amostras com intervalo de diluições selecionadas no teste preliminar. ....	60
Tabela 7 - Classificação das amostras por meio da CE 50.....	60
Tabela 8 - Valores de CE 5024h, CE 5048h e a classificação das amostras de esgoto têxtil sintético e real.....	61
Tabela 9 - Valores de U.T.24h , U.T.48h de esgoto sintético e real têxtil. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CE	Concentração efetiva
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CPRH	Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos
CV	Coeficiente de Variação
ETE	Estação de tratamento de esgotos
IFCE Ceará	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
IT	Índice de toxicidade
LABOSAN	Laboratório de Saneamento
LIAMAR Residuárias	Laboratório Integrado de Águas de Mananciais e Residuárias
LS	Limite superior
LI	Limite inferior
mL	Mililitro
OD	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial hidrogeniônico
$\sigma$	Desvio padrão
UASB	Reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente
UFC	Universidade Federal do Ceará
UT	Unidade Tóxica

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>14</b>
4.1. OBJETIVO GERAL .....	14
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
4.3. ECOTOXICOLOGIA.....	15
3.3.1. ASPECTOS GERAIS .....	15
3.3.2. MONITORAMENTO ECOTOXICOLÓGICO.....	16
4.4. ORGANISMO-TESTE .....	18
3.4.1. SELEÇÃO DE ESPÉCIE PARA TESTE DE TOXICIDADE .....	18
3.4.2. <i>DAPHNIA MAGNA</i> : TAXONOMIA, CARACTERÍSTICAS GERAIS E UTILIZAÇÃO COMO ORGANISMO-TESTE.....	20
4.5. TESTES DE TOXICIDADE .....	25
4.6. FATORES QUE INFLUENCIAM OS TESTES DE TOXICIDADE .....	29
4.7. CULTIVO E MANUTENÇÃO DE <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	30
3.7.1. ALIMENTAÇÃO DE <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	31
4.8. ENSAIO DE SENSIBILIDADE.....	33
4.9. NORMAS E LEGISLAÇÃO .....	34
4.10. EFLUENTES TÊXTEIS .....	37
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1. CULTIVO - <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	39
4.2. CULTIVO DAS ALGAS: <i>PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPTATA</i> , <i>SCENEDESMUS SUBSPICATUS</i> E <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> .....	40
4.3. ELABORAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ALGAS .....	42
4.4. ENSAIO DE SENSIBILIDADE .....	43
4.5. AVALIAÇÃO DE REPRODUÇÃO PARA DIFERENTES DIETAS.....	43
4.6. TESTE DE TOXICIDADE - <i>DAPHNIA MAGNA</i> .....	45
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1. CURVAS DE CRESCIMENTO DA ALGA <i>P. SUBCAPTATA</i> , <i>S. SUBSPICATUS</i> E <i>S. PLATENSIS</i> .....	47
5.2. REPRODUÇÃO DE <i>D. MAGNA</i> .....	49
5.3. CARTA DE SENSIBILIDADE .....	57
5.4. TESTES DE TOXICIDADE – EFLUENTE TÊXTIL .....	59
5.5. DIFICULDADES ENCONTRADAS DURANTE A IMPLANTAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>D. MAGNA</i> .....	63

<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenfreado crescimento populacional, somado à crescente industrialização como forma de produção e organização do trabalho, vem aumentando o desperdício de matéria-prima e a utilização de diversos produtos químicos, que ao serem dispostos no ambiente são potenciais causadores de inúmeros problemas ambientais, e até mesmo de saúde pública, como é o caso das doenças de veiculação hídrica.

A gravidade do assunto pode ser percebida em um trecho da Agenda 21, capítulo 18: "aproximadamente 80% de todas as doenças de origem hídrica e mais de um terço das mortes em países em desenvolvimento são causadas pelo consumo de água contaminada".

No Brasil, como em grande parte dos países em desenvolvimento, a quantidade de estações de tratamento de esgotos (ETEs) é insuficiente para tratar os esgotos produzidos. Adicionalmente, para os esgotos sanitários, grande parte das ETEs é projetada para remover principalmente matéria orgânica e microrganismos patogênicos. As tecnologias de tratamento capazes de remover nutrientes e compostos tóxicos são encontradas principalmente nas indústrias. Além disso, muitas estações possuem problemas operacionais aliados à falta de manutenção. Então, muitos esgotos são lançados sem tratamento ou tratados inadequadamente, resultando em impactos negativos nos corpos receptores e nos ecossistemas aquáticos, como por exemplo: a redução da diversidade de espécies autóctones, a proliferação de determinadas espécies e a mortandade de organismos aquáticos.

A composição do esgoto, seja ele industrial ou até mesmo doméstico, abrange compostos químicos (orgânicos e inorgânicos), que incluem diversas substâncias tóxicas, que são muitas vezes descartadas nos corpos hídricos. Devido a isto, a análise química torna-se bastante limitada, visto que não se avaliam os efeitos dessas substâncias sobre os seres vivos. No entanto, a ecotoxicologia, com o uso dos testes de toxicidade, possibilita o conhecimento dos efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos. Assim, para um monitoramento e caracterização adequada dos efluentes, recomenda-se o uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas.

Apesar da relevância dos testes de toxicidade, a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC - Brasil), no ano de 2008, identificou somente cinco estados brasileiros que possuem legislação específica utilizando ensaios ecotoxicológicos para controle de efluentes, sendo eles: São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Rio de Janeiro. Entretanto, as Unidades Federativas que não possuem legislação para tal fim, devem seguir a Resolução Nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que em seu capítulo IV, no artigo 34 determina que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor.

No estado do Ceará, não se tem conhecimento da aplicação dos testes ecotoxicológicos, quer com esgoto sanitário, quer com esgoto industrial, ou seja, não se sabe que ETEs em escala real produzem efluentes compatíveis com os padrões de ecotoxicidade. Para tanto, o ponto de partida deste trabalho é validar a realização do teste de toxicidade aguda em laboratório, para se tornar possível uma completa avaliação e previsão dos riscos ambientais.

## 2. OBJETIVO

### 4.1. Objetivo Geral

Implantar o cultivo e o teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia magna* no Laboratório de Saneamento (Labosan) da Universidade Federal do Ceará (UFC), conforme metodologia descrita na Norma Brasileira 12713/2004.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Padronizar os procedimentos laboratoriais para cultivo e para teste de toxicidade recomendados na Norma Brasileira 12713/2004;
- Cultivar *Daphnia magna* conforme metodologia descrita na norma adotada;
- Elaborar manual de Procedimento Operacional Padrão (POP) do Laboratório de Saneamento da UFC;
- Avaliar a sensibilidade das culturas de *Daphnia magna*, utilizando como substância de referência o dicromato de potássio;
- Elaborar carta-controle de sensibilidade;
- Elaborar curva de crescimento da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ex- *Selenastrum capricornutum*), da alga *Scenedesmus subspicatus* e da alga *Spirulina platensis*;
- Avaliar a reprodução de *Daphnia magna* submetida a três diferentes dietas;
- Determinar a toxicidade aguda de esgoto afluyente e efluente têxtil (sintético e real) de planta em escala laboratorial de tratamento de esgoto;
- Preparar o Laboratório de Saneamento da UFC para realização de teste de toxicidade agudo de efluentes domésticos e industriais e lixiviados provenientes das plantas de tratamento em escala laboratorial e real.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 4.3. Ecotoxicologia

##### 3.3.1. Aspectos gerais

O termo ecotoxicologia foi citado pela primeira vez em 1969 pelo Professor René Truhaut, que o definiu como a ciência que descreve os efeitos tóxicos de vários agentes sobre organismos vivos, especialmente sobre populações e comunidades dentro de ecossistemas. A essência da ecotoxicologia se baseia em duas áreas principais: um estudo do ambiente, com origem na ciência da ecologia; e um estudo das interações dos compostos químicos tóxicos com cada organismo vivo - a ciência da toxicologia (CONNELL, *et al.*, 1999).

A definição para ecotoxicologia sugerida por Truhaut durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)* foi amplamente discutida em encontros subsequentes desse comitê. Em 1976, a sua definição foi publicada pelo Comitê Científico do ICSU sobre Problemas Ambientais (SCOPE), como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982; CAIRNS; NIEDERLEHNER, 1995).

Segundo Azevedo e Chasin (2004), o termo ecotoxicologia reúne a designação eco (do grego oîkos - casa, habitat, meio ambiente) e a palavra toxicologia (ciência dos agentes tóxicos, dos venenos e da intoxicação).

A ecotoxicologia é multidisciplinar, combinando as ciências da química, toxicologia, farmacologia, epidemiologia e ecologia com um entendimento das fontes ou origens e os destinos dos produtos químicos no ambiente (Figura 1). Para isso deve ser somado o aspecto gerencial, resultante do aumento da necessidade de regular as atividades humanas e industriais as quais podem provavelmente poluir. A ecotoxicologia busca determinar e avaliar os lançamentos e os destinos dos produtos químicos (especialmente novos

compostos químicos) no ambiente e gerenciar as possíveis conseqüências de sua introdução (CONNELL *et al.*, 1999).

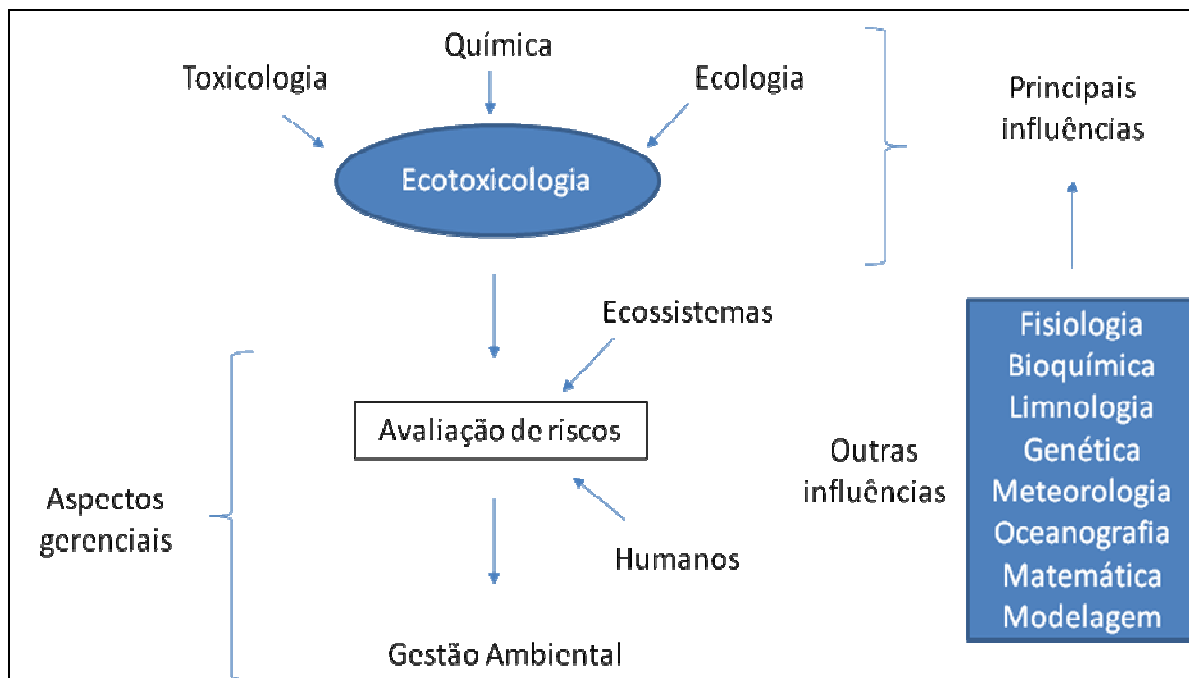


Figura 1 - Ecotoxicologia: ciência multidisciplinar  
Fonte: Adaptado de CONELL *et al.*, 1999.

### 3.3.2. Monitoramento Ecotoxicológico

Em virtude da imensidão de compostos químicos que potencialmente podem chegar às águas, a análise química é muito limitada, abrangendo grupos de diferentes substâncias com comportamento e características químicas iguais, não distinguindo, no entanto, as substâncias individuais que constituem o resultado final da análise. Em geral, os resultados da análise química não permitem uma avaliação dos efeitos das substâncias sobre os seres vivos. Essa lacuna na análise química ambiental é preenchida pelos métodos biológicos de medição; além disso, especificamente com os testes ecotoxicológicos, o controle da qualidade das águas ganha outra dimensão (KNIE; LOPES, 2004).

Dentre as maiores fontes de poluição do ambiente aquático encontram-se os lançamentos de efluentes líquidos domésticos e industriais sem o devido tratamento. Muitos efluentes são extremamente complexos, do ponto de vista

físico-químico, e são fontes de grande diversidade de poluentes para o ambiente aquático. Tendo em vista a complexidade causada pela interação dos agentes químicos, os efeitos biológicos desses efluentes não podem ser caracterizados simplesmente por análises tradicionais. Assim, para a caracterização adequada e controle desses efluentes, a estratégia mais eficiente é o uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas para avaliação e previsão do risco ambiental (BERTOLETTI, 1990; COSTAN *et al.*, 1993).

Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990; HARMEL, 2004 *apud* OLIVI *et al.*, 2008).

A análise ecotoxicológica tem por finalidade saber se, e em qual grandeza, as substâncias químicas, isoladas ou em forma de misturas, são nocivas, e como e onde se manifestam seus efeitos (KNIE; LOPES, 2004).

Segundo KNIE e LOPES (2004), os ensaios relativos ao monitoramento ecotoxicológico podem ser utilizados para diversos fins, como por exemplo, para:

- Avaliação do risco potencial de substâncias químicas ao meio ambiente;
- Fiscalização de efluentes;
- Controle da eficiência de estações de tratamento de águas residuárias;
- Identificação de fontes poluidoras;

O campo das aplicações dos testes ecotoxicológicos também abrange:

- Determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos e lixiviados de resíduos sólidos;
- Estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos e avaliar a necessidade de tratamento desses efluentes quanto às exigências ambientais;
- Avaliar a sensibilidade de organismos aquáticos quando expostos a diferentes substâncias químicas.

#### 4.4. Organismo-teste

##### 3.4.1. Seleção de espécie para teste de toxicidade

O emprego de muitas espécies aptas para a realização de testes de toxicidade excede a capacidade, técnica e financeira, de grande parte dos laboratórios. Por isso, ecotoxicologistas selecionaram representantes típicos dos grupos mais importantes do ambiente aquático, levando em consideração os diferentes níveis tróficos, como mostra o Quadro 1.

<b>Níveis tróficos</b>	<b>Grupos taxonômicos</b>
Produtores primários	Algas, outros vegetais, bactérias autótrofas
Consumidores primários	Protozoários, rotíferos
Consumidores secundários	Crustáceos, moluscos, vermes, equinodermos
Consumidores terciários	Peixes, anfíbios, répteis, insetos, aves, mamíferos
Decompositores	Fungos, bactérias

Quadro 1 - Representantes típicos dos grupos mais importantes do ambiente aquático.  
Fonte: Zagatto e Bertolletti (2008) e Knie e Lopes (2004).

Ao selecionar uma espécie para a utilização em testes de toxicidade, é preciso observar alguns princípios básicos. O primeiro é a sensibilidade, que deve ser relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo, assim, boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Outro critério necessário é a disponibilidade de organismos, que é facilmente atendida quando se utilizam espécies que possibilitam o cultivo contínuo em laboratório. O uso de espécies com ampla distribuição geográfica também é bastante recomendável. Por fim, devem-se buscar espécies com estabilidade genética e que possibilitem a obtenção de lotes uniformes de organismos. Não existe uma espécie que atenda a todos esses requisitos para todos os ecossistemas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Da multiplicidade de organismos - teste, utilizados nos anos 50 e 60, alguns se cristalizaram nos laboratórios líderes em diferentes países, sendo encontrados atualmente na maioria dos laboratórios ecotoxicológicos do

mundo. Os critérios decisivos da escolha das espécies foram as boas experiências com seu manuseio e a sua importância na cadeia alimentar, bem como, a sua ampla disseminação e fácil disponibilidade. As bactérias *Pseudomonas putida* fazem parte desses organismos e, a partir do final dos anos 70, as fotobactérias *Vibrio fischeri*, as algas *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum*, os microcrustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* e peixes como *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Leuciscus idus* ou *Poecilia reticulata*, dentre outros (KNIE; LOPES, 2004).

