

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MARCELO MARQUES DELL'ACQUA

**Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol sobre a biologia de *Chironomus sancticaroli*
(Chironomidae, Diptera)**

Versão corrigida

São Carlos, SP

2017

MARCELO MARQUES DELL'ACQUA

Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol sobre a biologia de *Chironomus sancticaroli*

(Chironomidae, Diptera)

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - Programa em Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

Versão corrigida

São Carlos, SP

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

D357e Dell'Acqua, Marcelo Marques
Efeito do hormônio 17 β -etinilestradiol sobre a
biologia de *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae,
Diptera) / Marcelo Marques Dell'Acqua; orientador
Juliano José Corbi. São Carlos, 2017.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2017.

1. Desreguladores endócrinos. 2. Estrógenos
sintéticos. 3. Contaminação ambiental. 4. *Chironomus
sancticaroli*. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Licenciado **MARCELO MARQUES DELL'ACQUA**.

Título da dissertação: "Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol sobre a biologia de *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera)"

Data da defesa: 02/05/2017.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Juliano José Corbi (**Orientador**)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Frederico Yuri Hanai**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Dr. **Guilherme Rossi Gorni**
(Universidade de Araquarara/UNIARA)

Resultado:

APROVADO

APROVADO

APROVADO

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Dedico:

A Deus que por sua misericórdia me conduziu até esse momento;

A minha esposa Marcia “*in memoriam*”, a qual ajudou a me tornar o homem que sou;

A meu filho Miguel, cuja alegria me sustentava a prosseguir nos momentos difíceis.

A minha mãe Maria do Carmo “*in memoriam*” que mesmo sem a sua presença física me ajudou a concluir mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano, pela paciência e sabedoria em suas palavras durante meu trajeto até esse momento;

A amiga Maria Auxiliadora “Sá”, pela paciência e ajuda durante todo meu trajeto no mestrado;

Ao amigo Daniel, pelas inúmeras insistências a jamais desistir do sonho que realizo agora;

Ao amigo José, pelas palavras amigas em momentos difíceis durante meu mestrado;

A amiga Mayara, pelo apoio durante essa jornada;

A todos do LEAA.

“Não pense separadamente nessa e na próxima vida, pois uma dá para a outra a partida. O tempo é sempre curto demais para quem precisa dele, só que para os amantes ele dura para sempre”

Rumi

RESUMO

DELL'ACQUA, M. M. **Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol sobre a biologia de *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera)**, 2017. 73 p. Dissertação (mestrado) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A água constitui um dos compostos de maior distribuição e importância na crosta terrestre. Sua importância para vida está no fato de que nenhum processo metabólico ocorre sem a sua ação direta ou indireta. Entre os vários compostos contaminantes dos ambientes aquáticos, os hormônios, estrógenos naturais e sintéticos, devem ser vistos com uma maior importância, devido a sua persistência no ambiente. O 17 α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético utilizado na formulação de contraceptivos orais, transdérmico e injetáveis. O presente estudo tem como objetivo analisar o efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol sobre a biologia do invertebrado aquático *Chironomus sancticaroli* analisando três gerações do ciclo de vida da espécie. Nos experimentos foram utilizados areia fina comum (lavada em água corrente, seca em estufa a 60°C e levada a mufla por 4 horas a 560°C) e água deionizada (condutividade entre 25-55 μ S.cm⁻¹, dureza entre 12 e 16 mg.L⁻¹ para CaCO₃, pH entre 6,5 a 7,5). Foram realizadas 4 réplicas utilizando-se potes de 2 litros para cada concentração do hormônio e para o controle. Para os testes, foram colocadas 15 larvas, contendo 60 g de areia de cultivo e 240 ml de solução contendo 17 α -etinilestradiol (na proporção 1:4, sedimento-solução) nas concentrações de 50; 100; 200; 400; 800 e 1600 μ g.L⁻¹, e fotoperíodo de 12h luz/ 12 h escuro e com temperatura de 22 a 26°C. Os testes agudos foram realizados utilizando-se larvas de IV ínstar sem aeração e os testes crônicos foram realizados utilizando-se larvas de I ínstar com aeração. Os organismos foram alimentados com 5 ml de uma solução contendo 1 litro de água deionizada e 5,0 g de ração para peixe triturada (TetraMin®). O teste realizado foi estático, ou seja, a solução não era trocada do início ao fim do teste de cada geração F₁, F₂ e F₃. Em testes agudos (96h) os resultados mostraram que o composto em estudo não apresenta toxicidade. Nos testes crônicos apenas a terceira geração mostrou uma baixa sobrevivência (43,3 a 56,6%) indicando toxicidade do composto ao organismo-teste, o que foi confirmado pelo teste ANOVA one-way com p \leq 0,05. O tempo de emergência do organismo na terceira geração foi de 22 dias, havendo um atraso de cinco dias em comparação aos demais tratamentos, indicando que o composto testado pode influenciar no tempo de desenvolvimento do organismo-teste. Na análise da fecundidade potencial, os testes estatísticos indicaram haver uma diferença significativa entre os tratamentos e o controle somente na terceira geração, o que se pode inferir que o composto testado interfere na fecundidade potencial do *Chironomus sancticaroli*. Não foram encontradas deformidades bucais nas larvas nas três gerações analisadas. Para tanto, faz-se necessários estudos posteriores, visando um número maior de organismos (n \geq 100) em um número maior de gerações, para que os resultados sejam mais conclusivos no que diz respeito a interferência do composto testado sobre a biologia do *Chironomus sancticaroli*.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos, estrógenos sintéticos, contaminação do ambiente aquático, *Chironomus sancticaroli*.

ABSTRACT

DELL'ACQUA, M. M. **Effect of 17 α -ethinylestradiol hormone on the biology of *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera)**, 2017. 73 p. Dissertation (master degree) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2017.