O Quadro 2 apresenta uma lista das espécies mais utilizadas em testes de toxicidade para diferentes níveis tróficos.

<b>Grupo Taxonômico</b>	<b>Espécies</b>
Algas de água doce	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>
Algas de água marinha	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Asterionella japônica</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Champia parvula</i>
Microcrustáceos de água doce	<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Hyalella azteca</i> , <i>Hyalella meinerti</i>
Microcrustáceos de água marinha	<i>Mysidopsis Bahia</i> , <i>Mysidopsis juniae</i> , <i>Leptocheirus plumulosus</i> , <i>Tiburonella viscana</i> , <i>Artemia salina</i>
Moluscos de água marinha	<i>Mytilus edulis</i> , <i>Crassostrea rhizophorae</i>
Equinodermos	<i>Arbacia lixula</i> , <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Arbacia punctulata</i>
Peixes de água doce	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Lepomis macrochirus</i>
Peixes de água marinha	<i>Menidia beryllina</i> , <i>Menidia menidia</i> , <i>Cyprinodon variegatus</i>
Insetos de água doce	<i>Chironomus sp.</i> , <i>Hexagenia sp</i>
Bactérias de água doce	<i>Spirillum volutans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Bactérias de água marinha	<i>Vibrio fischeri</i> ( <i>Photobacterium phosphoreum</i> )

Quadro 2 - Espécies mais utilizadas em testes de toxicidade  
Fonte: Zagatto e Bertoletti (2008).

Para que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado é recomendável a realização de testes para mais de uma espécie representativa da biota

aquática, de preferência pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Assim, por meio do resultado obtido com o organismo mais sensível, seja possível estimar com mais segurança o impacto do contaminante no corpo d'água receptor (RIBO, 1997; GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990; REGINATTO, 1998 *apud* OLIVI *et al.*, 2008).

Zagatto e Bertolotti corroboram o acima citado afirmando que é importante, na avaliação de toxicidade, utilizar organismos de níveis tróficos diferentes, mas que não há a necessidade de utilizar mais de uma espécie de um mesmo grupo de organismos, pois geralmente espécies de um mesmo grupo têm sensibilidades semelhantes, e, inversamente organismos de níveis tróficos diferentes, podem ter sensibilidades distintas. Sloof *et al.*(1986) analisaram uma grande base de dados de toxicidade de literatura referentes a testes com uma espécie e com várias espécies (em nível de comunidade ou ecossistema) e concluíram que os testes em nível de ecossistema (com várias espécies) não conduziram a resultados muito diferentes daqueles obtidos com uma única espécie. Assim, não houve evidências de que os prognósticos de efeitos tóxicos baseados em testes com uma espécie não sejam confiáveis.

Buratini, Bertolotti e Zagatto (2004) compararam a sensibilidade entre *Daphnia magna* e *Daphnia similis*. Foram analisados dados de testes de toxicidade com alguns metais, fenol e alguns efluentes. Os valores de CE50<sub>24h</sub> não apresentaram diferenças expressivas do ponto de vista ecotoxicológico, isto é, as CE50 para as duas espécies foram menores do que um fator de duas vezes. Assim, os autores concluíram que *D. similis* apresentava sensibilidade semelhante à da espécie *D. magna*, a qual é internacionalmente recomendada.

#### 3.4.2. *Daphnia magna*: Taxonomia, características gerais e utilização como organismo-teste

Os branquiópodos são de águas doces, mas incluem também algumas formas em águas interiores salobras e estuarinas. Dentro da classe Branchiopoda tem-se a subordem Cladocera, que representa um dos grupos mais característicos de águas doces, sendo popularmente conhecidos como as

“pulgas d’água”. A maioria dos organismos desta subordem apresenta um tamanho entre 0,2 e 3,0 mm ou mais (TAVARES; ROCHA, 2003).

Por questões práticas, relacionadas principalmente com a facilidade de cultivo e importância ecológica, essas espécies aquáticas são utilizadas freqüentemente como organismos-teste, e de forma particular os cladóceros, pois são estes componentes fundamentais na comunidade zooplanctônica, sendo um grupo predominante, que funciona como elo entre os produtores primários e os consumidores de níveis tróficos superiores (MOUNT; NORBERG, 1984).

Dentre os cladóceros, as espécies do gênero *Daphnia* são as mais utilizadas em testes de toxicidade. Sua ampla distribuição geográfica, o importante papel que desempenham no zooplâncton, a reprodução partenogenética (a qual assegura uma uniformidade de resposta dos testes), o curto ciclo de vida com a produção de um alto número de neonatos, fazem os organismos deste gênero ideais para avaliação de toxicidade, em nível mundial (GRANADOS *et al.*, 2004).

Segue no Quadro 3 a taxonomia da *Daphnia magna* segundo o *Integrated Taxonomic Information System*.

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Classe	Branchiopoda
Subclasse	Phyllopoda
Ordem	Diplostraca
Subordem	Cladocera
Família	Daphniidae (Straus, 1820)
Gênero	<i>Daphnia</i> (O. F. Müller, 1785)
Espécie	<i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)

Quadro 3 – Taxonomia da *Daphnia magna*.  
Fonte: <http://www.itis.gov/>

Em geral, os cladóceros caracterizam-se pela segmentação reduzida do corpo, por apresentarem tórax e abdômen fundidos em um tronco, no qual

estão inseridos de quatro a seis pares de apêndices na porção anterior e que termina em estrutura denominada pós-abdômen, que contém uma garra terminal. Apresentam carapaça única, dobrada na porção dorsal, dando impressão de estrutura bivalva, a qual encerra todo o tronco, mas usualmente não a parte cefálica. A cabeça é uma peça compacta, na qual a estrutura mais proeminente é o olho composto. Um ocelo, em geral pequeno, situa-se posteriormente ao olho (BROOKS, 1959) (Figura 2).

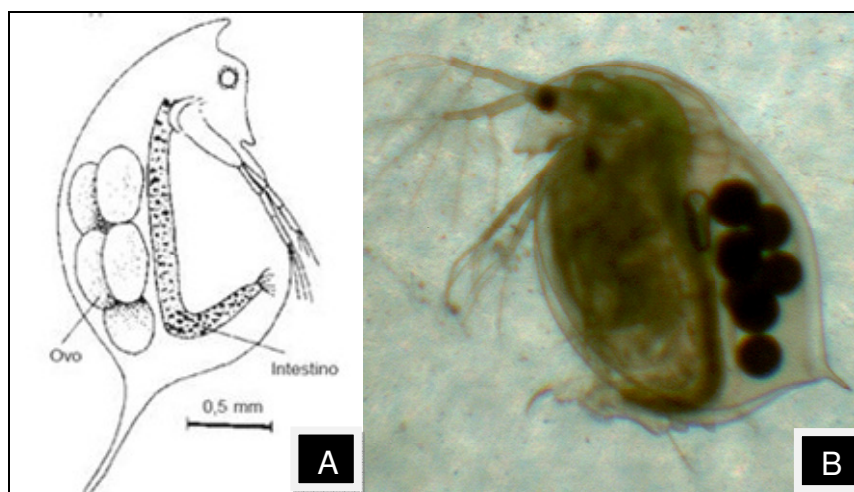


Figura 2 – A) Esquema geral da Daphnia. Fonte: Tavares e Rocha, 2003. B) Daphnia do cultivo do Laboratório de Saneamento Ambiental – Labosan (UFC).

Na cabeça ainda possuem dois pares de apêndices sensoriais: a primeira antena ou antênula, com pelos sensitivos, e a segunda antena, que é o principal órgão de locomoção. Possuem boca com mandíbula, maxilas e maxílulas. Cladóceros também possuem coração e movimento dos corpúsculos sanguíneos pode ser visto em organismos transparentes. As pernas e a parede interna das valvas são as principais superfícies para a ocorrência das trocas gasosas. O intestino percorre todo o corpo e em sua parede mediana há um simples órgão reprodutivo. Quando a reprodução é partenogenética, o número de ovos varia entre 2 (Chydoridae) e 20 (Daphnidae), os quais são depositados em uma câmara, onde se desenvolvem. Os recém-nascidos são denominados de neonatos e são morfológicamente similares aos adultos, porém menores (TAVARES; ROCHA, 2003).

Neste gênero, o ciclo de vida envolve a reprodução assexuada e a reprodução sexuada (Figura 3). Durante o verão ocorre a reprodução assexuada, período em que ovos diplóides partenogenéticos produzem só fêmeas por várias gerações, e uma fêmea pode produzir uma sucessão de incubações, aumentando rapidamente sua população. O desenvolvimento é direto, e quando o jovem deixa a câmara incubatória por baixo da carapaça, muda-se o esqueleto, sendo liberado um novo grupo de ovos no interior da nova câmara incubatória. A conversão de uma incubação para a próxima pode ocorrer em 5 minutos (RUPPERT; BARNES, 1996; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004).

Determinados fatores, tais como alteração da temperatura da água, a redução do suprimento alimentar como resultado de um aumento de população, acúmulo de excretas e redução drástica do nível de água, induzem o aparecimento de machos e ovos fertilizáveis oriundos de meiose. Os ovos fertilizados são grandes, e só são produzidos dois em uma ninhada, um de cada ovário. As paredes da câmara incubatória encontram-se agora transformadas em uma cápsula protetora em forma de sela (efípio), de cor escura. Esta é descartada na próxima muda, ou separando-se, ou permanecendo com o resto do exoesqueleto destacado. Os efípios flutuam, afundam ou aderem a objetos e são altamente resistentes ao frio e dessecação, importantes para a sobrevivência da espécie durante o inverno e para o transporte a novos habitats (RUPPERT; BARNES, 1996; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004).

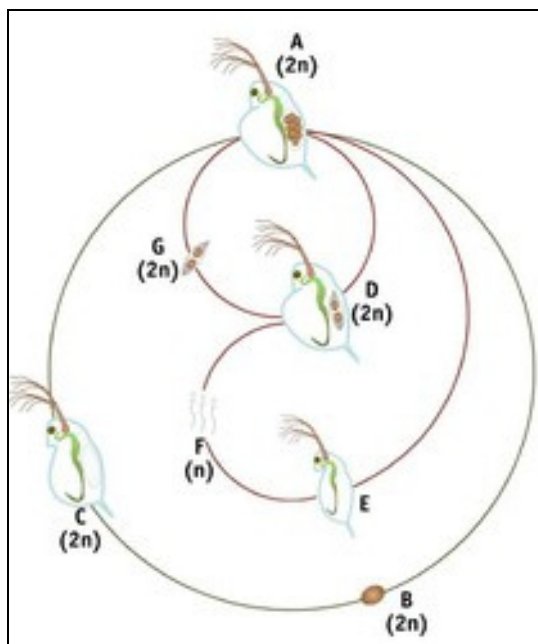


Figura 3 - Reprodução assexuada e a reprodução sexuada de Daphnia. A) Daphnia fêmea com ovos partenogenéticos. B) Ovo partenogenético. C) Clone de Daphnia A. D) Daphnia fêmea fecundada. E) Daphnia macho. F) Espermatozóides. G) Ovo (reprodução sexuada).

Fonte: [http://daphnia\\_magna\\_ac.blogs.sapo.pt/2009/04/06/](http://daphnia_magna_ac.blogs.sapo.pt/2009/04/06/)

Muitos cladóceros sofrem mudanças sazonais na morfologia do corpo, através de sucessivas gerações produzidas partenogeneticamente, fenômeno este denominado ciclomorfose e que é comum entre algumas espécies do gênero *Daphnia*. Os indivíduos gradualmente mudam a forma da cabeça de uma geração para outra, de arredondada para um capacete pontudo. Os fatores associados a esta variação morfológica são vários, mas os mais aceitos são o efeito da temperatura e o da predação (ROCHA; GUNTZEL, 1999).

*Daphnia magna* (Straus, 1820) (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo planctônico, de 5 a 6 mm de comprimento, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, utilizando a filtração para alimentar-se de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero têm larga distribuição no hemisfério norte (NBR 12.713, 2004).

No Brasil é relatada a presença natural das espécies *Daphnia gessnerii*, *D. ambigua* e *D. levis* (MATSUMURA-TUNDISI, 1984), sendo que para o cultivo e os testes de toxicidade em laboratório são bastante utilizadas as espécies *Daphnia similis* e *D. magna*, as quais não ocorrem naturalmente no Brasil (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Este organismo está entre os produtores primários e os consumidores de níveis tróficos superiores (MOUNT; NORBERG, 1984). Entre os cladóceros, *Daphnia magna* é a espécie mais utilizada e tem sido proposta como espécie de referência em múltiplos protocolos normatizados por entidades reguladoras e órgãos internacionais de normatização de testes de toxicidade (MARTÍNEZ-JERÓNIMO *et al.*, 2000; MARTINEZ-JERÓNIMO, 2008).

Para Knie e Lopes (2004) a escolha da *Daphnia magna* como organismo-teste fundamenta-se principalmente nos seguintes critérios:

- a) Os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura uma certa uniformidade de respostas nos ensaios;
- b) A cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes dispêndios;
- c) O manuseio é simples, por causa do tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos;
- d) A espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos;
- e) A espécie é adequada para testes estáticos, semi-estáticos ou de fluxo contínuo;
- f) O ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite usar as daphnias também em testes crônicos;
- g) A *Daphnia magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em laboratórios ecotoxicológicos.

#### **4.5. Testes de toxicidade**

Todas as substâncias químicas têm um potencial tóxico de ação que depende da concentração. Diante disso, os seres vivos desencadeiam a sua capacidade de proteção, que consiste principalmente na metabolização e excreção dos agentes agressores. O resultado da interação entre a metabolização e excreção é o efeito mensurável pelos biotestes (KNIE; LOPES, 2004).

Deve-se considerar que o efeito tóxico sobre os sistemas biológicos é exercido pela ação combinada de todas as substâncias nocivas presentes no meio, inclusive aquelas que não são tóxicas, mas que afetam as propriedades

químicas ou físicas do sistema, e conseqüentemente as condições de vida dos organismos. Os efeitos podem manifestar-se em diferentes níveis, desde estruturas subcelulares ou sistemas enzimáticos, até organismos completos, populações ou comunidades. Portanto, a toxicidade é a capacidade de uma substância exercer um efeito nocivo sobre um organismo, este efeito pode ser um distúrbio simples ou até a morte que dependerá tanto das propriedades químicas do composto como da sua concentração (KNIE; LOPES, 2004; GRANADOS *et al.*, 2004).

Para Knie e Lopes (2004), o dano é produzido em resposta a uma dose (quantidade da substância por unidade de peso seco do corpo) a que o organismo é exposto. Uma substância pode ser tóxica para um determinado organismo e inócua para outro, razão pela qual os termos tóxicos e toxicidade devem identificar para quais organismos uma substância é tóxica.

A resposta nos organismos-teste é dependente da natureza do composto químico e da dose recebida pelo organismo. A medida da resposta à exposição química ambiental tem se tornado rapidamente um ramo em expansão da ecotoxicologia (CONNELL *et al.*, 1999).

Os testes de toxicidade são ensaios nos quais um número conhecido de organismos é exposto aos agentes estressantes por períodos conhecidos de tempo e, posteriormente, os efeitos são avaliados quanto à sobrevivência ou mortalidade dos organismos, bem como efeitos comportamentais, morfológicos e fisiológicos (RAND; PETROCELLI, 1985 *apud* FALONE, 2007).

Os primeiros poluentes avaliados quanto à sua toxicidade foram os dos efluentes industriais, com realização de testes entre 1863 e 1917, e a partir da década de 1930 foram implementados alguns testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa / efeito de substâncias químicas e despejos líquidos (RAND, 1995). Os peixes foram os primeiros organismos a serem utilizados em testes de toxicidade. Durante as décadas de 1940 e 1950, aumentaram os trabalhos nesta área, surgiram diferentes métodos de ensaios e os pesquisadores perceberam que diferenças nas condições-teste acarretavam diferentes resultados, demonstrando a necessidade de padronização dos testes (DOUDOROFF *et al.*, 1951 *apud* SLOOF, 1988 *apud* ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Na década de 1980, foram desenvolvidos ensaios de toxicidade de curta duração com as fases mais sensíveis de alguns organismos, a fim de aumentar a eficiência e minimizar custos. Esses métodos com microcrustáceos e peixes (de águas continentais e marinhas) foram normalizados (padronizados) e estão mundialmente em uso e fazem parte das exigências legais dos órgãos ambientais de vários países (MACEK, 1980).