Water is one of the compounds of great distribution and importance in the Earth's. Its importance to life lies in the fact that no metabolic process occurs without its direct or indirect action. Among the various contaminating compounds in aquatic environments, hormones, natural and synthetic estrogens, should be viewed with great importance because of their persistence in the environment. 17 α -ethinylestradiol (EE2) is a synthetic hormone used in the formulation of oral, transdermal, and injectable contraceptives. The present study aims to analyze the effect of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on the biology of the aquatic invertebrate *Chironomus sancticaroli* analyzing three generations of life cycle. In the experiments, common fine sand was used (washed with deionized water, oven dried at 60°C and muffled for 4 hours at 560°C) and deionized water (conductivity between 25-55 μ S.cm⁻¹, hardness between 12 and 16 mg.L⁻¹ for CaCO₃, and pH between 6.5 to 7.5). Four replicates were performed using 2-liter pots for each concentration of the hormone and for the control. For the tests, 15 larvae, containing 60 g of sand and 240 ml of solution containing 17 α -ethinylestradiol (1:4, sediment solution) in the concentrations of 50; 100; 200; 400; 800 and 1600 μ g.L⁻¹, and photoperiod of 12h light/12h dark and with a temperature of 22 to 26°C. The acute tests were performed using III larvae instar without aeration and the chronic tests were performed using I instar larvae with aeration. The organisms were fed with 5 ml of a solution containing 1 liter of deionized water and 5.0 g of crushed fish feed (TetraMin®). The test performed was static, where the solution was not changed from the beginning to the end of the test of each F1, F2 and F3 generation. In acute tests (96h) the results showed that the compound under study shows no toxicity. In chronic tests only the third generation showed a low survival (43.3 to 56.6%) indicating toxicity to the test organism, which was confirmed by the one-way ANOVA test with $p \leq 0.05$. The adult emergency of the organism in the third generation was of 22 days, with a delay of five days in comparison to the other treatments, indicating that the compound tested influences development. In the analysis of potential fecundity, the statistical tests indicated that there was a significant difference between the treatments and the control only in the third generation, which can be inferred that the tested compound interferes in the potential fecundity of *Chironomus sancticaroli*. No oral deformities were found in the larvae in the three generations analyzed. In order to do so, further studies are required, aiming at a larger number of organisms ($n \geq 100$) in a larger number of generations, so that the results are more conclusive with respect to the interference of the tested compound on the biology of *Chironomus sancticaroli*.

Key-words: Endocrine disrupters, synthetic estrogens, Contamination of the aquatic environment, *Chironomus sancticaroli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula molecular dos estrogênios naturais secretados por homens e mulheres.....	17
Figura 1- Síntese do hormônio 17 α -etinilestradiol a partir do 17 β -estradiol. Introdução do grupo etinil ao carbono 17 do 17 β -estradiol.....	17
Figura 3- Invertebrado aquático <i>Chironomus sancticaroli</i> em IV ínstar da fase larval.....	19
Figura 4- Fases do ciclo de vida do <i>Chironomus sancticaroli</i>	26
Figura 5- Criação de <i>Chironomus sancticaroli</i> em bandejas plásticas cobertas por gaiolas de nylon para retenção de adultos.....	27
Figura 6- Esquema dos bioensaios de toxicidade crônica utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> contendo 17 α -etinilestradiol.....	29
Figura 7- Esquema demonstrando a dinâmica do experimento durante as três gerações.....	30
Figura 8- Asa da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> e as posições a utilizadas nas mensurações.....	31
Figura 9- Curva dose resposta de <i>Chironomus sancticaroli</i> ao cloreto de potássio em teste de toxicidade aguda.....	32
Figura 10- Porcentagem de sobrevivência do <i>Chironomus sancticaroli</i> ao composto 17 α -etinilestradiol, em teste agudo de 96 horas.....	34
Figura 11- Comprimento das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> , primeira geração, a partir do teste ANOVA one-way.....	35
Figura 12- Comprimento das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> , segunda geração, a partir do teste ANOVA one-way.....	36
Figura 13 - Comprimento das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> , terceira geração, a partir do teste ANOVA one-way.....	37

Figura 13 - Comprimento das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> , terceira geração, a partir do teste ANOVA one-way.....	37
Figura 14 - Porcentagem de sobrevivência das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> até a primeira desova, das três gerações analisadas.....	38
Figura 15 - Fecundidade potencial das fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> na primeira geração.....	39
Figura 16 - Fecundidade potencial das fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> na segunda geração.....	40
Figura 17 - Fecundidade potencial das fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> na terceira geração.....	41
Figura 18 - Tempo médio de emergência de adultos de <i>Chironomus sancticaroli</i> durante três gerações, a uma temperatura media de 24°C.....	42
Figura 19 - Mento das larvas de IV instar de <i>Chironomus sancticaroli</i> na concentração 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$	42
Figura 20 - Mento das larvas de IV instar de <i>Chironomus sancticaroli</i> na concentração 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	43
Figura 21 - Mento das larvas de IV instar de <i>Chironomus sancticaroli</i> na concentração 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$	43
Figura 22 - Mento das larvas de IV instar de <i>Chironomus sancticaroli</i> na concentração 400 $\mu\text{g.L}^{-1}$	44
Figura 23 - Mento das larvas de IV instar de <i>Chironomus sancticaroli</i> na concentração 800 $\mu\text{g.L}^{-1}$	44
Figura 24 - Mento das larvas de IV instar de <i>Chironomus sancticaroli</i> na concentração 1600 $\mu\text{g.L}^{-1}$	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Excreção diária de estrógenos naturais e sintéticos por homens e mulheres.....	17
Tabela 2 - Degradação dos hormônios E2 e EE2.....	18
Tabela 3 - Características físicas e químicas dos diferentes estrógenos.....	18
Tabela 4 - Concentração média e faixa de concentração de 17 α -etinilestradiol em diferentes países.....	23
Tabela 5 - Valores da CL ₅₀ e intervalos de confiança para a substância de referência KCL para o teste de sensibilidade de <i>Chironomus sancticaroli</i>	32
Tabela 6 - Valores das variáveis físicas e químicas da solução teste para biosensaio de toxicidade ao organismo <i>Chironomus sancticaroli</i>	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Contaminação do ambiente aquático.....	14
1.2 Hormônios naturais.....	15
1.3 Hormônio sintético 17 α -etinilestradiol.....	17
1.4 Macroinvertebrados bentônico.....	18
1.5 Organismo-teste.....	20
1.6 Testes de toxicidade.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVO.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Organismo- teste.....	25
4.2 Cultura do organismo teste.....	26
4.3 Teste de sensibilidade do organismo-teste.....	27
4.4 Teste de toxicidade aguda.....	28
4.5 Teste de toxicidade crônica.....	28
4.6 Avaliação de fecundidade potencial.....	30
4.7 Análises estatísticas.....	31
5. RESULTADO.....	32
5.1 Teste de sensibilidade para <i>Chironomus sancticaroli</i>	32
5.2 Variáveis físico- química do bioensaio de toxicidade aguda.....	33
5.3 Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Chironomus sancticaroli</i>	33
5.4 Desenvolvimento larval.....	34
5.5 Bioensaio de toxicidade crônica (mortalidade) com <i>Chironomus sancticaroli</i>	37
5.6 Fecundidade potencial.....	38
5.7 Tempo de emergência.....	41
5.8 Análise de deformidade bucal.....	42
6. DISCUSSÃO.....	46
6.1 Teste de sensibilidade.....	46
6.2 Toxicidade aguda do <i>Chironomus sancticaroli</i> ao composto 17 α -etinilestradiol.....	46

6.3	Toxicidade crônica (mortalidade) com <i>Chironomus sancticaroli</i>	46
6.4	Desenvolvimento.....	48
6.5	Tempo de emergência.....	48
6.6	Deformidade bucal.....	49
6.7	Fecundidade potencial.....	50
7.	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICES.....	66
	APÊNDICE A: Dados brutos do comprimento das asas e cálculo da fecundidade potencial das três gerações do experimento.....	67
	APÊNDICE B: Dados brutos do comprimento das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i>	70
	APÊNDICE C: Dados brutos da taxa de sobrevivência de <i>Chironomus sancticaroli</i>	72

1- Introdução

1.1 Contaminação do ambiente aquático

A biota aquática é exposta constantemente a um grande número de substâncias tóxicas oriundas de diversas fontes de emissão. O despejo de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de lixos químicos e os esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como: metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos, entre outros (ARIAS et al., 2007)

Por ser de extrema importância à existência de vida no planeta, a preocupação com a conservação da água tornou-se maior nos últimos anos e a procura de mecanismos eficazes capazes de reduzir os impactos ambientais nesses sistemas tem sido considerados com uma das prioridades de pesquisa atualmente (NEGREIROS, 1997). Dessa forma, vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de se averiguar os impactos causados nos corpos d'água resultantes da atividade agrícola (diferentes tipos de cultura e manejos de solo), das atividades de mineração e de efluentes domésticos e industriais (OMETO et al., 2000; ROQUE et al. 2000; CORBI et al., 2000). Por outro lado, embora sejam conhecidos os progressos a respeito de metodologias de controle da poluição em recursos hídricos causada por efluentes industriais, domésticos ou advindos das atividades agrícolas, ainda não são conhecidas técnicas suficientemente eficientes para o controle absoluto desses agentes poluidores (ALVES, 1997; NEGREIROS, 1997).

Entre os vários compostos contaminantes dos ambientes aquáticos, os hormônios, estrógenos naturais e sintéticos, devem ser vistos com uma maior importância, devido a sua persistência no ambiente e a sua relação com algumas doenças aos seres humanos, como câncer, acidente vascular cerebral, e prejuízos ao sistema endócrino nos homens (GHISELLI e JARDIM, 2007; SODRÉ et al., 2007). O primeiro estudo indicando a presença de hormônio humano em água foi feito em 1965, mostrando que os esteroides não foram completamente eliminados durante o processo de tratamento de esgoto (GEROLIN, 2008). Diversas drogas farmacêuticas, sendo uma delas o 17α -etinilestradiol, têm sido detectadas em estações de tratamento de esgotos, águas superficiais, subterrâneas e potáveis.

Os usuários dessas drogas excretam, através da urina e de uma pequena porção nas fezes, parte desses produtos utilizados para a medicina humana e veterinária, após a administração, em esgoto doméstico ou no solo. As principais fontes poluidoras pontuais são os efluentes industriais e esgoto doméstico, o qual não passam por tratamento adequado para retirada de resíduos farmacológicos antes do despejo (PROSAB, 2009). Segundo Bila e Dezotti (2007) o 17 α -etinilestradiol, presente no meio ambiente, pode desenvolver respostas antagonicas e agônicas, possivelmente através de mecanismos de ação via receptores hormonais. A atividade agonista é a capacidade de uma substância ligar-se ao receptor de hormônios esteroides desenvolvendo uma resposta. Em contrapartida, a atividade antagonista é a habilidade de uma substância ligar-se ao receptor de estrogênio, bloqueando a ação do ligante natural (estrogênio) e, assim, sua resposta não será elucidada. Essas substâncias podem ser identificadas por sua capacidade de ligar-se ao receptor de estrogênios (RE) e induzir ou atenuar uma resposta hormonal.

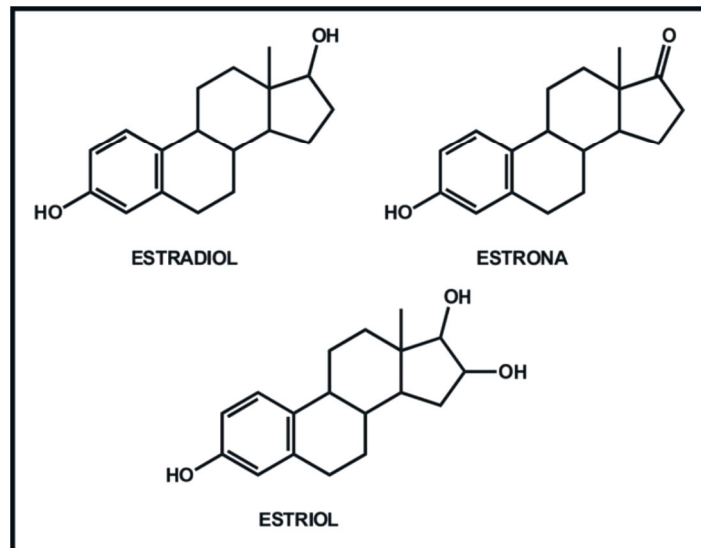
Segundo Reis filho, Araújo e Vieira (2006) os hormônios sexuais podem desencadear sobre a biota: alterações nas taxas de fecundidade, fertilização e eclosão; modificações comportamentais (agressividade, movimentação); histopatologias (fígado, gônadas, rins); imunodepressão; imposex (desenvolvimento de características sexuais femininas em machos) e inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais e reversão sexual. Segundo Bila e Dezotti (2003), essas substâncias residuais causam efeitos adversos nos organismos presentes nas águas, como os peixes. Peixes machos, a jusante de algumas descargas de águas residuais, produziram vitelogenina (VTG) (uma proteína normalmente sintetizados por fêmeas durante a maturação do oócito) e espermatozoides em fase precoce nos seus testículos (KIDD et al., 2007).

1.2 Hormônios naturais

Os hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células, as quais identificam os hormônios através de receptores que são estruturas proteicas especializadas em reconhecimento molecular (SIMMONDS, 1992). Na interação hormônio-receptor ocorre uma série de reações bioquímicas, levando o organismo a obter respostas biológicas específicas. Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e são classificados em hormônios sexuais femininos, ou estrógenos; hormônios

sexuais masculinos, ou andrógenos; e hormônios da gravidez, ou progestógenos (SOLOMONS & FRYHLE 2000). Destes diferentes grupos, os estrógenos naturais fazem parte de um grupo de hormônios esteróides lipossolúveis originados a partir do colesterol ou da acetil coenzima-A (TAPIERO et al., 2002). Entre os estrógenos temos os naturais representados pelo 17 β -estradiol, o estriol, a estrona (Figura 1), e o sintético 17 α -etinilestradiol, sendo ambos desenvolvidos para uso médico em terapias de reposição hormonal e contraceptivo (SONNESCHEIN e SOTO, 1998). O 17 β -estradiol é um hormônio sexual feminino, envolvido na manutenção dos tecidos reprodutivos, pele, ossos, sistema cardiovascular e imunológico. No homem, o estradiol se encontra presente em quantidades baixas em comparação com as mulheres, isso devido à enzima aromatase, membro da superfamília do citocromo P450 que catalisa a conversão de androgênios, testosterona e androstenediona, em estrogênios, estradiol, estrona, respectivamente (CZAJKA-ORANIEC; SIMPSON, 2010). Para Reis filho et al. (2006) os hormônios de uso médico são os que despertam maior preocupação, seja pelo grau elevado de estrogenicidade ou pela quantidade contínua excretada diariamente que é introduzida no ambiente (Tabela 1).