Os testes ecotoxicológicos podem ser realizados de três formas distintas: estático, semi-estático e de fluxo contínuo.

O método mais aplicado é o estático, no qual a amostra não é trocada e os organismos-teste permanecem expostos à mesma solução-teste durante o período do ensaio. Em testes com substâncias ou amostras ambientais pouco estáveis, influenciando a composição química da amostra, ou amostras voláteis ou de baixa solubilidade é muito empregado o método semi-estático. Neste, a solução de teste é substituída em intervalos definidos por outra com as mesmas características. O de fluxo contínuo possibilita a renovação permanente da amostra, sendo indicado para amostras de composição instáveis (voláteis, com baixa solubilidade e para questões de bioacumulação e biotransformação) (KNIE; LOPES, 2004).

Segundo a NBR 13373 / 2005, os testes podem ser divididos de acordo com seus efeitos de toxicidade em teste agudo e teste crônico. Assim:

- Teste agudo: método que consiste na exposição de organismos-teste em um curto período de exposição (48h) a várias diluições da amostra ou concentrações de um composto químico para conhecer a diluição ou concentração que causa efeito deletério na mobilidade de 50% dos organismos teste.
- Teste crônico: método que consiste na exposição de organismos a concentrações subletais durante um período que compreende parte ou a totalidade do ciclo de vida do organismo e fornece os efeitos deletérios causados pela amostra na sobrevivência e reprodução.

Efeitos agudos são aqueles que ocorrem rapidamente como resultado de uma exposição de curto tempo a um composto químico. Geralmente, efeitos agudos são relativamente severos. O mais comum medido nos organismos

aquáticos é a mortalidade. Um composto químico é considerado causa de toxicidade aguda se por ação direta ele mata 50% ou mais da população exposta dos organismos teste em um período relativamente curto de tempo (Ex: 96 horas). Já os efeitos crônicos ou subcrônicos são aqueles que provocam modificações deletérias resultantes de exposições por um longo período de tempo (RAND, 1995).

Nos ensaios de toxicidade aguda usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. Em geral, observam-se mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados. Esses critérios são utilizados porque são facilmente determinados e têm significado biológico e ecológico para o ambiente (VAN LEEUWEN, 1988a *apud* ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

De acordo com a NBR 12713 / 2004, os resultados dos testes de toxicidade aguda para *Daphnia magna* podem ser expressos de três formas:

- a) Determinação da CE (I)50: calcula-se a porcentagem de imobilidade para cada concentração em relação ao número total de organismos utilizados. A CE (I)50 deve ser determinada por método estatístico adequado (Ex: Interpolação gráfica, Probitas, Trimmed Spearman-Kaber) e o resultado expresso em porcentagem para efluentes líquidos e águas e em miligramas por litro para substâncias químicas;
- b) Determinação do fator de toxicidade (FT): equivale ao  $CE_{zero}$  e deve ser determinado através da observação direta da mobilidade dos organismos, não sendo calculado estatisticamente. Representa o menor valor de diluição da amostra no qual não se observa imobilidade maior que 10% nos organismos expostos. O resultado deve ser expresso em número inteiro.
- c) Determinação qualitativa: utilizada em amostras sem diluição. O resultado é expresso como “tóxico” ou “não tóxico”, confirmado por análise estatística (Teste de hipóteses e prova exata de Fisher).

Os testes de ecotoxicidade fornecem informações e indicações sobre possíveis riscos e alterações prejudiciais ao meio ambiente, servindo, assim, como sistemas preventivos de proteção e alerta (KNIE e LOPES, 2004).

#### 4.6. Fatores que influenciam os testes de toxicidade

Alguns fatores podem afetar os resultados dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, dentre eles, os fatores bióticos, que estão relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos.

Os organismos jovens são geralmente mais sensíveis às substâncias tóxicas do que os adultos. Por esta razão, recomenda-se o uso de organismos em estágios iniciais de vida em testes de toxicidade. Além disso, todos os organismos utilizados em um determinado ensaio devem ter aproximadamente a mesma idade e devem ser provenientes de uma mesma cultura (USEPA, 2002).

Por outro lado, os principais fatores abióticos que podem interferir nos resultados dos ensaios são: pH, oxigênio dissolvido, temperatura e dureza da água, os quais devem ser monitorados durante o período do mesmo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Abaixo segue um resumo das principais interferências dos fatores abióticos sobre os organismos-teste (KNIE; LOPES, 2004).

- Potencial hidrogeniônico (pH): geralmente, a maioria dos organismos aquáticos resiste a valores de pH na faixa de 6 a 9. Para que se possa medir a toxicidade de uma amostra e não o efeito do pH, as normas de teste em geral prevêm a correção do valor de pH em torno da neutralidade. Ensaio com e sem pH estabilizado levam a resultados muito diferentes, sobretudo quando uma amostra contém substâncias cujo equilíbrio químico depende do pH, e se as formas do estado químico daí resultantes apresentam toxicidade diferentes. Ex: amônia - amoníaco;
- Temperatura: o simples aumento ou queda da temperatura a limites fora da faixa tolerável pelas espécies podem levar à morte dos organismos. Além disso, muda o comportamento biológico, químico e físico de amostras;
- Oxigênio Dissolvido (OD): a biodegradação de matéria orgânica em uma amostra ocorre mais rapidamente a temperatura elevadas,

levando à redução de oxigênio dissolvido disponível para os organismos-teste. A NBR 12713 / 2004 afirma que OD no final do teste sendo inferior a 1,0 mg/L pode interferir no resultado do ensaio;

- Dureza: a dureza total da água (definida principalmente pelo teor de íons de cálcio e de magnésio) sempre correlacionada com o valor de pH, pode influenciar significativamente a sensibilidade dos organismos-teste às substâncias químicas. Geralmente, em água de baixa dureza, daphnias e peixes reagem mais suscetivelmente a substâncias do que em água com elevada dureza, mesmo que as águas, além dessa diferença, tenham idêntica composição química básica.

#### **4.7. Cultivo e manutenção de *Daphnia magna***

O desenvolvimento de técnicas de cultivo e a manutenção de organismos em laboratório possibilitam gerar informações importantes sobre os processos fisiológicos e de crescimento. Em condições experimentais, em laboratório, pode-se controlar as variáveis ambientais e biológicas que limitam o crescimento e desenvolvimento dos organismos, possibilitando-lhes atingir taxas de crescimento e reprodução que dificilmente alcançariam na natureza.

No caso do organismo *D. magna*, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) na NBR 12713 / 2004 especifica um método para avaliação da toxicidade aguda de amostras líquidas, bem como descreve a manutenção dos cultivos. Recomenda-se que os organismos sejam cultivados em lotes de até 25 adultos por litro de água de cultivo, com luminosidade difusa e fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 18°C a 22°C. A água de cultivo deve ser renovada, no mínimo uma vez por semana e a alimentação deve ser fornecida diariamente, evitando-se deixar os organismos por mais de dois dias sem alimentação.

Para o controle da qualidade dos cultivos de *D. magna* é necessário estabelecer as características reprodutivas da população, monitorando seu ciclo de vida, assim como identificar a sensibilidade dos organismos através da carta controle com um composto tóxico de referência.

Sabe-se que variáveis como temperatura e dureza podem influenciar tanto no cultivo dos organismos como nos testes de toxicidade (LEWIS; MAKE, 1981; PERSOONE *et al.* 1989 *apud* BEATRICI, 2001). Dentre todas as variáveis, no entanto, a dieta a qual os organismos são submetidos tem-se mostrado como fator determinante no seu desenvolvimento (KERSTING; VAN DER LEEUW, 1976; LEWIS; MAKE, 1981; VENKATARAMAN *et al.*, 1986; VIJVERBERG, 1989; LEI *et al.*, 1990; KAWBATA e URABE, 1998 *apud* BEATRICI, 2001).

### 3.7.1. Alimentação de *Daphnia magna*

Algas são seres presentes em sistemas aquáticos (ou zonas úmidas), fotossintetizantes (dotados de clorofila “a”) em sua grande maioria e apresentam estrutura vegetativa conhecida como talo, cuja diferenciação celular é caracteristicamente pequena ou nula. Assim, o termo “alga” é completamente desprovido de valor taxonômico, pois designa organismos muito distintos entre si quanto à origem, composição química e morfologia. Envolve seres unicelulares e multicelulares, a partir do qual derivam os termos: microalgas (algas com dimensões microscópicas) e macroalgas (algas com dimensões macroscópicas) (LOURENÇO, 2006).

Microalgas apresentam extraordinária importância ambiental, constatada simplesmente pelo reconhecimento de que a grande maioria dos ecossistemas aquáticos depende de algas para seu funcionamento. Uma notável aplicação atual dos cultivos de microalgas envolve a produção de biomassa para uso na alimentação de animais de interesse comercial ou científico (LOURENÇO, 2006).

Segundo a NBR 12713 / 2004 vários tipos de algas verdes unicelulares podem ser utilizados para alimentação de *Daphnia magna*, como, por exemplo, *Scenedesmus subspicatus*, que quando utilizada recomenda-se a quantidade de aproximadamente  $10^6$  células/mL.daphnia. Estas algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento.

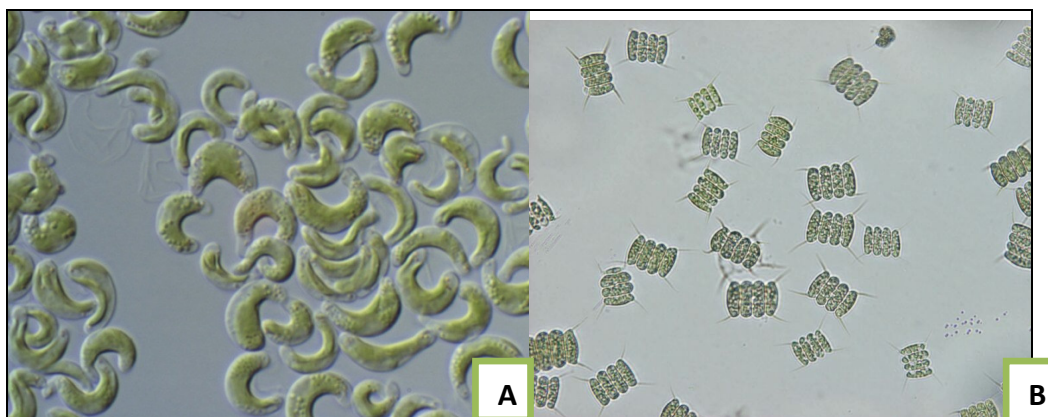
Em geral, tem-se que as algas mais utilizadas na alimentação de *Daphnia sp.* são *Pseudokirchneriella subcaptata* (antes denominada de

*Selenastrum capricornutum*), *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, etc. Seguem o Quadro 4 e a Figura 4, contendo a classificação taxonômica, segundo *Integrated Taxonomic Information System* e as fotos dos organismos utilizados nesta pesquisa, respectivamente:

<b>Nome Científico</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i>	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	<i>Spirulina Platensis</i>
<b>Reino</b>	Plantae	Plantae	Monera
<b>Filo</b>	Chlorophyta	Chlorophyta	Cyanophycota
<b>Classe</b>	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Cyanophyceae
<b>Ordem</b>	Chlorococcales	Chlorococcales	Nostocales
<b>Família</b>	Scenedesmaceae	Scenedesmaceae	Oscillatoriaceae
<b>Gênero</b>	<i>Selenastrum</i> (Kuetzing, 1845)	<i>Scenedesmus</i>	<i>Spirulina</i> (Turpin Ex Gomont, 1893)
<b>Espécie</b>	<i>Selenastrum capricornutum</i> (Printz)	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	<i>Spirulina platensis</i>

Quadro 4 - Classificação taxonômica dos organismos utilizados.

Fonte: adaptado de <http://www.itis.gov/>



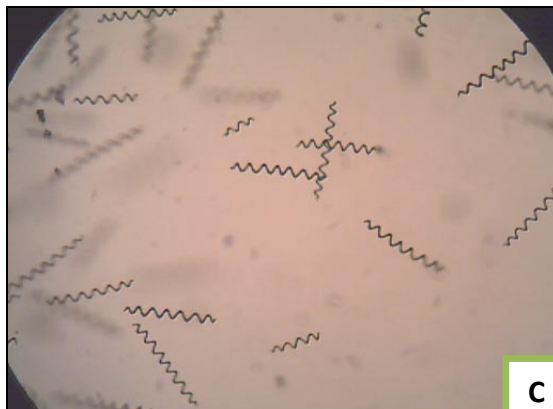


Figura 4 - Fotos das algas indicadas para alimentação de *D. magna*. A) *P. subcaptata*. B) *S. subspicatus*. C) *S. Platensis*.

Fonte A: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0035.jpg>.

Fonte B: <http://www.sinice.cz/res/image/collection/Scenedesmus.jpg>.

Fonte C: <http://www.kingdnarmsa.cn/en/images/RD1.jpg>.

*Selenastrum capricornutum* atualmente denominada *Pseudokirchneriella subcaptata* e *Scenedesmus subspicatus* além de serem utilizadas na alimentação de zooplâncton, também são organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos, sendo recomendadas por protocolos nacionais e internacionais.

Quando as algas são utilizadas na alimentação, a concentração desse alimento é um fator determinante no desenvolvimento e na sobrevivência dos organismos em cultivo. Microalgas podem crescer rapidamente em cultivo, portanto, é essencial que o crescimento das populações em cultivo seja acompanhado para determinar o momento ótimo para coleta e utilização da biomassa formada. O desenvolvimento de cultivos de microalgas pode ser acompanhado por contagens de células por microscopia, contagens de células por aparelhos, medida de clorofila, espectrofotometria, fluorimetria, etc (TAVARES; ROCHA, 2003; LOURENÇO, 2006).

#### 4.8. Ensaio de Sensibilidade

A forma, prevista em várias normas e instruções técnicas, para medir os efeitos das grandezas de influência externas a organismos-teste e suas condições de vida no laboratório, é a execução de um ensaio com uma

substância de referência, procedimento conhecido como teste de sensibilidade. Esses testes podem ser considerados como sistema biológico de calibração dos procedimentos laboratoriais (KNIE; LOPES, 2004).

A NBR 12713 / 2004 recomenda que o ensaio de sensibilidade seja realizado mensalmente e indica como substância de referência: o cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de potássio (KCl), o sulfato de cobre pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), o dodecil sulfato de sódio (DSS) e o dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

O registro das respostas à substância de referência é expresso da mesma forma que no teste de toxicidade, em valores de  $\text{CE}_{50}$ , e é utilizado para demonstrar a estabilidade das respostas biológicas. A precisão das respostas é calculada através de carta-control, que é a ferramenta de registro que estabelece os intervalos aceitáveis de variação da resposta dos organismos-teste à substância de referência, com uma margem de confiança de 95%. Esta carta evidencia a estabilidade da resposta biológica e a repetibilidade (exatidão) dos resultados obtidos. Inicialmente ela pode ser construída com no mínimo cinco resultados e, posteriormente, deve-se continuar realizando os ensaios de sensibilidade para inserir novos valores até completar uma série de vinte resultados.

#### **4.9. Normas e legislação**

Por muitos anos vários países foram omissos na inclusão de critérios ecotoxicológicos em normas ambientais, pois se sustentavam em padrões de qualidade ambiental que levavam em consideração níveis máximos permitidos para alguns contaminantes que eram selecionados segundo seus efeitos biológicos, mas sem que existisse uma avaliação para determinar se tais padrões eram efetivos em alcançar a proteção da vida aquática

A ecotoxicologia é responsável pela geração do conhecimento que subsidiará a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de riscos ecotoxicológicos potenciais e reais, geradas pela introdução de agentes químicos no ambiente.

Os dados gerados são utilizados na avaliação do risco ambiental e regulamentação de novas substâncias químicas, bem como no estabelecimento de critérios de qualidade da água para preservação das comunidades aquáticas e no controle da toxicidade de efluentes em geral (FALONE, 2007).