Figura 1 - Fórmula molecular dos estrogênios naturais secretados por homens e mulheres



Fonte: Bila e Dezotti (2007)

Tabela 1 - Excreção diária de estrógenos naturais por homens e mulheres

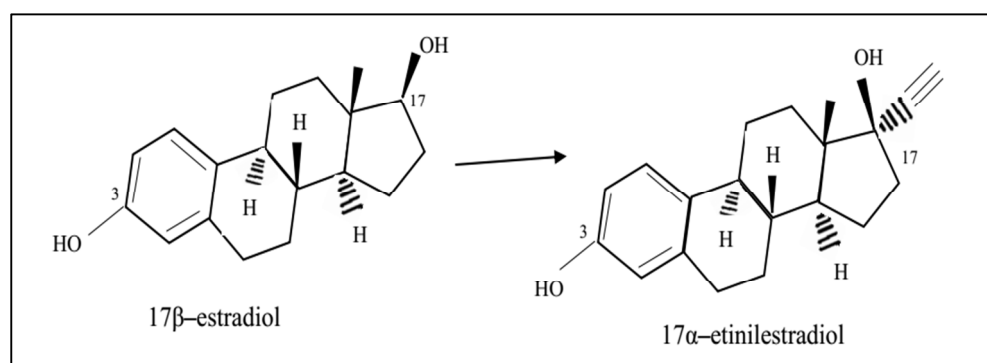
Estrógeno	Excreção diária ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)			
	Homem	Mulher		
		Menstruação	Menopausa	Gravidez
Estrona	3,9	8	4	600
17 β -Estradiol	1,6	3,5	2,3	259
Estriol	1,5	4,8	1	6000

Fonte: Adaptado de Bila e Dezotti (2007).

1.3 Hormônio sintético 17 α -etinilestradiol

O 17 α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético utilizado na formulação de contraceptivos orais, transdérmico e injetáveis (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014), e podem variar em concentrações desde 20 μg até 50 μg por comprimido. É derivado do hormônio natural 17 β -estradiol (E2), com a adição de um grupo etinil ao Carbono 17 do mesmo (Figura 2). Essa adição do grupo etinil faz com que o hormônio EE2 seja mais resistente à degradação (tabela 2) do que o hormônio natural (CLOUZOT et al., 2008).

Figura 2 - Síntese do hormônio 17 α -etinilestradiol a partir do 17 β -estradiol. Introdução do grupo etinil ao carbono 17 do 17 β -estradiol.



Fonte: Bila e Dezotti (2007)

Tabela 2 - Degradação dos hormônios E2 e EE2

Composto	Biodegradação na água (dias)	Degradação por fotólise na água (dias)
E2	< 3 a 4	10 a 12
EE2	17 a 42	10 a 12

E2: 17 β -estradiol; EE2: 17 α -etinilestradiol

Fonte: Adaptado de YOUNG et al., 2004.

Em comparação com os outros hormônios, o EE2 possui coeficiente de partição octanol-água relativamente alto, ou seja, o hormônio sintético se prende rapidamente aos sólidos suspensos e na matéria orgânica presente na água, conferindo, além do caráter de persistência, o caráter de bioacumulação (LAI; SCRIMSHAW e LESTER, 2002). Possui uma baixa solubilidade em água, além de uma meia vida superior em relação aos outros hormônios (tabela 3).

Tabela 3- Características físicas e químicas dos diferentes estrógenos

Nome comum	Fórmula	m (g/mol)	Sw (mg/L)	Log Kow	Meia vida (dias)
Estrona	$C_{18}H_{22}O_2$	270,37	12,42	2,45 – 3,43	2 – 3
17 β -estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	272,38	12,96	2,69 – 4,01	2 – 3
Estriol	$C_{18}H_{24}O_3$	288,38	13,25	2,55 – 2,81	NR
EE2	$C_{20}H_{24}O_2$	296,41	4,83	3,67 – 4,15	4 - 6

m: Massa molar; Sw: Solubilidade em água; Kow: Coeficiente octanol-água.

Fonte: Adaptado de REIS FILHO et al., 2006.

1.4 Macroinvertebrados aquáticos

O termo macroinvertebrado se refere à fauna de invertebrados que fica retida em uma malha 0,5mm, sendo ela constituída por diversos táxons, tais como Arthropoda, Mollusca, Annelida, Nematoda e Platyhelminthes, entre outros. A grande maioria dessas espécies está

associada a habitats de fundo dos corpos d'água, sendo denominada de bentônica (do grego: *benthos* = fundo) (CALLISTO et al., 2001).

Os macroinvertebrados aquáticos possuem muitas espécies sensíveis às perturbações ambientais, enquanto outras são tolerantes a esses impactos (ROSENBERG e RESH, 1993) sendo, portanto, considerados bioindicadores. Esses organismos apresentam baixa mobilidade, dessa forma, os efeitos dos impactos antrópicos locais, como modificações estruturais do habitat, como por exemplo a retirada de mata ciliar ou a liberação de efluentes e deposição de lixo doméstico, são fatores que afetam diretamente a fauna desses organismos pela diminuição da qualidade da água.

As larvas de Chironomidae ocupam uma posição importante na dinâmica trófica de ecossistemas aquáticos de água doce, devido a sua abundância numérica e na reciclagem de nutrientes nos sedimentos. Elas alterando a composição da fina matéria orgânica particulada e provêm importantes subsídios energéticos para os predadores (SANKARPERUMAL e PANDIAN, 1992), portanto, qualquer alteração nesse grupo de organismos pode vir a acarretar alterações nesse ecossistema.

Figura 2- Invertebrado aquático *Chironomus sancticaroli* em IV instar da fase larval.



Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5 Organismos teste

Organismos testes são espécies mantidas em laboratórios, cujos conhecimentos de sua biologia são suficientes para que possam ser utilizadas como bioindicadores de toxicidades dos efluentes. Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados. Os macroinvertebrados bentônicos tornam-se interessantes, como bioindicador, devido ao seu comportamento sedentário, ciclos de vida curto e a sensibilidade de resposta a diferentes tipos e níveis de perturbações (RIBEIRO e UIEDA, 2005). Entre a classe de organismos, a família Chironomidae é a mais abundante, possuindo uma ampla diversidade de espécies e habitats, sendo considerados excelentes bioindicadores (CALLISTO et al., 2002).

1.6 Testes de toxicidade

A toxicidade diz respeito ao potencial de uma substância em causar algum efeito prejudicial aos organismos vivos. Esta toxicidade depende da concentração, das propriedades da substância química e do tempo de exposição do organismo ao agente tóxico (COSTA et al., 2008; WALKER et al., 2006). Bioensaios de toxicidade são ensaios realizados em laboratório, aplicando-se de forma experimental específica e controlada, com a finalidade de avaliar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos) e o efeito dessas substâncias sobre o sistema biológico (COSTA et al., 2008).

São ferramentas importantes para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que as análises físicas e químicas comumente realizadas, como a demanda química de oxigênio (DQO), a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, assim, não são suficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes. Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais.

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 (COSTA et al., 2008). Testes de toxicidade aguda são realizados para medir os efeitos de agentes tóxicos em espécies aquáticas, estimando a concentração em que o agente tóxico seria capaz de produzir uma resposta a um organismo-teste em várias concentrações por um período de 24 a 96 horas (FLOHR, 2007).

Testes de toxicidade crônica são mais longos, utilizados para avaliar alterações nos organismos, como taxas de crescimento, taxas de fecundidade e mutações. Segundo Costa et al. (2008) exposições prolongadas dos organismos em determinadas concentrações podem acometer suas funções biológicas, como crescimento e maturação, reprodução, dentre outras.

Para a realização dos ensaios toxicológicos são selecionados organismos-teste, como bioindicador, considerando os efeitos causados no organismo quando submetido ao contato da solução teste em um determinado período de tempo, sendo usado para isso testes agudos e crônicos (BALDAN, 2012). Esses organismos são selecionados visando indicar um efeito toxicológico frente a produtos considerados potencialmente tóxicos ao meio ambiente (FLOHR, 2007).

2. Justificativa

Atualmente os requisitos sobre a qualidade da água crescem com o progresso humano. Dessa forma são estabelecidos padrões de potabilidade, nos quais apresentam Valores Máximos Permissíveis (VMP) para elementos nocivos ou características indesejáveis que podem estar presentes na água. Em contrapartida, cresce também a utilização de fármacos no mundo todo. Contudo, estes compostos podem causar impactos negativos no ambiente aquático, pois são despejados nos cursos d'água através de efluentes sem tratamento adequado. Um dos elementos que podem causar consequências negativas são os estrogênios, naturais ou sintéticos. Estes poluentes foram encontrados em águas superficiais, subterrânea, solo e sedimento, em concentrações mínimas, mas sendo capazes de provocar alterações no sistema endócrino de muitos organismos aquáticos além de prejuízos à saúde humana. Alguns estudos concluíram que os hormônios são os principais componentes estrogênicos presentes no esgoto doméstico.

Os efeitos desencadeados pelos hormônios no ambiente atingem desde microinvertebrados até grandes vertebrados, sendo considerados como uma questão de âmbito global (IPCS, 2002). Segundo Manahan (2003), a principal preocupação com estas substâncias implica em sua evidente capacidade de afetar a reprodução das espécies e interferir no desenvolvimento saudável da prole. Assim, o estágio do desenvolvimento em que a exposição ocorre é particularmente importante pois, em espécies aquáticas onde a fase larval é crítica, danos permanentes podem ser provocados em vários órgãos e sistemas (MRC, 1998).

O hormônio sintético selecionado para o presente estudo (17α -etinilestradiol) é frequentemente encontrado nos ambientes aquáticos variando de $\mu\text{g.L}^{-1}$ a ng.L^{-1} e em diferentes condições, como em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), águas superficiais e água potável em diferentes países (tabela 4).

Estudos importantes realizados no Canadá indicaram que concentrações do estrógeno 17α -etinilestradiol, iguais as encontradas nas proximidades de lançamentos de efluentes (5-6 ng/L), levaram ao colapso as populações de peixes existentes em lagos experimentais (PELLEY, 2003). No estudo de Rodgres-Gray et al. (2001), peixes jovens da espécie *Rutilus rutilus* foram expostos a concentrações gradativas de efluente de ETE contendo estrógenos, por 150 dias, mostrando que a exposição induziu a feminização de peixes machos.

Subseqüentemente, os peixes foram gradativamente expostos a águas naturais por mais 150 dias, resultando na redução de VTG no plasma, porém, não se observou alteração no sistema sexual feminizado dos peixes, indicando que o desenvolvimento da anomalia no sistema reprodutivo foi permanente.

Tabela 4 - Concentração média e faixa de concentração de 17 α -etinilestradiol em diferentes países.

Substância	Classe da Substância	Concentração no ambiente	Local
17 α -etinilestradiol	estrogênio sintético	0,005 $\mu\text{g/L}$	Esgoto doméstico/Brasil
		0,001 $\mu\text{g/L}$	Efluente de ETE/ Alemanha
		0,0005 $\mu\text{g/L}$	Água potável/ Alemanha
		0,009 $\mu\text{g/L}$	Efluente de ETE/Canadá
		0,073 $\mu\text{g/L}$	Água natural/EUA
		0,007 $\mu\text{g/L}$	Afluente de ETE/França
		0,003 $\mu\text{g/L}$	Água superficial/França

Fonte: Bila e Dezotti (2016).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

No presente estudo foram avaliados os efeitos do hormônio 17α -etinilestradiol sobre a biologia da espécie de inseto *Chironomus sancticaroli*.

3.2 Objetivos específicos

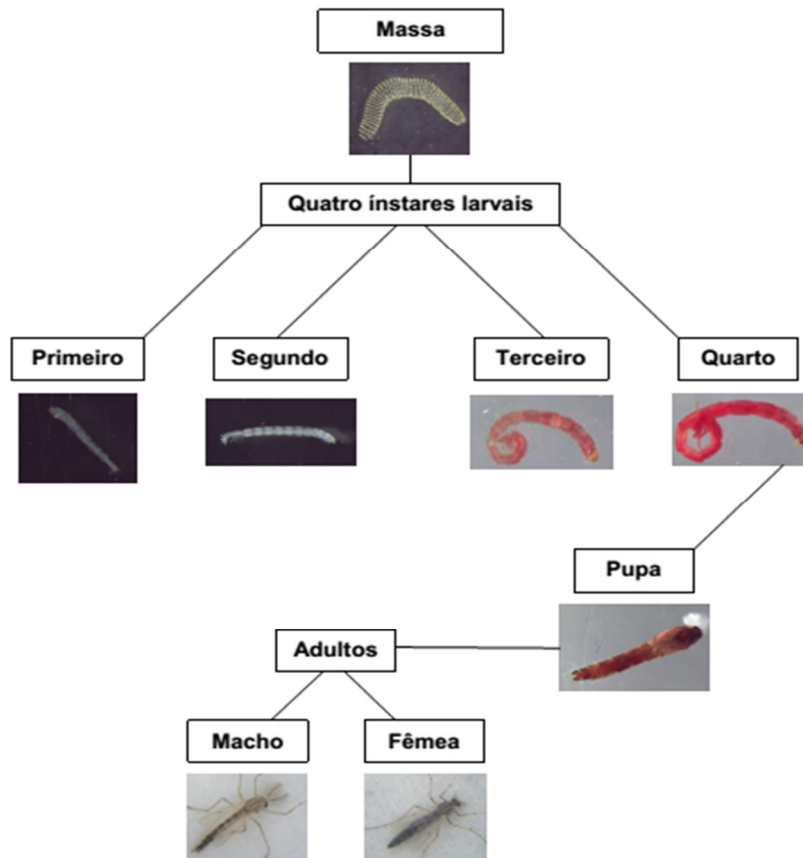
- Analisar a toxicidade aguda e crônica utilizando-se diferentes concentrações do hormônio;
- Verificar deformidades bucais nas larvas causadas pelas diferentes concentrações do hormônio;
- Avaliar possíveis alterações no desenvolvimento da espécie durante três gerações do ciclo de vida;
- Analisar a fecundidade potencial da espécie pela mensuração do tamanho das asas das fêmeas;
- Avaliar o tempo de emergência de adultos expostos as diferentes concentrações do hormônio.