Atualmente, vários manuais de agências, institutos ambientais, associações ou organizações apresentam metodologias para ensaios de toxicidade, sendo alguns padronizados, como Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Public Health Association* (APHA), *Society of Environmental Toxicology and Chemistry* (SETAC), *American Water Work Association* (AWWA), *Deutsches Institut für Normung* (DIN), *International Organization for Standardization* (ISSO) e *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008; ESPÍNDOLA *et al.*, 2004).

Em maio de 2008, a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC-Brasil) realizou o “X ECOTOX”, reunindo Órgãos Ambientais do país com o objetivo de avançar na utilização de metodologias em ecotoxicologia. Foi possível identificar que cinco dos estados brasileiros possuíam legislação específica utilizando ensaios ecotoxicológicos para controle de efluentes industriais: São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, além do Rio de Janeiro (<http://setacbrasil.org.br/>).

As Unidades Federativas que não possuem legislação específica para tal fim, devem seguir a Resolução Nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que em seu capítulo IV, no artigo 34 refere-se às condições e padrões de lançamento de efluentes, da seguinte forma:

*“[...] § 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.*”

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente [...]"

Atualmente, há normas brasileiras descrevendo metodologias para realização dos testes (Quadro 5) e leis e resoluções exigindo que estes sejam realizados, demonstrando o avanço nesta área de estudo nos últimos anos. Há, portanto, uma facilidade para a seleção e inserção de metodologias de bioensaios em universidades, órgãos ambientais e outros laboratórios que realizam monitoramento de estações de tratamento de esgotos sanitários e industriais.

ABNT NBR	Ecotoxicologia aquática ou terrestre
12648/2005	Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)
12713/2004	Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Daphnia spp</i> (Crustacea, Cladocera)
13373/2005	Toxicidade crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia spp</i> (Crustacea, Cladocera)
15088/2004	Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes
15308/2005	Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (crustacea)
15350/2006	Toxicidade crônica de curta duração- Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)
15411-1/2006	Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente) Parte 1: Método utilizando bactérias recém-cultivadas
15411-2/2006	Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz <i>Vibrio fischeri</i> (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas
15411-3/2006	Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas
15469/2007	Preservação e preparo de amostras
15470/2007	Toxicidade em sedimento - Método de ensaio com <i>Hyalella spp</i> (Amphipoda)
15499/2007	Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes
15537/2007	Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas

Quadro 5 - Normas brasileiras referentes às metodologias para realização dos testes.  
Fonte: <http://www.abnt.org.br/default.asp?resolucao=1024X768>.

#### 4.10. Efluentes Têxteis

No Brasil, o parque industrial instalado, pela sua grandiosidade, constitui fator de grande importância no setor econômico. Em contrapartida, gera um volume muito grande de efluentes, os quais quando não corretamente tratados, podem conduzir a sérios problemas de contaminação ambiental (HASSEMER; SENS, 2002; KUNZ; PERALTA-ZAMORA; MORAES, 2002).

Dentre as indústrias, as têxteis destacam-se por consumirem grandes quantidades de água e empregarem diversas substâncias químicas em seus processos, produzindo um enorme volume de efluentes, que em sua maioria, apresentam características prejudiciais ao meio ambiente. Dentre elas, tem-se: elevada demanda química e bioquímica de oxigênio, grande quantidade de sólidos suspensos e coloração bastante acentuada, constituindo um dos esgotos mais complexos e problemáticos a serem tratados (AKSU, 2005; AKSU; TEZER, 2005).

Uma das principais características desses efluentes é que os mesmos são altamente coloridos, resultado principalmente dos corantes que são aplicados nas operações de tingimento. É estimado que  $10^9$  kg de corantes são anualmente produzidos no mundo, dos quais 70% pertencem à classe dos corantes azo (ZOLLINGER, 1987). Juntamente com estes, outros corantes como os antraquinônicos e ftalocianinos são amplamente utilizados (CHRISTIE, 2001).

Os corantes são de fácil percepção visual nos cursos de água, mesmo em pequenas concentrações (LOPES, 1999 *apud* DANTAS, 2005). Quando presentes em altas concentrações podem impedir a penetração da luz, prejudicando ou inibindo os processos biológicos. Além dos corantes; auxiliares químicos, tais como sais e surfactantes contribuem para a toxicidade (JIRARATANANON *et al.*, 2000 *apud* DANTAS, 2005) levando à mortandade de peixes e outras formas de vida aquáticas.

Processos de remoção de cor de efluentes têxteis tem sido um constante desafio para a ciência nas últimas décadas, e até o presente não há um único e econômico tipo de tratamento que seja efetivamente capaz de ser empregado nas estações de tratamento de esgotos. Entretanto nos últimos

anos, grandes progressos foram alcançados na área de biotecnologia ambiental aplicada à descoloração de corantes, no qual diferentes microrganismos, como bactérias aeróbias e anaeróbias e fungos mostraram possuir tais propriedades (DOS SANTOS, 2005).

A remoção de cor de corantes azo por bactérias aeróbias, a citar nos sistemas de lodos ativados, é normalmente baixa (10 a 30%), a qual é associada principalmente a adsorção do corante no lodo ativo (DOS SANTOS, 2005a). Isso se dá em decorrência da preferência do acceptor final de elétrons, oxigênio, comparada aos corantes azo, pelos elétrons gerados nos processos oxidativos (produção de ATP) (STOLZ, 2001). Por outro lado sob condições anaeróbias, tais corantes são usualmente os únicos aceptores finais de elétrons, fazendo com que melhores eficiências de remoção sejam alcançadas (60- 80%). Entretanto, durante esse processo redutivo os corantes azo dão origem às aminas aromáticas (usualmente incolores), as quais são recalcitrantes sob condições anaeróbias. Assim antes de qualquer emissão, pós-tratamentos devem ser incluídos de forma a remover as aminas aromáticas, pelo fato de as mesmas serem carcinogênicas (DOS SANTOS, 2005b).

## 4. METODOLOGIA

Este capítulo descreve os procedimentos adotados referentes ao cultivo dos organismos-teste, à realização dos ensaios de sensibilidade, à elaboração da carta controle e aos testes de toxicidade com *Daphnia magna*, bem como, o cultivo e a elaboração das curvas de crescimento das algas utilizadas nas dietas dos organismos-teste.

### 4.1. Cultivo - *Daphnia magna*

O organismo-teste deste estudo, *Daphnia magna*, foi fornecido pelo Laboratório de Análises Integradas de Mananciais e Águas Residuárias (LIAMAR) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE).

A metodologia para cultivo e para realização dos testes segue a NBR 12713 / 2004 (Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda Método de ensaio com *Daphnia* spp).

As vidrarias novas foram lavadas com solução de ácido clorídrico 10%, água da torneira e água destilada, sendo utilizadas exclusivamente na ecotoxicologia e separadas de acordo com uso conforme mostrado na Figura 5.



Figura 5 - Vidrarias utilizadas no setor de ecotoxicologia do LABOSAN. A) Azul - para o cultivo de *Daphnia*. B) Verde - para o cultivo das algas. C) Vermelha - para os testes de toxicidade.

No cultivo de *D. magna* utilizou-se água reconstituída (cuja preparação está descrita no Anexo A), com dureza total ajustada entre 175 a 225 mg CaCO<sub>3</sub>/L e pH variando entre 7,0 e 8,0. A água de cultivo depois de preparada foi aerada, antes de sua utilização, durante 24 horas para a completa

solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Os valores de pH, dureza e oxigênio dissolvido foram medidos e anotados para garantia da sobrevivência e reprodução dos organismos.

Manteve-se em béqueres ou aquários no máximo 25 organismos por 1 L de água de cultivo. Os cultivos foram mantidos em câmaras de germinação (Tecnal - 401) com temperatura ajustada para  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e iluminação difusa com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. A água de cultivo foi mantida na câmara de germinação antes da sua utilização para evitar diferenças de temperatura maior que  $2^{\circ}\text{C}$ .

A água de cultivo juntamente com béqueres e aquários foram trocados duas vezes por semana para a remoção das carapaças, dos excretas e dos neonatos excedentes. Os organismos foram manuseados com pipetas de *Pasteur* com diâmetro compatível ao tamanho dos mesmos. A cada semana iniciou-se o cultivo de novos lotes de organismos para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste. Os organismos com idade superior a quarenta dias eram sacrificados antes de serem descartados, visto que não é uma espécie autóctone.

Para a alimentação das daphnias utilizou-se a *Pseudokirchneriella subcaptata*, durante fase exponencial de crescimento. Inicialmente adotou-se para a alimentação dos cultivos uma concentração de  $1,0\text{E}+06$  células/Daphnia e posteriormente  $3,0\text{E}+06$  células/Daphnia. O alimento foi fornecido diariamente, ou com intervalo máximo de dois dias (nos finais de semana). Para o fornecimento de uma quantidade fixa de algas por daphnia foram elaboradas curvas de crescimento das algas.

#### **4.2. Cultivo das algas: *Pseudokirchneriella subcaptata*, *Scenedesmus subspicatus* e *Spirulina platensis***

A alga *P. subcaptata* (anteriormente denominada de *Selenastrum capricornutum*) foi fornecida pelo (LIAMAR) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE). A alga *S. subspicatus* foi fornecida pela Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos de Pernambuco (CPRH). As cepas unialgas da microalga *S. platensis* foram adquiridas junto ao

Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para cultivo da alga *P. subcaptata* utilizou-se o meio de cultura LC Oligo (preparação descrita no Anexo B) e para a alga *S. subspicatus* utilizou-se o meio CHU (preparação descrita no Anexo C), conforme a norma de toxicidade que descreve o cultivo e o método de ensaio para estas algas (NBR 12648 / 2005). Para o cultivo da *S. platensis* utilizou-se o meio Venkataraman (preparação descrita no Anexo D), conforme metodologia descrita em Oliveira (2001).

As soluções para a confecção do meio LC Oligo e do meio CHU foram preparadas e posteriormente estocadas entre 4°C a 10°C, por no máximo seis meses. Quando os valores de pH dos meios não estavam adequados (entre 6,0 e 8,0 para o LC Oligo e entre 7,0 e 7,2 para o meio CHU) fazia-se o ajuste com soluções de ácido clorídrico (HCl) ou de hidróxido de sódio (NaOH). Estes meios foram agitados durante no mínimo 30 minutos e autoclavados por 15 minutos a 121°C. As soluções para a confecção do meio Venkataraman foram elaboradas no momento de seu preparo.

As culturas-estoque de algas que serviam como inóculo foram mantidas até no máximo por três meses entre 4°C a 10°C em meio sólido de forma a se obter células viáveis para a semeadura. A inoculação em meio líquido foi realizada em ambiente asséptico e as culturas de algas foram mantidas entre 20°C a 30°C, sob iluminação constante até o sétimo dia de crescimento.

Após atingir o crescimento exponencial, as algas foram centrifugadas, o líquido sobrenadante (meio de cultura da alga) descartado e utilizou-se na alimentação a biomassa diluída em água de cultivo para *Daphnia magna*, evitando-se a interferência de nutrientes e compostos que poderiam ser tóxicos aos organismos-teste. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro da suspensão de biomassa em água de cultivo e com o auxílio da curva de crescimento da alga pode-se calcular a quantidade de algas por unidade de volume. Assim, fornecia-se uma quantidade fixa para a alimentação do cultivo das daphnias. O preparo do alimento foi realizado semanalmente e mantido sob refrigeração para posterior utilização na alimentação.

### 4.3. Elaboração das curvas de crescimento das algas

Para elaboração da curva de crescimento da alga, inocularam-se 2 mL de meio de cultivo com algas em fase exponencial ou *log* (fase em que as células começam a dividir-se regularmente a uma taxa constante) em *erlenmeyer* com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo. O experimento foi realizado em triplicata. O acompanhamento do crescimento das algas foi feito mediante uso de câmara de *Neubauer* por contagem direta sob observação em microscópio ótico (Opton 108 - trinocular).

Foram colocados aproximadamente 3 mL de amostra do *erlenmeyer*, em um tubo de ensaio. Com o auxílio de uma pipeta automática colocou-se uma alíquota de 15  $\mu$ L entre a lamínula e a câmara de *Neubauer*, distribuindo-se pela superfície de contagem por capilaridade. Após a sedimentação das algas (aproximadamente três minutos) realizou-se a contagem das algas. Da mesma amostra lia-se a absorbância no espectrofotômetro (Thermo – Nicolet Evolution 100). Para as algas *P. subcaptata* e *S. subspicatus* utilizou-se o comprimento de onda de 750 nm, conforme recomendado na NBR 12648 / 2005 e para *S. platensis* o comprimento de onda foi de 680 nm, com base no estudo realizado por Silva (2004).

A câmara de *Neubauer* tem profundidade de 0,1 mm<sup>2</sup> e volume de 0,9 mm<sup>3</sup>, sendo formada por nove quadrados “grandes”, cada um deles com 1,0 mm<sup>2</sup>. Os quatro quadrados que formam os vértices da câmara são divididos em 16 quadrados menores; o quadrado central de 1,0 mm<sup>2</sup> é subdividido em 25 quadrados menores, cada qual com área de 0, 0025 mm<sup>2</sup> (LOURENÇO, 2006).

Conforme afirma Lourenço (2006), a contagem pode ser realizada de forma parcial contando 5 quadrados (os 4 vértices e o quadrado central) ou cinco quadrados em diagonal. A densidade de células por unidade de volume (mL) é obtida multiplicando-se o número contado pelo fator 50.000. Adotou-se neste estudo a primeira forma de contagem.

A partir dos dados obtidos por contagem direta em câmara de *Neubauer* em microscópio ótico e posterior cálculo da quantidade de células em 1 mL de meio de cultura e leitura da absorbância em espectrofotômetro, pode-se plotar curvas de crescimento, fundamentais para facilitar o fornecimento de

quantidades fixas de alimento por daphnia necessário para avaliar a quantidade e o tipo de alimento sobre a reprodução de *Daphnia magna* quando cultivada em laboratório.

#### **4.4. Ensaio de sensibilidade**

A sensibilidade dos organismos foi testada, pelo menos uma vez por mês, conforme metodologia descrita na NBR 12713 / 2004. Utilizou-se como substância de referência o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) nas concentrações de 0,0, 0,4, 0,8, 1,0, 1,2 e 2,0 mg/L. As diluições foram preparadas a partir da adição de volumes conhecidos de uma solução-estoque de dicromato de potássio de 10 mg/L. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições do ensaio definitivo, em triplicada, com um total de no mínimo 21 organismos por concentração testada, com exceção de que foram mantidos em câmaras de germinação escura e a leitura dos ensaios realizada em 24 horas.

Os ensaios de sensibilidade foram realizados para avaliar a sensibilidade dos organismos quando expostos à substância de referência, como também a repetibilidade do método analítico ao longo do tempo, permitindo comparações interlaboratoriais. A norma recomenda que somente se realize testes de toxicidade quando a carta controle possuir pelo menos cinco resultados e que sejam realizados ensaios até se obter 20 resultados.

A qualidade da água de cultivo e de diluição também foi avaliada indiretamente pelos resultados obtidos na carta-controle de sensibilidade.

Para a elaboração da carta controle de sensibilidade, calculou-se dois desvios-padrão ( $2\sigma$ ), superior e inferior à média obtida. Estes valores foram grafados na carta-controle através de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade.

#### **4.5. Avaliação de reprodução para diferentes dietas**

Como a quantidade de neonatos produzidos no cultivo estava abaixo das reportadas na literatura, buscou-se avaliar a influência do tipo de alimento

sobre a reprodução de *D. magna* em laboratório. Objetivou-se conhecer a menor quantidade de alimento que poderia ser fornecido por daphnia, mas que não prejudicasse significativamente na produção de neonatos, fundamentais para a realização dos testes de toxicidade.