4. Material e métodos

4.1 Organismos-teste

O organismo-teste selecionado foi a espécie bentônica *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera). Foi originalmente descrita por Trivinho-Strixino & Strixino, 1981. É considerada sinônimo júnior de *Chironomus xanthus* Rempel (1931) mas devido a inexistência de holótipos e parátipos, não foi possível comparar detalhadamente ambas as espécies, mantendo assim a designação da espécie *Chironomus sancticaroli*. A escolha desta espécie deve-se à facilidade na obtenção em grande quantidade de organismos e a sua manutenção, além de ser uma espécie nativa e tipicamente bentônica, além de já ter sido utilizada em estudos ecotoxicológicos anteriores (FONSECA, 1997). A espécie possui um ciclo de vida curto (13 dias) e quatro estágios: ovo, larva (I ínstar, II ínstar, III ínstar e IV ínstar) pupa e adultos, sendo todos os estágios larvais com grande sobrevivência de organismos (figura 4). A maior parte do ciclo de vida ocorre no período larval, sendo o período de pupa e o adulto de menor duração (Fonseca 2004). São animais coletores, ingerindo silte, detritos, perifiton e outras partículas disponíveis na superfície do sedimento (RASMUSSEM, 1984). A massa ovígera possui forma espiral e são colocados em média 550 ovos por fêmea, que eclodirão após um período de 44 a 48 horas (FONSECA e ROCHA, 2004). São larvas consideradas tolerantes ou grupo resistente, pois são capazes de sobreviver por várias horas em condições sem a presença de oxigênio (ALMEIDA, 2007). Apesar de serem realizadas várias pesquisas com este organismo, mostrando seu potencial como um bioindicador adequado para testes de toxicidade (CORBI e TRIVINHO-STRIXINO, 2000; DORNFELD, 2006), ainda não foram estabelecidas normas para este organismo (RIOS, 2013). Para Corbi et al, (2010), os invertebrados aquáticos, em geral, possuem a capacidade de bioacumulação, reforçando o uso deles como bioindicadores.

Figura 4 - Fases do ciclo de vida do inseto *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: Rebechi (2012).

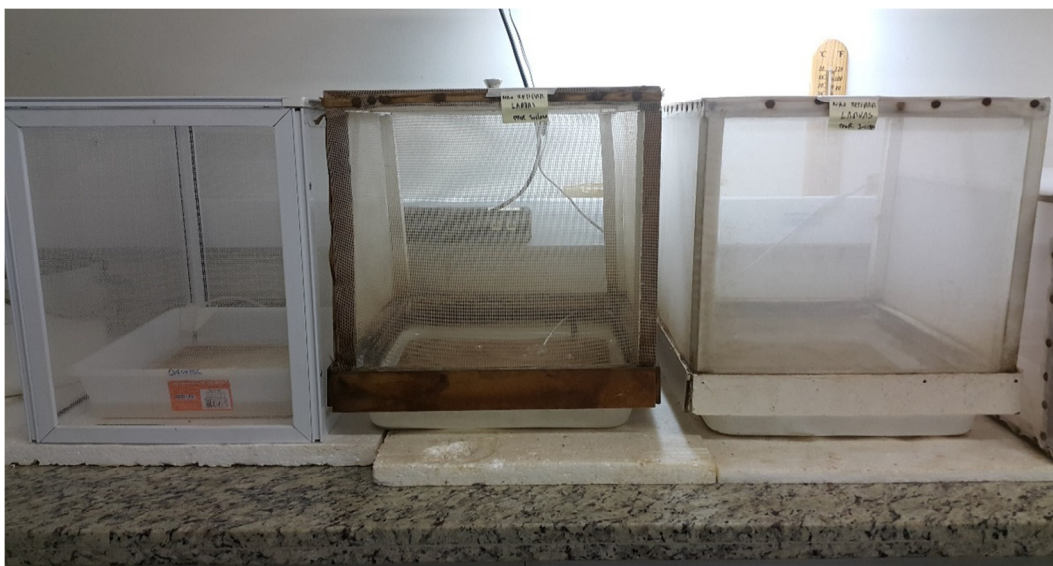
4.2 Cultura do organismo-teste

Os animais para a realização do experimento são criados no laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo (USP), localizado na cidade de São Carlos. A utilização desses animais provenientes de laboratório apresentam particular vantagem, já que a utilização de organismos coletados no ambiente nem sempre é confiável quanto à saúde desses organismos, com possível prévia exposição a diferentes compostos (Landis e Yu, 2005).

A criação da espécie foi realizada em bandejas cobertas por gaiolas de nylon para retenção dos organismos adultos (figura 5). Nessas bandejas é colocado sedimento esterilizado (areia fina comum, lavada em água corrente, seca em estufa a 60°C e levada a

mufla por 4 horas a 560°C), água deionizada (condutividade entre 25-55 μ S.cm⁻¹, dureza entre 12 e 16 mg.L⁻¹ para CaCO₃, pH entre 6,5 a 7,5 com temperatura de 22 a 26°C), mantida sob constante aeração e foto período de 12h luz/ 12 h escuro. Os organismos foram alimentados 2 vezes por semana com 5,0 ml de uma solução contendo 1 litro de água deionizada e 5,0 g de ração para peixe triturada (TetraMin®) de acordo com os métodos estabelecidos por de Dornfeld (2006).

Figura 5 - Criação de *Chironomus sancticaroli* em bandejas plásticas cobertas por gaiolas de nylon para retenção de adultos.