Portanto, separou-se individualmente daphnias alimentadas com  $1,0E+06$  células/organismo de tempo de vida de três, quatro e cinco semanas, e contabilizou-se a quantidade de neonatos de cada daphnia com a finalidade de selecionar as mais aptas à reprodução. Separaram-se cinco neonatos das mais aptas para a realização do experimento “1”, variando somente a quantidade de alimento fornecido. Após o primeiro experimento, verificou-se que a quantidade de alimento fornecido era insuficiente, então aumentou-se a quantidade de alimento do cultivo em geral para  $3,0E+06$  e repetiu-se o procedimento de separação de neonatos para realização do experimento “2”, que variou a quantidade de acordo com os resultados do experimento “1” e o tipo de alga administrada na alimentação. As dietas utilizadas estão descritas no Quadro 6.

Experimento	Dieta	Alga	Células/mL. Daphnia
1	A	<i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	$1,0E+05$
	B		$1,0E+06$
	C		$1,0E+07$
2	D		$3,0E+06$
	E		$6,5E+06$
	F		$1,0E+07$
	G		<i>Scenedesmus subspicatus</i>
	H	$6,5E+06$	
	I	$1,0E+07$	
	J	<i>Spirulina platensis</i>	$3,0E+03$
	K		$3,0E+04$
	L		$3,0E+05$
	M		<i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> + <i>Scenedesmus subspicatus</i>

Quadro 6 - Dietas utilizadas para avaliar o tipo de alimento sobre a reprodução de *D. magna*.

Nota: Para a *Spirulina platensis* considerar organismo/daphnia.

Para cada dieta foram calculadas as principais variáveis de estatística descritiva dos dados de reprodução de *D. magna*, que foram: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação, variância da amostra, mínimo e máximo. Para verificar se os dados obedeciam a uma distribuição normal

utilizou-se o programa *Sigma plot*. Logo após, utilizou-se testes estatísticos que possibilitaram afirmar se as médias obtidas seriam estatisticamente iguais. Quando foram comparados dois valores de médias utilizou-se o Teste “T” para amostras independentes (*MS Excel*) e quando foram comparados três valores utilizou-se ANOVA (*Sigma plot*), e por fim foi estabelecida a melhor concentração de cada alga a ser fornecida como alimento para *D. magna*. Adotou-se como nível de significância o valor de 5%. Os testes estatísticos possibilitaram o cálculo do valor- p, que quando menor que 0,05 (5%), que é o nível de significância adotado, conclui-se que existia diferença estatisticamente significativa e quando o valor-p é maior que 0,05, não existia diferença estatisticamente significativa.

#### **4.6. Teste de toxicidade - *Daphnia magna***

A metodologia adotada para o teste de toxicidade segue as recomendações da NBR 12713 / 2004.

As amostras foram mantidas em frascos de PVC e os testes foram realizados em menos de 12 horas. Na impossibilidade de realização do teste em menos de 12 horas, as amostras foram conservadas em temperatura inferior a 10°C, sem congelamento e iniciou-se o teste em até 48 horas, contadas a partir da coleta.

Foram realizados testes de toxicidade em amostras de esgoto têxtil sintético contendo elevadas concentrações (0,6mM ou 420 mg/L) do corante azo Congo *Red* (CR), e esgoto real proveniente de uma indústria de processamento de algodão, tratados em períodos diferentes em um reator anaeróbio de manto de lodo e fluxo ascendente (UASB). Foram estudados como pós-tratamento dos efluentes do UASB, o sistema de lodos ativados em batelada e o processo de oxidação avançada do tipo catálise homogênea UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Testes preliminares foram realizados para o estabelecimento do intervalo de soluções a serem preparadas para o ensaio definitivo. No teste preliminar utilizou-se a quantidade mínima recomendada na Norma Brasileira, que é de cinco organismos por diluição. As diluições foram de 100, 50, 25, 12.5

e 6.2%. Ao final do teste foi determinada a menor solução-teste que causou imobilidade a 100% dos organismos e a maior solução-teste na qual não se observou imobilidade.

As soluções testes foram preparadas no momento da realização do ensaio e para preparo destas soluções nas diluições necessárias utilizou-se água de diluição (Anexo A). Os valores de pH, dureza e oxigênio dissolvido da água de cultivo foram monitorados. Caso o pH estivesse fora da faixa (entre 7,0 e 8,0) ajustava-se com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), pois valores fora da faixa entre 5,0 e 9,0 poderiam interferir no resultado do ensaio. A dureza deveria estar entre 175 a 225 mg CaCO<sub>3</sub>/L, o oxigênio dissolvido maior que 1,0 mg/L e a temperatura em 20°C ± 2°C antes da transferência dos neonatos.

O teste definitivo consistiu na exposição dos neonatos a diferentes diluições da amostra (conforme apresentado na Figura 6). Os organismos jovens utilizados nos testes continham de 2 h a 26 h e foram obtidos por partenogênese, a partir da segunda postura das *Daphnias* (mãe). Os testes foram realizados em triplicata. Em cada diluição e para o controle foram adicionados no mínimo 21 organismos. Utilizou-se 25 mL de solução-teste em recipientes com capacidade de 50 mL, que foram mantidos em câmara de germinação escura. Foram contados os neonatos mortos nos testes em 24 horas e em 48 horas. Os dados referentes a quantidade de neonatos mortos para cada diluição e controle foram inseridos no programa estatístico *Trimed Spearman Karber* (HAMILTON *et al.*, 1977) para o cálculo de CE 50 (concentração efetiva que provoca imobilidade e / ou mortalidade de 50% dos organismos).

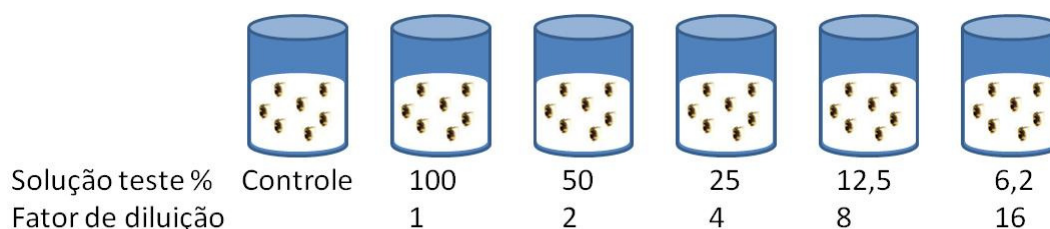


Figura 6 - Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Curvas de crescimento da alga *P. subcaptata*, *S. subspicatus* e *S. platensis*

Foram elaboradas curvas de crescimento das algas *P. subcaptata*, *S. subspicatus* e *S. platensis* (Figura 7, 8 e 9) a partir dos dados obtidos por contagem em câmara de *Neubauer*. As equações de reta obtidas foram elaboradas para fornecer quantidades pré-estabelecidas de alimento para *D. magna* (Figura 10), fundamental para posterior estudo de reprodução do organismo-teste.

Os valores do coeficiente de correlação da reta ( $r$ ) obtidos para as curvas de crescimento das algas foram de 0,9965 para *P. subcaptata*, de 0,9935 para *S. subspicatus* e de 0,9988 para *S. platensis*. Rieder (2000) estabelece uma classificação para os valores de coeficiente de correlação ( $r$ ) que varia desde fraca até fortíssima. Assim, pode-se concluir que os valores de “ $r$ ” encontrados neste estudo (0,9935 a 0,9988) indicam uma correlação dos dados fortíssima.

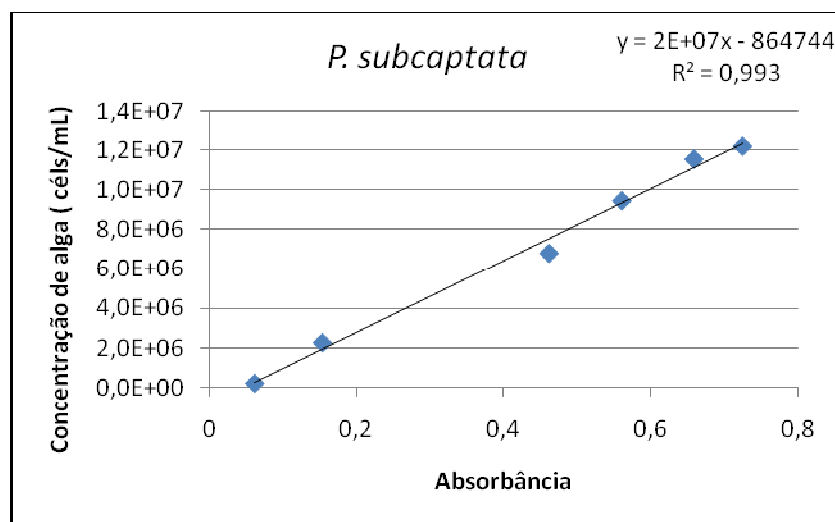


Figura 7 - Curva de crescimento da alga *P. subcaptata*.

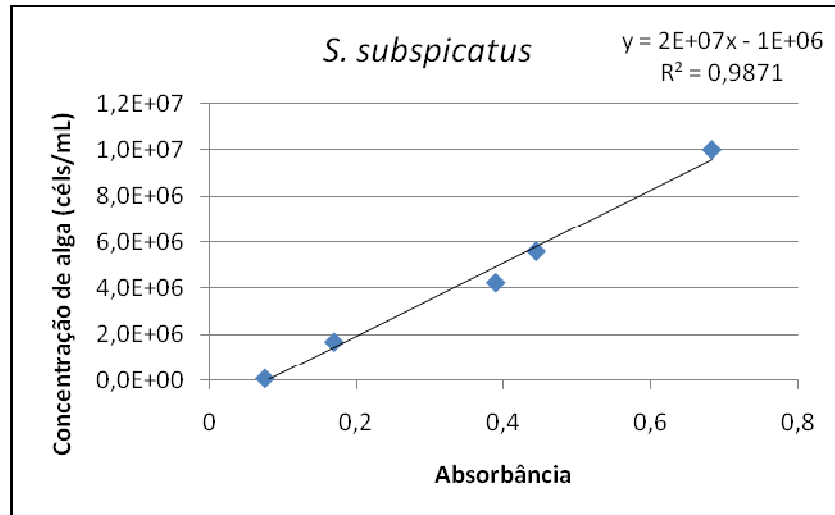


Figura 8 - Curva de crescimento da alga *S. subspicatus*.

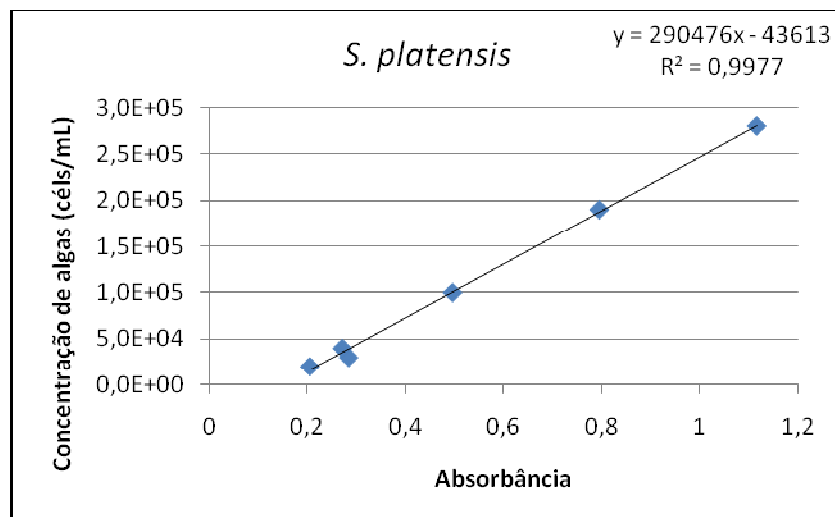


Figura 9 - Curva de crescimento da alga *S. platensis*.



Figura 10 - Recipientes contendo quantidades pré-estabelecidas de alimento para *D. magna*.

## 5.2. Reprodução de *D. magna*

A Tabela 1 apresenta a estatística descritiva dos dados de reprodução. Por sua vez, as Figuras 11 e 12, trazem os resultados das médias de neonatos gerados quando a *D. magna* era submetida à diferentes quantidades da alga *P. subcaptata*.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos dados de reprodução de *D. magna* submetida à diferentes concentrações da alga *P. subcaptata*.

Alga Dieta	<i>P. subcaptata</i>			<i>P. subcaptata</i>		
	A	B	C	D	E	F
Conc. de alga (cél./mL.Daphnia)	1,0E+05	1,0E+06	1,0E+07	3,0E+06	6,5E+06	1,0E+07
Média de neonatos	1,33	3,44	21,50	16,45	23,92	27,90
Mediana	1	4	22	15,50	21	29
Desvio padrão	0,58	1,85	9,40	8,86	11,50	13,68
Coeficiente de variação	0,43	0,54	0,43	0,54	0,48	0,49
Variância da amostra	0,33	3,44	88,36	78,47	132,16	187,19
Mínimo	1	1	4	1	1	1
Máximo	2	7	36	38	42	48

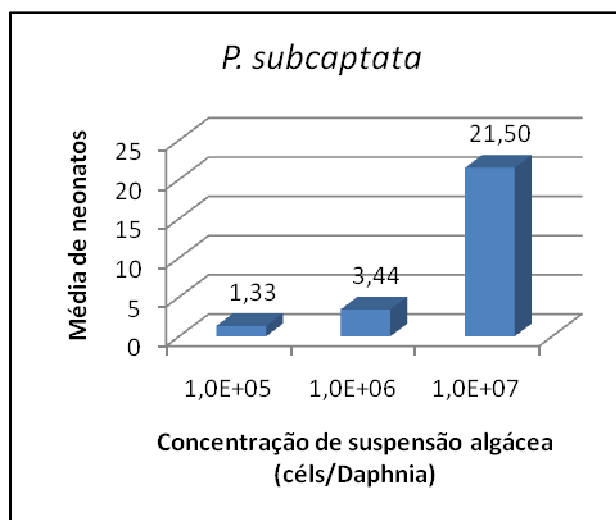


Figura 11 - Média de neonatos gerados quando *D. magna* foi submetida 1,0E+05, 1,0E+06 e 1,0E+07 células/mL Daphnia da alga *P. subcaptata*.

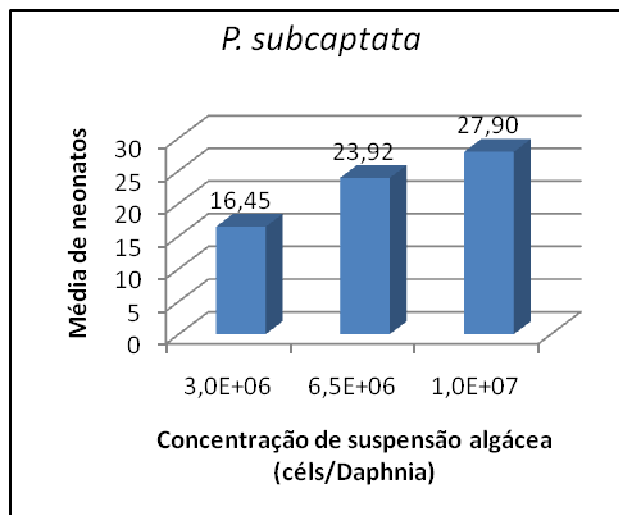


Figura 12 - Média de neonatos gerados quando *D. magna* foi submetida 3,0E+06, 6,5E+06 e 1,0E+07 céls./mL.Daphnia da alga *P. subcaptata*.

Com base nos dados mostrados na Figura 11 pode-se perceber que à medida em que se aumenta a quantidade de alimento, maior a quantidade de neonatos produzidos por organismo. A Tabela 1, bem como a Figura 11 mostram a média de neonatos gerados quando *D. magna* alimentou-se de *P. subcaptata* nas concentrações de 1,0E+05, 1,0E+06 e 1,0E+07 céls./mL.Daphnia. A média mais expressiva de neonatos gerados (21,50) ocorreu quando as *D. magna* alimentavam-se da alga na concentração de 1,0E+07 céls./mL.Daphnia, ou seja, elevou-se a concentração do alimento e, conseqüentemente, aumentou-se a produção de neonatos pela *D. magna*.

No entanto, não somente a falta de alimento, mas também o seu excesso prejudica a sobrevivência desses organismos, visto que pode obstruir o aparelho filtrador dos mesmos e diminuir a concentração de oxigênio dissolvido na água de cultivo (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Como o cultivo realizado na concentração de 1,0E+07 céls./mL.Daphnia, apresentou uma acentuada coloração verde, e houve excesso de sedimento de algas, realizou-se um novo experimento. Manteve-se a mesma concentração de suspensão algácea com a qual se obteve o melhor resultado de reprodução (1,0E+07 céls./mL.Daphnia) e foram inseridas duas concentrações inferiores para efeito de comparação (3,0E+06 e 6,5E+06), conforme observado no gráfico das médias de neonatos obtidas (Figura 12).