Fonte: Elaborada pelo autor

4.3 Teste de sensibilidade do organismo-teste

Foram realizados testes de sensibilidade para avaliar a qualidade do lote de larvas antes de serem realizados os testes crônicos. A substância de referência utilizada foi o KCL (cloreto de potássio) nas concentrações de 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹. Para realização do teste foi utilizado 60 g de substrato (areia de cultivo), 240 ml de solução-teste de KCl (proporção 1:4, sedimento-solução) e 6 organismos em cada pote, em triplicata (FONSECA 1991). Os organismos foram alimentados com 5 ml de solução composta por 5 g de ração tipo

TetraMin® em 1 litro de água deionizada, apenas no início do teste. Durante todo o teste não houve aeração.

4.4 Teste de toxicidade aguda (96h)

O hormônio 17α -etinilestradiol usado foi da marca Sigma Aldrich, com pureza $\geq 98\%$ (CAS: 57-63-6). Devido à baixa solubilidade em água, o metanol, com grau de pureza 99,5% (Merck) foi utilizado como solvente para o preparo da solução estoque de EE2, conforme estabelecido por Miguel (2016).

Para o teste de toxicidade aguda foi preparada uma solução estoque de 50 mg.L⁻¹, sendo 50 mg de EE2 dissolvidos em 0,5 mL de metanol e diluídos para 1 L de água deionizada, obtendo-se uma concentração final de solvente de 0,01%. A partir desta solução-estoque foram preparadas as soluções-teste em diferentes concentrações por meio de diluições em série.

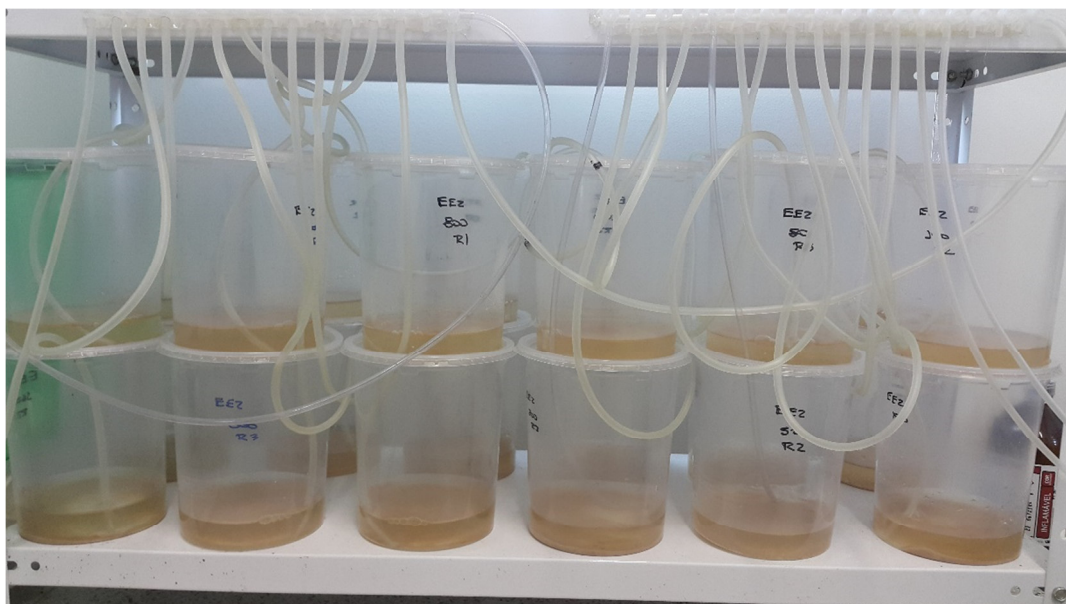
As concentrações usadas foram 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, visando analisar se o composto apresenta toxicidade ao organismo teste e estipular uma faixa de concentração mínima e máxima para o teste crônico, conforme procedimento realizado por Miguel (2016). Foram realizadas 3 réplicas para cada concentração e para o controle. Em cada pote, de 2 litros, foram colocadas 6 larvas de IV ínstar, contendo 60 g de areia de cultivo e 240 ml de solução contendo 17α -etinilestradiol (na proporção 1:4, sedimento-solução), com fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro, com temperatura controlada (entre 22° e 26° C), sem aeração e sem alimentação.

4.5 Teste de toxicidade crônica

Para o teste definitivo de toxicidade crônica foi preparada uma solução estoque de 50 mg.L⁻¹, sendo 50 mg de EE2 dissolvidos em 0,25 mL metanol e diluídos em 1 L de água deionizada, atingindo uma concentração final de solvente de 0,005%. A partir desta solução-estoque foram preparadas as soluções-teste em diferentes concentrações por meio de diluições em série.

No teste crônico foram utilizadas as concentrações de 50; 100; 200; 400; 800 e 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, além do controle. Foram realizadas 3 réplicas para cada concentração e para o controle. Em cada pote, de 2 litros, foram colocadas 15 larvas de I ínstar, contendo 60 g de areia de cultivo e 240 ml de solução contendo 17α -etinilestradiol (na proporção 1:4, sedimento-solução), com fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro, aeração constante e com temperatura controlada (entre 22° e 26° C), conforme figura 6.

Figura 6 - Esquema dos bioensaios de toxicidade crônica utilizando *Chironomus sanctycaroli* contendo 17α -etinilestradiol