Vale ressaltar que na literatura consultada (NBR 12713 / 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), as concentrações de algas indicadas para alimentação de *D. magna*, de uma forma geral, são inferiores a 1,0E+07 céls./mL.Daphnia.

Neste estudo, para *P. subcaptata*, as concentrações 6,5E+06 e 1,0E+07 céls./mL.Daphnia forneceram os melhores resultados, quando as médias de reprodução de neonatos foram de 23,92 e 27,90, respectivamente (Figura 12). Para verificar a equivalência estatística dessas médias, realizou-se análise estatística com Teste - “t” para duas amostras independentes presumindo variâncias equivalentes (*MS-Excel*), com um nível de significância de 5%. O valor-p obtido foi de 0,289, que por ser maior que 0,05 (5%) demonstrou não haver diferença estatística significativa entre estes valores de médias. Portanto, a alimentação de 6,5E+06 (céls./mL.Daphnia) foi a melhor dieta quando utilizada a alga *P. subcaptata*.

Apesar de os valores serem aparentemente diferentes, se tornam estatisticamente iguais devido, principalmente, aos altos valores de desvio-padrão, sendo de 11,5 para a dieta “E” e de 13,68 para a dieta “F”.

Então:

Média de neonatos da Dieta “E” = Média de neonatos da Dieta “F”

Observou-se a diferença aparente entre os valores de médias de neonatos obtidos para os dois experimentos da concentração de alimento 1,0E+07 céls/mL.Daphnia de *P. subcaptata*, referentes à dieta “C” e a dieta “F”. Sabendo-se que os neonatos do primeiro experimento foram obtidos por Daphnias alimentadas com 1,0E+06 e as Daphnias que geraram os neonatos do segundo experimento foram alimentadas com a concentração de 3,0E+06 céls./mL.Daphnia, aplicou-se o teste de hipóteses “T” para duas amostras independentes, presumindo variâncias equivalentes (*MS-Excel*). O valor-p encontrado foi de 0,08, que, apesar de próximo de 0,05, é superior, indicando não haver diferença estatística significativa entre as médias.

Então:

Média de neonatos da Dieta "C" = Média de neonatos da Dieta "F"

O resultado do teste "T" realizado anteriormente confirma que a nutrição materna parece ter pouco efeito na taxa reprodutiva de cladóceros de água doce, como afirmou Pompêu (1999).

A Tabela 2 e a Figura 13 apresentam, respectivamente, a estatística descritiva dos dados de reprodução e o gráfico das médias de neonatos gerados por *D. magna* quando submetidas à diferentes concentrações de suspensão algácea de *S. subspicatus*.

Tabela 2 - Estatística descritiva dos dados de reprodução da *D. magna* para a alga *S. Subspicatus*.

Alga Dieta	<i>S. Subspicatus</i>		
	G	H	I
Concentração de alga (céls/mL.Daphnia)	3,0E+06	6,5E+06	1,0E+07
Média de neonatos	16,89	18,93	20,89
Mediana	16,50	18,00	19,00
Desvio padrão	9,69	5,47	9,94
Coefficiente de variação	0,57	0,29	0,47
Variância da amostra	93,99	29,92	98,77
Mínimo	1	8	5
Máximo	45	28	41

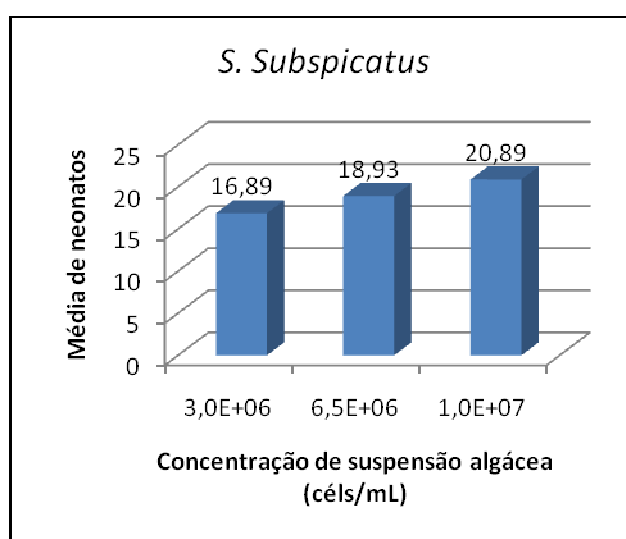


Figura 13 - Média de neonatos gerados quando *D. magna* foi submetida 3,0E+06, 6,5E+06 e 1,0E+07 céls./Daphnia da alga *S. Subspicatus*.

Para *S. subspicatus*, os maiores valores de produção de neonatos foram encontrados para a concentração de  $6,5E+06$  céls./mL.Daphnia (18,93) e para a concentração de  $1,0E+07$  céls./mL.Daphnia (20,89) (como mostra a Figura 13). A análise estatística com Teste -“t” para duas amostras, presumindo variâncias equivalentes, forneceu um valor-p de 0,498, que, por ser maior que 0,05, comprova não haver diferença estatística das médias obtidas. Portanto, a concentração de  $6,5E+06$  céls./mL.Daphnia, igualmente ao ocorrido no experimento com *P. subcaptata*, foi considerada a melhor concentração de alimento quando utilizou-se *S. subspicatus* para *D. magna*.

Então:

Média de neonatos da Dieta “H” = Média de neonatos da Dieta “I”

O teste -“t” para duas amostras, presumindo variância diferente também foi utilizado para verificar se as dietas selecionadas como as melhores para *P. subcaptata* e *S. subspicatus*, ou seja, a dieta “E” e a dieta “H” ( $6,5E+06$  céls./mL.Daphnia), respectivamente, seriam estatisticamente iguais. O valor-p calculado foi de 0,108, maior que 0,05, indicando não haver diferença estatística entre os dois valores. Portanto, confirma-se que tanto a *P. subcaptata* quanto a *S. subspicatus* são adequadas para alimentação de *D. magna* e não possuem diferença significativa na produção de neonatos para a alimentação de  $6,5E+06$  céls./mL.Daphnia.

Então:

Média de neonatos da Dieta “E” = Média de neonatos da Dieta “H”

A NBR 12713 / 2004 recomenda aproximadamente  $1,0E+06$  céls./mL.Daphnia quando utilizada *S. subspicatus* para a alimentação de *D. magna* e a faixa de  $1,0E+06$  a  $5,0E+06$  céls./mL.Daphnia de *P. subcaptata* para *D. similis*. Com este estudo pode-se observar que as quantidades sugeridas na Norma Brasileira possuem uma faixa ampla, sujeita a grandes variações na quantidade de neonatos gerados, como mostra a Figura 11.

Utilizando-se na alimentação *P. subcaptata* as quantidades de  $1,0E+06$  e  $1,0E+07$ , as médias de neonatos foram de 3,44 e 21,5, respectivamente.

Concentrações menores da alga *S. platensis* foram utilizadas, por apresentarem um maior tamanho, em que uma média de neonatos de 16,6 foi obtida na alimentação de  $3,0E+05$  org./mL.Daphnia (Tabela 3 e Figura 14). Para *P. subcaptata* e *S. subspicatus* as médias de neonatos foram de 16,45 e 16,89, respectivamente, ambas contendo alimentação na concentração de  $3,0E+06$  céls./mL.Daphnia. Apesar de os resultados obtidos terem sido semelhantes, concluiu-se que esta alga não era tão adequada à alimentação de *D. magna* quanto as indicadas pela NBR 12713 / 2004 (*P. subcaptata* e *S. subspicatus*), visto que provocou alterações morfológicas consideráveis, como perda da coloração, diminuição do tamanho e diminuição da capacidade natatória (Figura 15).

Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados de reprodução da *D. magna* para a alga *S. platensis*.

Alga Dieta Concentração de alga (org./mL.Daphnia)	<i>S. platensis</i>		
	J	K	L
	3,0E+03	3,0E+04	3,0E+05
Média de neonatos	5,40	11,33	16,60
Mediana	3,50	11,50	18,50
Desvio padrão	4,97	5,40	9,50
Coeficiente de variação	0,92	0,47	0,57
Variância da amostra	24,71	29,15	90,27
Mínimo	1	4	3
Máximo	14	20	29

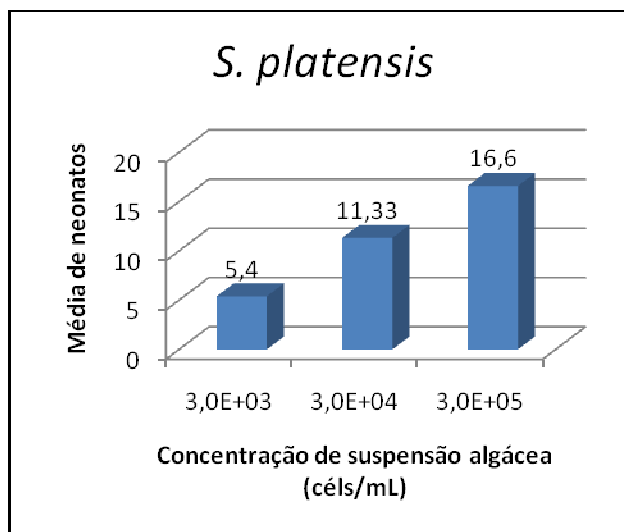


Figura 14 - Média de neonatos gerados quando *D. magna* foi submetida 3,0E+03, 3,0E+04 e 3,0E+05 céls/mL da alga *S. platensis*.

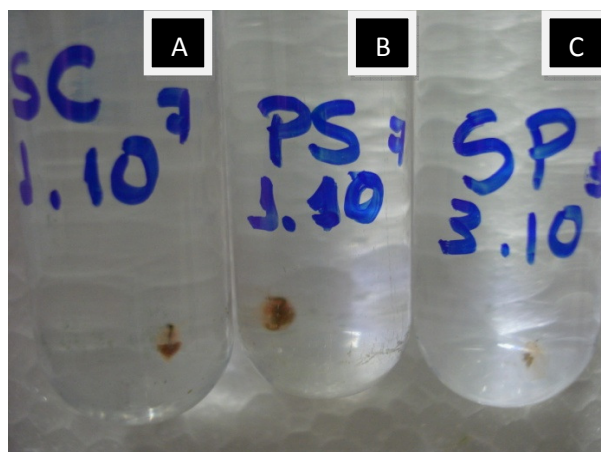


Figura 15 - Comparação da coloração de *D. magna* submetida a diferentes dietas: A) *S. subspicatus*, B) *P. subcaptata* e C) *S. platensis*.

As médias de neonatos obtidas com as algas *P. subcaptata*, *S. subspicatus* e para uma mistura em quantidades iguais de *P. subcaptata* + *S. subspicatus*, na concentração de 3,0E+06 céls./mL. *Daphnia*, foram comparadas por meio do método estatístico ANOVA (fator único), considerando um nível de significância de 5%. O valor-p calculado foi 0,876, que, por ser maior que 0,05, demonstra não haver diferença estatística significativa entre os três valores de média de neonatos obtidos pelas dietas “D”, “G” e “M” ( Tabela 4 e Figura 16).

Então:

Média de neonatos da Dieta “D”= Média de neonatos da Dieta “G”=  
Média de neonatos da Dieta “M”.

Tabela 4 - Estatística descritiva dos dados de reprodução da *D. magna*.

Alga	<i>P. subcaptata</i>	<i>S. Subspicatus</i>	<i>P. subcaptata</i> + <i>S. subspicatus</i>
Dieta	D	G	M
céls/Daphnia	3E+06	3E+06	1,5E+06 +1,5E+06
Média	16,45	16,89	15,47
Mediana	15,50	16,50	16
Desvio padrão	8,86	9,69	5,68
Coeficiente de variação	0,54	0,57	0,37
Variância da amostra	78,47	93,99	32,26
Mínimo	1	1	1
Máximo	38	45	23

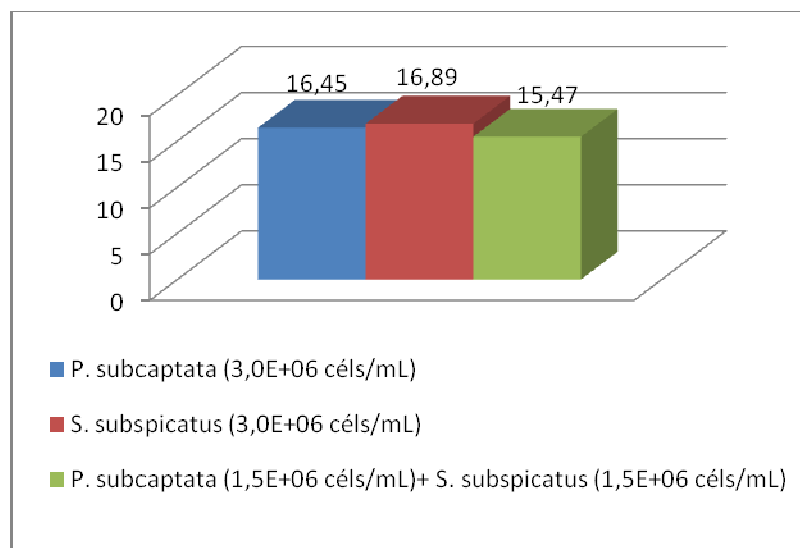


Figura 16 - Média de neonatos gerados quando *D. magna* é submetida 3,0E+06 céls./mL.daphnia de *P. subcaptata*, 3,0E+06 céls./mL.daphnia de *S. subspicatus* e 1,5E+06 céls./mL.daphnia de *P. subcaptata* + 1,5E+06 céls./mL.daphnia de *S. subspicatus*.

Viiverberg (1989) afirma que dietas multialgais fornecem, em geral, melhores resultados de nutrição e, conseqüentemente, de reprodução. No entanto, a dieta multialgal fornecida às *D. magna*, composta pelas duas algas mais indicadas na literatura especializada, não influenciou positivamente na quantidade de neonatos gerados. Portanto, recomenda-se a utilização de alimentação unialgal de *P. subcaptata* ou *S. subspicatus*, quando comparada à alimentação multialgal.

### 5.3. Carta de sensibilidade

Os procedimentos relativos aos ensaios de sensibilidade e à elaboração da carta controle foram realizados de acordo NBR 12713 / 2004, com uma alteração: adaptação no tempo de leitura dos ensaios. A leitura dos ensaios foi realizada em 24 horas de duração do teste, visto que em 48 horas houve um alto número de neonatos mortos, e conseqüentemente seria impossível de se obter a CE50 no período recomendado pela norma. Ressalta-se que a duração do ensaio com substância de referência na norma ISO 6341/96 é de 24 horas e mantém-se esse preceito uma vez que na referida norma o período de 24 horas é o primordial para leitura dos testes.

Para a elaboração da carta controle foram calculados os valores de dois desvios-padrão (DP), superior e inferior à média dos cinco primeiros valores de CE50 dos ensaios de sensibilidade (Figura 10). O intervalo de 2 +/- desvios-padrão em relação ao valor médio calculado foi grafado na carta-controle por meio de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade.

Como podem ser observados, os dois resultados de ensaios realizados posteriormente estão inseridos dentro dos limites superior (LS) e inferior (LI) da carta controle (linhas vermelhas), indicando que os procedimentos adequados de cultivo estão sendo realizados e que testes de toxicidade poderiam ser realizados neste período. Além de que o valor médio de CE 50 de 1,07 está inserido na faixa estabelecida para *Daphnia magna* (0,6 a 1,7 mg K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/L), com base na norma ISO 6341/96, que utilizou 1697 resultados analíticos gerados durante 16 anos em 36 laboratórios para estabelecimento desta faixa. Vale ressaltar, que se pode comparar os dados da carta de sensibilidade deste estudo com a faixa de sensibilidade estabelecida pela ISO 6341/96 devido à utilização de água reconstituída durante todos os ensaios.

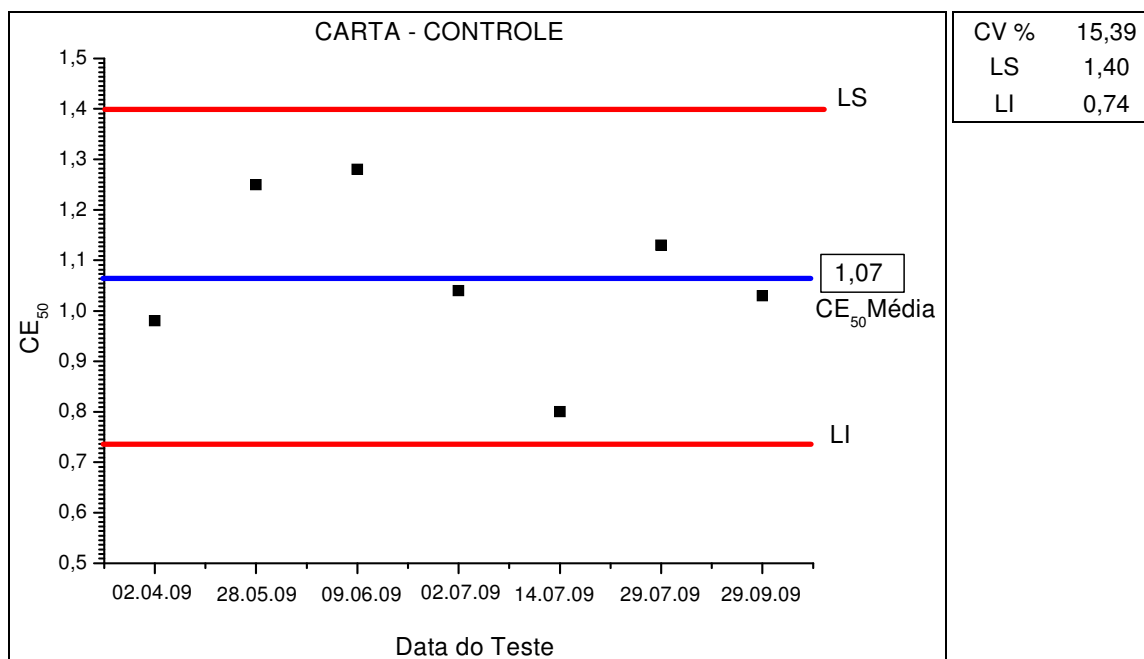


Figura 17 - Carta-controlre da *D. magna*.

A Tabela 5 mostra valores de CE50 de trabalhos científicos, tendo como organismo teste *Daphnia magna* e como substância de referência o dicromato de potássio. Pode-se observar que o valor de CE 50 de 1,07 é semelhante aos valores obtidos tanto para o período de 24 horas como de 48 horas, em diferentes metodologias de cultivo.

Tabela 5 - Resultados de EC50 obtidos em diferentes pesquisas.

Método	CE 50 <sub>24h</sub> média (mg/L)	Referência
ABNT NBR 12713	1,28	Alves e Silvano (2006)
CETESB (1999) e IBAMA (1987)	1,45	Medeiros (2008)
CETESB (1999)	1,08 (ano: 2000)	Laitano (2003)
CETESB (1999)	0,95 (ano: 2001)	Laitano (2003)
CETESB (1999)	0,90 (ano 2002)	Laitano (2003)
ISO 6341 (1996)	1,10*	Beatrice (2001)

\*Resultado de um único ensaio de sensibilidade.

Por meio da comparação dos valores obtidos, pode-se demonstrar a viabilidade de se utilizar a carta controle de sensibilidade e, conseqüentemente, os organismos do cultivo para a realização de testes durante o período do monitoramento de sensibilidade.

#### 5.4. Testes de toxicidade – efluente têxtil

Conforme descrito anteriormente, depois de desenvolvido e otimizado o método de cultivo da *D. magna*, de validação por meio da carta de controle, iniciou-se a aplicação do teste de ecotoxicidade com efluentes domésticos e industriais. Na presente dissertação, o teste foi aplicado para efluentes têxteis tratados em escala de laboratório por processos biológicos e não biológicos. Anteriormente ao teste definitivo (Figura 18), realizava-se um teste preliminar, que fornecia as melhores diluições a serem consideradas nos vários tipos de efluentes (Figura 19). Os afluentes e os efluentes de esgoto têxtil que foram submetidos ao teste de toxicidade definitivo, assim como os intervalos selecionados, são descritos na Tabela 6.



Figura 18 – Incubação das amostras para teste de toxicidade preliminar.



Figura 19 - Teste de toxicidade definitivo.

Tabela 6 - Amostras com intervalo de diluições selecionadas no teste preliminar.

<b>Tipo de esgoto</b>	<b>Amostra</b>	<b>Intervalo de diluições</b>
<b>Esgoto têxtil sintético</b>	Esgoto bruto	100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,2%
	Efluente UASB	10%, 5%, 2,5%, 1,2%, 0,6%
	Efluente lodos ativados	10%, 5%, 2,5%, 1,2%, 0,6%
	UV + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100%, 83,5%, 69,4%, 57,9%, 48,7%
<b>Esgoto têxtil real</b>	Esgoto bruto	25%, 20,8%, 17,3%, 14,4%, 12%
	Efluente UASB	50%, 41,6%, 34,7%, 28,9%, 24,1%
	Efluente lodos ativados	50%, 41,6%, 34,7%, 28,9%, 24,1%

Verificou-se a quantidade de neonatos mortos em 24 horas de duração do teste e em 48 horas, mas os resultados que serão considerados para efeito de discussão serão apenas os de 48 horas, visto que é o tempo recomendado na norma utilizada. A partir da quantidade de neonatos mortos para cada diluição calculou-se a CE50 para cada diluição. De acordo com Tonkes *et al.* (1999) e Canton (1991), os resultados de toxicidade dos efluentes podem ser classificados conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Classificação das amostras por meio da CE 50.

<b>Valor de CE50</b>	<b>Classificação da amostra</b>
<1	Muito tóxica
1-10	Moderadamente tóxica
10-100	Levemente tóxica
>100	Não tóxica

Os valores de CE 50<sub>24h</sub> e CE 50<sub>48h</sub> (diluição da amostra que causa efeito agudo em 50% dos organismos do teste) para os diferentes tipos de efluentes, bem como a classificação das amostras, para uma melhor compreensão, são mostrados na Tabela 8. Ressalta-se que o valor da CE50 é inversamente proporcional à toxicidade da amostra, ou seja, quanto menor o valor da CE50, maior a toxicidade da mesma.

Tabela 8 - Valores de CE 50<sub>24h</sub>, CE 50<sub>48h</sub> e a classificação das amostras de esgoto têxtil sintético e real.

Tipo de esgoto	Amostra	CE 50 <sub>24h</sub> (%)	CE 50 <sub>48h</sub> (%)	Classificação da amostra
				(Tonkes <i>et al.</i> 1999 e Canton, 1991)
Esgoto têxtil sintético	Esgoto bruto	N.A.	I.T.	-
	Efluente UASB	3,63	2,12	Moderadamente tóxica
	Efluente lodos ativados	7,71	6,87	Moderadamente tóxica
	Efluente UV + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53,77	53,77	Levemente tóxica
Esgoto têxtil real	Esgoto bruto	18,16	12,72	Levemente tóxica
	Efluente UASB	N.A.	N.A.	-
	Efluente lodos ativados	N.A.	47,53	Levemente tóxica

N.A.: Não apresentou toxicidade (não houve morte de neonatos)

I.D.: Indício de toxicidade (houve morte de neonatos, mas insuficiente para cálculo de CE50)

Como se pode observar, o esgoto têxtil sintético afluente ao reator UASB, o qual continha o corante azo *Congo Red*, não apresentou valor de CE 50, visto que a quantidade de neonatos mortos do teste não possibilitou o cálculo de CE50. Entretanto, interessantemente o efluente deste reator apresentou CE 50 de 2,12%, significando então que, metade dos organismos do teste morreu ou permaneceu imóvel quando submetidas a 2,12% de efluente UASB, demonstrando moderada toxicidade. A toxicidade é de certo esperada, uma vez que a descoloração de corantes azo sob condições anaeróbias gera as aminas aromáticas, que são compostos tóxicos e carcinogênicos conhecidos, muitas vezes com toxicidade maior do que o composto precursor. Com o pós-tratamento aeróbio realizado pelo sistema de lodos ativados em batelada houve pequena redução de toxicidade, com CE 50 de 6,87%. Possivelmente, isso ocorreu devido a baixa capacidade do sistema de mineralizar as aminas aromáticas formadas. No entanto, o pós-tratamento com o processo de oxidação avançada UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu consideravelmente a toxicidade deste esgoto, alcançando-se CE50 de 54,44%, sendo classificada como uma amostra levemente tóxica. Ressalta-se que a toxicidade do efluente deste pós-tratamento não pode ser atribuída, em parte, à presença de peróxido

de hidrogênio, visto que não foi encontrado residual nas amostras tratadas. Portanto, verifica-se que o teste de toxicidade respondeu bem às toxicidades esperadas de cada tratamento.

Com relação ao esgoto têxtil real, observou-se que o afluente ao reator UASB (esgoto real bruto) apresentou CE 50 de 12,72% (levemente tóxico), contrário ao verificado com o esgoto sintético. Ao contrário do observado no efluente sintético, também não foi verificada toxicidade aguda para o efluente tratado pelo reator UASB. Supõe-se que tal fato esteja relacionado à menor quantidade de corantes do tipo azo presentes na composição do esgoto têxtil real, e subsequente menor geração das aminas aromáticas no reator anaeróbio, assim como a natureza do corante e outros compostos químicos presentes, que foram eliminados durante o processo anaeróbio. Assim, observa-se que o processo anaeróbio foi capaz de detoxificar parcialmente o esgoto têxtil real, além de remover a sua cor (dados não mostrados). Já o efluente do reator de lodos ativados em batelada apresentou CE 50 de 47,53% (levemente tóxico), ou seja, um aumento de toxicidade inesperado, possivelmente pelos produtos gerados nessa etapa. Apesar desse aumento na toxicidade, ressalta-se a importância desse sistema na remoção de DQO residual presente no efluente anaeróbio.

Além dos resultados serem expressos e discutidos com base no cálculo de CE50, eles também foram convertidos em unidade tóxica (U.T.) (Tabela 9), com a finalidade de facilitar a compreensão da toxicidade, visto que, a CE50 é inversamente proporcional à toxicidade da amostra (quanto menor o valor, maior a toxicidade). Já a U.T. apresenta uma relação direta com o grau de toxicidade da amostra (quanto maior o valor, maior a toxicidade). A unidade tóxica foi calculada conforme Sprague e Ramsay (1965):

$$UT = \frac{100}{CE_{50}}$$

Tabela 9 - Valores de U.T.24h , U.T.48h de esgoto sintético e real têxtil.

Tipo de esgoto	Amostra	U.T. <sup>24h</sup>	U.T. <sup>48h</sup>
<b>Esgoto têxtil sintético</b>	Esgoto bruto	N.A.	I.T.
	Efluente UASB	27,50	47,17
	Efluente lodos ativados	12,97	14,56
	UV + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,86	1,86
<b>Esgoto têxtil real</b>	Esgoto bruto	5,5	7,8
	Efluente UASB	N.A.	N.A.
	Efluente lodos ativados	N.A.	2,1

U. T.: Unidade Tóxica

N.A.: Não apresentou toxicidade (não houve morte de neonatos)

I.D.: Indício de toxicidade (houve morte de neonatos, mas insuficiente para cálculo de CE50)

### 5.5. Dificuldades encontradas durante a implantação do teste de toxicidade aguda com *D. magna*

Dentre as dificuldades encontradas no que diz respeito a implantação, bem como a realização dos testes de toxicidade com *Daphnia magna* pode-se destacar :

- Com um mês de cultivo, observou-se que a quantidade de neonatos gerados por organismo era insuficiente para a realização dos testes, e até mesmo dos ensaios de sensibilidade, sendo inferior a faixa de 112 a 212, que é a quantidade ótima de neonatos gerados durante 21 dias de acordo com estudos anteriormente realizados (GIRLING; GARFORTH, 1989; KLUTTGEN *et al*, 1994). Devido a este fato a execução dos testes foi adiada pela necessidade de melhorias no cultivo.
- Elevado tempo requerido para se estabelecer e padronizar os procedimentos laboratoriais para o cultivo. Portanto, elaborou-se um manual de Procedimento Operacional Padrão (POP) referente ao preparo da água de cultivo e de diluição, do alimento, e dos procedimentos para realização do ensaio de sensibilidade e das análises essenciais para a água de cultivo, de diluição e das amostras (pH, dureza total e oxigênio dissolvido).

- Grande número de informações diferentes a respeito da quantidade de alimento e do tipo de alga e alimentos compostos utilizados;
- Falta de identificação das nomenclaturas dos meios na norma brasileira, dificultando o conhecimento de quais meios seriam os utilizados, para efeito de comparação com trabalhos internacionais e até mesmo nacionais que adotam metodologias internacionais;
- O aparecimento esporádico de machos e efípios, devido à falta de energia na Universidade Federal do Ceará, que dificultou muitas vezes a realização dos testes, pois os lotes contendo machos e efípios foram descartados, diminuindo a quantidade de neonatos produzidos para teste.

## 6. CONCLUSÕES

Os procedimentos laboratoriais referentes ao cultivo e ao teste de toxicidade foram padronizados por meio da elaboração de um manual de Procedimento Operacional Padrão (POP). Conseguiu-se cultivar e realizar ensaios de sensibilidade e testes de toxicidade com *D. magna* conforme as recomendações da NBR 12713/2004. No entanto, para os ensaios de sensibilidade a duração do teste foi alterada de 48 horas para 24 horas devido ao alto número de neonatos mortos durante o período recomendado na NBR (48 horas), o que impossibilitou o cálculo de CE 50.

A carta controle foi elaborada e o valor de CE 50<sub>24h</sub> médio deste estudo foi comparado com valores reportados na literatura, comprovando que a carta poderia ser utilizada e demonstrando que os organismos do cultivo estiveram dentro do intervalo de segurança no período dos testes.

Devido à quantidade insuficiente de neonatos gerados no início do cultivo, elaborou-se curva de crescimento das algas que foram utilizadas como alimento, sendo elas: *Pseudokirchneriella subcaptata* (ex- *Selenastrum capricornutum*), *Scenedesmus subspicatus* e *Spirulina platensis*, para o estudo sobre a reprodução de *D. magna*, quando submetida a três diferentes dietas.

Neste estudo, pode-se observar que a quantidade de alimento influenciou diretamente na reprodução de *D. magna*. Tanto a *P. subcaptata*, quanto a *S. subspicatus* (algas indicadas pela NBR 12713/2004) se mostraram adequadas na alimentação de *D. magna* na concentração de 6,5E+06 céls./mL.Daphnia. Ao fornecer uma dieta composta por estas duas algas na concentração de 3,0E+06 céls/mL.Daphnia, não foi verificado aumento na quantidade de neonatos gerados, ao contrário do que relata a literatura especializada. Também comprovou-se que a *S. platensis* não é tão adequada para a alimentação de *D. magna* quanto as indicadas pela Norma Brasileira, visto que provocou alterações morfológicas consideráveis, como perda da coloração, diminuição do tamanho e diminuição da capacidade natatória.

Os testes de toxicidade, por meio dos valores de CE50 obtidos, demonstraram que houve aumento da toxicidade do esgoto têxtil sintético ao ser tratado pelo Reator, devido principalmente a formação das aminas

aromáticas provenientes da quebra do corante Azo Congo Red. Em geral, o tratamento composto por reator UASB e lodos ativados não reduziu consideravelmente a toxicidade, muito embora a cor e a DQO fossem reduzidas. No entanto, o tratamento composto pelo reator UASB seguido de pós-tratamento por oxidação avançada reduziu a toxicidade da amostra de 12,72 para 47,53.

Os resultados com o efluente real revelaram que o sistema anaeróbio além de ajudar na remoção de cor e DQO pode ajudar também na detoxificação do efluente e que o pós-tratamento aeróbio fez aumentar a toxicidade, o que de certa forma é contrário ao que diz a literatura especializada, que propõe uma seqüência anaeróbio/aeróbio para o tratamento de esgotos têxteis.

Por fim, os testes de toxicidade mostraram-se ser uma ferramenta imprescindível na avaliação de subprodutos gerados em condições anaeróbias e aeróbias de esgotos têxteis, melhorando o entendimento dos processos de tratamento.

Portanto, o Laboratório de Saneamento (Labosan) da Universidade Federal do Ceará (UFC), possui estrutura física e técnica para a realização de teste de toxicidade agudo com *D. magna* para avaliação da toxicidade de efluentes domésticos e industriais e lixiviados provenientes de plantas de tratamento em escala laboratorial e real, nas condições ideais de cultivo.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Com base na pesquisa realizada, são feitas as seguintes recomendações:

1. Deve-se permanecer com a alga *P. subcaptata* para alimentação de *D. magna*, alterando somente a quantidade de alimento fornecido para  $6,5E+06$  céls./mL.Daphnia, considerando que os organismos atualmente se alimentam desta alga e a concentração de  $6,5E+06$  céls./mL.Daphnia de *P. subcaptata* foi a que houve uma maior produção de neonatos.
2. Que seja realizada pesquisa com uma faixa mais restrita (entre  $3,0E+06$  a  $6,5E+06$  céls./mL. Daphnia) para a identificação da quantidade ótima de *P. subcaptata* e *S. subspicatus*, objetivando a maior quantidade de neonatos por *Daphnia magna*. É interessante que se realize esse experimento ao longo de gerações.
3. Um caderno para as anotações das condições padronizadas para o cultivo pode ser elaborado, para que cada decisão de alteração necessária para manutenção do cultivo seja anotada e realizada pela equipe técnica, bem como os eventos externos (ex: falta de energia), para que as conseqüências possam ser previstas, visando menores prejuízos na realização dos testes.
4. Realização de ensaio de sensibilidade, com o dicromato de potássio, com leitura em 48 horas, para verificar se após a padronização de uma alimentação adequada se torna possível a leitura do ensaio, conforme tempo determinado (48 horas) na norma adotada.
5. Sabendo-se que o dicromato de potássio, substância de referência deste estudo:
  - a) É um composto corrosivo, facilmente absorvido pela pele e carcinogênico;
  - b) Seu efeito tóxico é dependente da qualidade da água;
  - c) Introdução deste composto no meio ambiente ocasiona impactos negativos para a biota aquática.

Recomenda-se a utilização do cloreto de potássio como substância de referência.

6. Utilização dos testes de toxicidade como monitoramento de várias pesquisas na área de tratamento de esgotos que estão sendo conduzidas no Labosan, para um melhor entendimento dos processos de tratamento em relação à diminuição da toxicidade. Adicionalmente, é importante a inclusão dos mesmos na avaliação das ETEs operadas pela Cagece que tratam esgotos domésticos, ou seja, quais tratamentos são os mais eficientes na diminuição da toxicidade, além do monitoramento de vários esgotos industriais e lixiviados provenientes de aterro sanitário.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. C. B.; SILVANO, J. Avaliação da sensibilidade de *D. magna* Straus, 1820 (Cladóccera, Crustácea) ao dicromato de potássio. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 65, p. 54-58, 2006.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, v.40, p. 997-1026, 2005.

AKSU, Z.; TEZER, S. Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v.40, p. 1347-1361, 2005.

AZEVEDO, F. A. de; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos. Editora Rima. 2004. 340 p. ISBN 85-86552-64-x.

BEATRICI, A. C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas**. 2001. 18f. Dissertação de bacharelado (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências da Universidade de Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BEATRICI, A. C. AREZON, A. RAYA- RODRIGUES, C.. Fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* submetidas a diferentes cultivos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, 2006.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais na Grande São Paulo. **Revista DAE**. V.49 p. 63-70,1990.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Resolução Nº 357 de 17/03/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, 2005.

BROOKS, J. L. Cladocera. In: **Edmondson, W. T.** Fresh water biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. p.1247. 1959.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a Test Species in Ecotoxicological Assays. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 73 p. 878–882, 2004.

CAIRNS, J. Jr. NIEDERLEHNER, B. R. **Ecological Toxicity Testing**. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 228p. 1995.

CANTON, J. W. **Catch-up operation on old pesticides an integration**. 1991.

CONNELL, D.; LAM P.; RICHARDSON B.; WU. R. **Introduction to ecotoxicology**. Oxford. 1999. 170 p. ISBN 0-632-03852-7.

COSTAN, G.; BERMINGHAM,N.; BLAISE,G.; FERARD, J.F. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. **Enviromental Toxicology and Water Quality: an International Journal**. v. 8 p. 115-140.1993.

CHRISTIE, R. **Colour Chemistry**. Cambridge, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry. 2001.

DANTAS, T. L. P. **Decomposição de peróxido de hidrogênio em um catalisador híbrido e oxidação avançada de efluente têxtil por reagente fenton modificado**. 120f. Dissertação de mestrado (Curso de Pós- graduação em Engenharia Química) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

DOS SANTOS A. B. Aplicação conjunta de tratamento anaeróbio termofílico por lodo granular e de mediadores redox na remoção de cor de águas residuárias têxteis. **Eng. Sanitária e Ambiental**. 10. 253-259. 2005a.

DOS SANTOS, A.B. Reductive Decolourisation of Dyes by Thermophilic Anaerobic Granular Sludge, PhD-Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 176 p. 2005b.

ESPÍNDOLA, E. L.; LEITE, M. A. DORNFELD, C. B. **Reservatório de Salto Grande( Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. São Carlos. Editora Rima. 2004. 484p. ISBN 85-86552-62-3.

FALONE, S. F. **Acesso ao documento primário: Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17 metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros**. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

GRANADOS, Y. P.; BÁEZ, M. C. D.; RONCO, A.; SOBRERO, C.; ROSSINI, G. B.; FEOLA, G.; FORGET, G.; SANCHES-BAIN, A. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México. Editora Gabriela Castillo Morales. 2004. 189 p. ISBN 968-5536-33-3.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THRURSTON, R. V. Trimmed Spermann Karber metod for calculation of EC50 and LC50 values in biossais. **Burlington research inc. fci. tecnol.** n.11, v.7, p.114-119. 1977.

HASSEMER, M. E. N.; SENS, M. L. Tratamento do efluente de uma indústria têxtil. Processo físico- químico com ozônio e coagulação/ floculação. **Eng. Sanitária e Ambiental**, v. 7, p. 30-36, 2002.

HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 10ª Ed. p. 846. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004.

JONSSON, C. M. **Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum*: extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola**. 2005. 133f. Dissertação (Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica) -Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/ GTZ, 2004. 289 p. ISBN 85-87391-05-4.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LAITANO, K. S. Sensibilidade do cultivo de *Daphnia magna* no laboratório de toxicologia ambiental LABTOX/ ENS/ UFSC. 2003.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos. Editora Rima. 2006. 588p. ISBN 85 7656 113 1.

MATSUMURA-TUNDISI, T. Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil. **Hydrobiologia**. V. 112, p. 161-165, 1984.

MACEK, J.K. Aquatic Toxicology: Fact or Fiction. **Environmental Health Perspectives**, v.34, 159-163.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO F.; ESPINOSA-CHÁVEZ F.; VILLASENOR-CÓRDOVA R. Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as test organisms for aquatic toxicity tests. **Environ. Toxicol.** v.15, 155-159, 2000.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; RODRÍGUES-ESTRADA, J.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, L. *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustacea: Cladocera). Una espécie zooplanctônica potencialmente utilizável como organismo de prova em bioensaios de toxicidade aguda em ambientes tropicais e subtropicais. **Rev. Int. Contam. Ambient.** V.24 n.4 p.153-159, 2008.

MEDEIROS, L de S. **Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida Teflubenzuron para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*.** 54f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2008.

MOUNT, D.I. y NORBERG T.J. A seven-day life cycle cladoceran toxicity test. **Environ. Toxicol. Chem.** V.3, p. 425-434, 1984.

OLIVI, P.; COSTA, C. R.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, Nº 7, p. 1820-1830, 2008.

PLAA, G. L. Present status: toxic substances in the environment. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 60: 1010-1016. 1982.

POMPÊO, M. L. M. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. **Perspectivas da Limnologia no Brasil.** Editora: Universidade Federal do Maranhão/Departamento de Oceanografia e Limnologia. 191 p. 1999.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.** 2ª ed. 1125p. Washington, 1995.

RIEDER, A. Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por

pesticidas. **Pesticidas**: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 10, p. 87- 112. 2000.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6<sup>o</sup> ed. p. 1029. Editora Roca. São Paulo, 1996.

ROCHA, O.; GÜNTZEL, A.M. Crustáceos branquiópodos. In: Ismael,D; Valenti, W.C.; Matsumura-Tundisi, T.; Rocha, O. **Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil**. Invertebrados de Água doce- FAPESP.cap.17 p.107-120, 1999.

SLOOF, W.; VAN OERS, J. A. M.; De ZWART, D.. Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**. V. 9. p. 1435.1986.

SPRAGUE, J. B.; RANSAY, B. A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon. **Journal Fish. Res. Board Can.** v. 22, p 425-432. 1965.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.69-80. 2001.

TAVARES, L. H. S; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos. Editora Rima. 2003. 106 p. ISBN 85-86552-17-8.

TONKES, M.; GRAAF, P. J. F.de; GRAANSMA, J. Assessment of complex industrial effluents in the Netherlands using a whole effluent toxicity (or wel) approach. **Wat. Sci. Tech.** v.39. n. 10-11. p.55-61, 1999.

USEPA. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms**. 4<sup>a</sup> ed. Washington, D.C.(EPA – 821-R-02-012). 266 p. 2002.

VIIVEBERG, J. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions. **Freshwater Biology**. 1989.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2<sup>a</sup> edição. São Carlos. Editora Rima. 2008.472 p. ISBN 978-85-7656-136-1.

ZOLLINGER, H. Color chemistry - Syntheses, properties and applications of organic dyes pigments. **New York**, NY: VCH. 83-148 p.1987.

### **Documentos Eletrônicos**

Disponível em: <http://www.itis.gov/>. Acesso em: 05 ago. 2009.

Disponível em: <http://setacbrasil.org.br/> Acesso em: 07 set. 2009.

Disponível em: [http://daphnia\\_magna\\_ac.blogs.sapo.pt/2009/04/06/](http://daphnia_magna_ac.blogs.sapo.pt/2009/04/06/). Acesso em: 30 set. 2009.

Disponível em: <http://www.abnt.org.br/default.asp?resolucao=1024X768>. Acesso em: 30 set. 2009.

Disponível em: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0035.jpg>. Acesso em: 10 nov. 2009.

Disponível em: <http://www.sinice.cz/res/image/collection/Scenedesmus.jpg>  
Acesso em: 10 nov. 2009.

Disponível em: <http://www.kingdnarmsa.cn/en/images/RD1.jpg>. Acesso em: 10 nov. 2009.

## GLOSSÁRIO

**Água de cultivo:** Água utilizada para manutenção das culturas do organismo-teste.

**Água de diluição:** Água utilizada para preparar as soluções-estoque e as soluções-teste.

**Água reconstituída:** Água natural ( de superfície ou subterrânea) ou processada, ajustada para pH e dureza requeridos pelos organismos-teste, utilizada para cultivo e diluição.

**Autóctone:** Diz-se daquilo que é natural da região onde ocorre.

**Cadeia alimentar:** Uma porção de uma teia alimentar, mais comumente uma sequencia simples de espécies que são presas e os predadores que a consomem.

**Câmara de Neubauer:** Lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes, de medidas conhecidas.

**Carta-controle:** Representação gráfica da avaliação periódica dos resultados do ensaio com uma determinada substância de referência.

**Ciclomorfose:** Alterações sazonais na forma do corpo.

**Crescimento exponencial:** Crescimento, especialmente no número de organismos em uma população, que é uma função simples do tamanho da entidade em crescimento: quanto maior a entidade, mais rápido ela cresce.

**Ecossistema:** Os organismos de um habitat particular, como uma lagoa ou floresta, junto com o ambiente físico no qual eles vivem.

**Ecotoxicologia:** O ramo da toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas: animais, vegetais ou microorganismos, em um contexto integral.

**Efípio:** espessamento de coloração escura, da câmara de incubação das fêmeas adultas, contendo ovos de resistência.

**Nível trófico:** Um grupo de organismos que foram unidos por obterem sua energia a partir da mesma parte da teia alimentar de uma comunidade biológica.

**Organismo-teste:** Organismo utilizado na realização do ensaio de toxicidade.

**Recalcitrante:** Não biodegradável.

**Reprodução partenogenética:** Tipo de reprodução assexuada em que a fêmea dá origem a outras idênticas, cujos ovos podem estar ligados ao corpo, livres na água ou presos a plantas e outras superfícies.

**Surfactante:** Uma substância que diminui a tensão superficial de um líquido.

**Teste de toxicidade agudo:** Ensaio utilizado para identificar o efeito deletério causado pela amostra na sobrevivência dos organismos-teste, em um período de 48 horas de exposição.

**Teste de toxicidade crônico:** Ensaio utilizado para identificar o efeito deletério causado pela amostra, na sobrevivência e reprodução dos organismos-teste, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele.

**Toxicidade:** Capacidade de uma substância química produzir um efeito nocivo quando interage com um organismo vivo.

**Zooplâncton:** Conjunto dos organismos aquáticos que não têm capacidade fotossintética e que vivem dispersos na coluna de água, apresentando pouca capacidade de locomoção.

## ANEXOS

ANEXO A - Água de cultivo e de diluição para *Daphnia magna*

ABNT NBR 12713:2004

## Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	73500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> 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 <sub>3</sub>	64800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
5	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7210	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	LiCl	6120	
	RbCl	1420	
	SrCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	3040	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup>	335	
	ZnCl <sub>2</sub> <sup>1)</sup>	260	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup>	200	
6	NaNO <sub>3</sub>	548	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5719	
	NaBr	32	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	126	
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1,15	
	KI	6,5	
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	4,38	
7	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	21465	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada, deixando em agitação até o clareamento da solução.
8	Na <sub>2</sub> EDTA. 7H <sub>2</sub> O <sup>2)</sup>	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

	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	199,1	autoclavar imediatamente a 121 C por 15 min.
9	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	286	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	368	
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	
<sup>1)</sup> Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel alumínio. <sup>2)</sup> O EDTA é fotodegradável.			

### Volume das soluções para o preparo de 1L da água de cultivo

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										

### Volume das soluções para o preparo de 1L da água de diluição

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

## ANEXO B - Preparo do meio L.C. Oligo

NBR 12648:2005

### Soluções para preparo do meio LC Oligo

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	4000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
2	KNO <sub>3</sub>	10000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
5	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	30	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4H <sub>2</sub> O	60	
	ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	60	
	CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	60	
	Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	60	
	H <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	60	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60	
6	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .5 H <sub>2</sub> O	1625	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
	FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	625	
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	625	
7	NaHCO <sub>3</sub>	15000	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada

### Volume das soluções para o preparo de 1L de meio de cultura

Solução	1	2	3	4	5	6	7
Volume (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0

## ANEXO C - Preparo do meio CHU

NBR 12648:2005

### Soluções para preparo do meio CHU

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	NaNO <sub>3</sub>	25000	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
2	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2500	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
3	MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	7500	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7500	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17500	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
6	NaCl	2500	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
7	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> . 2H <sub>2</sub> O	50000	Dissolver, acrescentar 1 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% e completar para 1000 mL com água processada
	KOH	31000	
8	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	4980	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11420	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
10	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	88,2	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada
	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	14,4	
	MoO <sub>3</sub>	7,1	
	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	15,7	
	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	4,9	

### Volume das soluções para o preparo de 1L de meio de cultura

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume (mL)	10	10	10	10	10	10	1	1	1	0,1

**ANEXO D- Preparo do meio *Ventakataraman*****Soluções para preparo do meio *Ventakataraman***

<b>Solução</b>	<b>Reagente</b>	<b>Quantidade (mg)</b>	<b>Preparo</b>
1	NaHCO <sub>3</sub>	4000	Dissolver em 1000 mL com água processada
2	NPK comercial (15%N, 15%P, 15% K)	1000	
3	Superfosfato comercial	100	
4	Sal marinho grosso	1000	