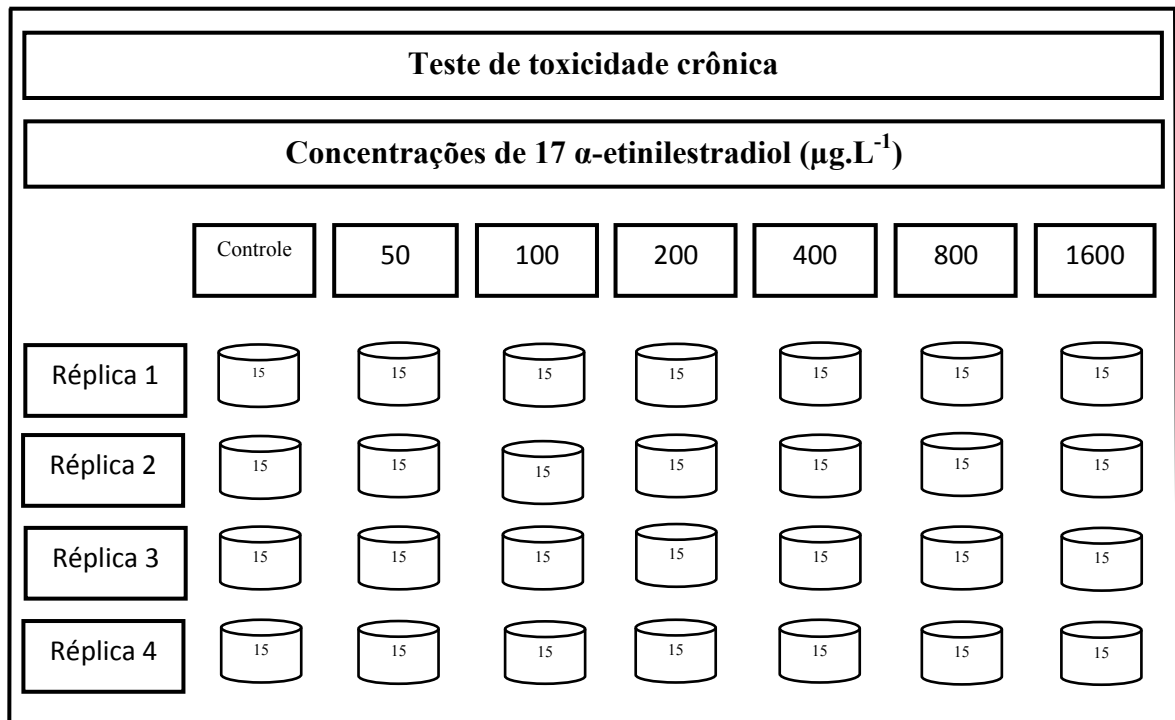
Fonte: Elaborada pelo autor

A alimentação era fornecida a cada 5 dias, sendo 10 ml de solução contendo 5,0 g de ração tipo TetraMin® em 1 litro de água deionizada. Medidas de pH, condutividade elétrica e dureza foram analisadas somente no início de cada geração do teste. O teste realizado foi estático, ou seja, a solução não era trocada do início ao fim do teste de cada geração F_1 , F_2 e F_3 .

As desovas de cada concentração, mais o controle, eram realocadas em novos potes contendo a concentração inicial da solução de 17α -etinilestradiol e seguindo os mesmos procedimentos de cultivo (figura 7). Foram realizadas e analisadas 3 gerações a partir dos

parentais. A partir da primeira desova em cada pote, o experimento foi encerrado e os organismos conservados em álcool 70% para posterior análise.

Figura 7 – Esquema demonstrando a dinâmica do experimento durante as três gerações.

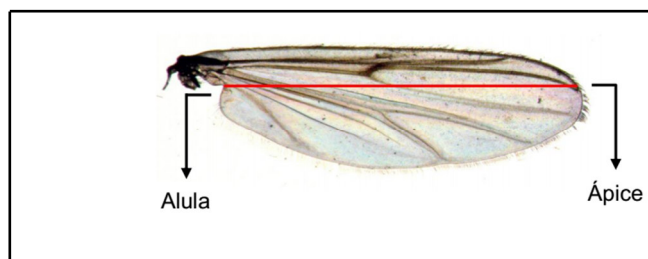


Fonte: Elaborada pelo autor

4.6 Avaliação de fecundidade potencial

A avaliação de fecundidade potencial (número de ovos da primeira desova presentes nos ovários das fêmeas) foi realizada conforme o método de Trivinho-Strixino e Strixino (1989), onde é medido o comprimento da asa, partindo da alula até o ápice da asa (figura 8).

Figura 8 - Asa da fêmea de *Chironomus sancticaroli* e as posições a utilizadas nas mensurações.



Fonte: Rebechi (2012).

Para avaliar a fecundidade a partir da asa, foi aplicado a fórmula estabelecida por Trivinho-Strixino e Strixino (1989):

$$F = (k \cdot L) - m$$

Onde:

F = fecundidade potencial

K = constante (471,64)

L = comprimento da asa

m = constante (707,41)

4.7 Análises estatísticas

Para o cálculo da CL50 da substância de referência cloreto de potássio, utilizou-se o pacote “RDC” no software “R” (R Code Team 2014), visando encontrar a faixa de sensibilidade do organismo testado. Os dados foram plotados em curva dose-padrão, sendo no eixo “x” as concentrações de KCL (g/L) e no eixo “y” a porcentagem de mortalidade.

Para o cálculo do desenvolvimento das larvas e da fecundidade potencial das fêmeas, foram aplicados testes de variância (ANOVA) com auxílio do programa computacional Past® para as análises estatísticas. Foi considerado como diferença significativa os valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram plotados em gráficos de barra, para o desenvolvimento; e box-plot para a fecundidade potencial as fêmeas.

5 RESULTADOS

5.1 – Teste de sensibilidade para *Chironomus sancticaroli*

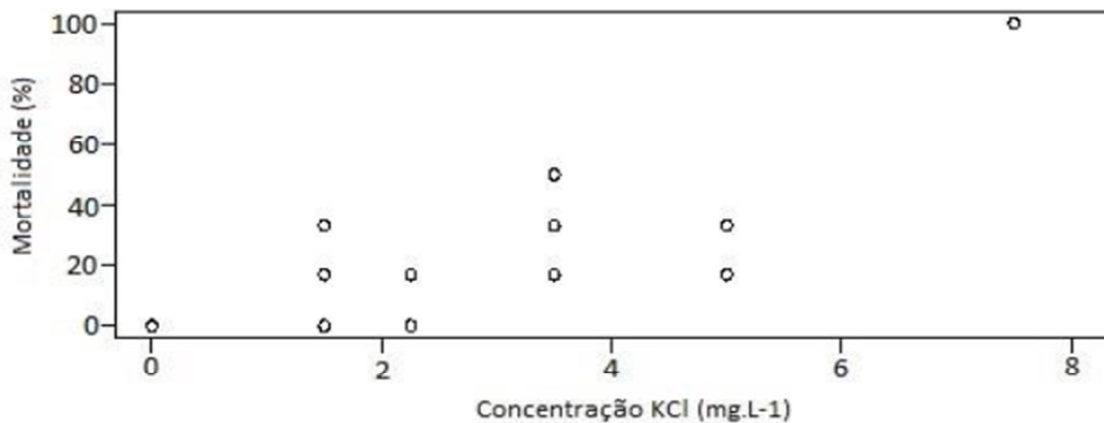
Para o teste de sensibilidade do organismo-teste, *Chironomus sancticaroli*, utilizou-se a substância cloreto de potássio (KCL), cujo resultado encontra-se na tabela 5 e figura 9. Os resultados demonstraram que o lote de larvas encontrava-se dentro dos valores limites esperados para análises.

Tabela 5 - Valores da CL₅₀ e intervalos de confiança para a substância de referência KCL para o teste de sensibilidade de *Chironomus sancticaroli*.

CL ₅₀ (g.L ⁻¹)	desvio padrão	intervalo de confiança (g.L ⁻¹)
5,03	0,47	4,02 – 6,04

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 9 – Curva dose resposta de *Chironomus sancticaroli* ao cloreto de potássio em teste de toxicidade aguda



Fonte: Elaborada pelo autor

5.2 Variáveis físicas e químicas do bioensaio de toxicidade aguda

No início dos testes foram quantificadas as variáveis físicas e químicas, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Valores das variáveis físicas e químicas da solução teste para biosensaios de toxicidade ao organismo *Chironomus sancticaroli*.

pH	Temperatura (°C)	Condutividade (μ s)	Dureza (mg/L CaCO ₃)
7,76 -8,14	22 - 23,5	48 -51	18 - 22,5

Fonte: Elaborada pelo autor

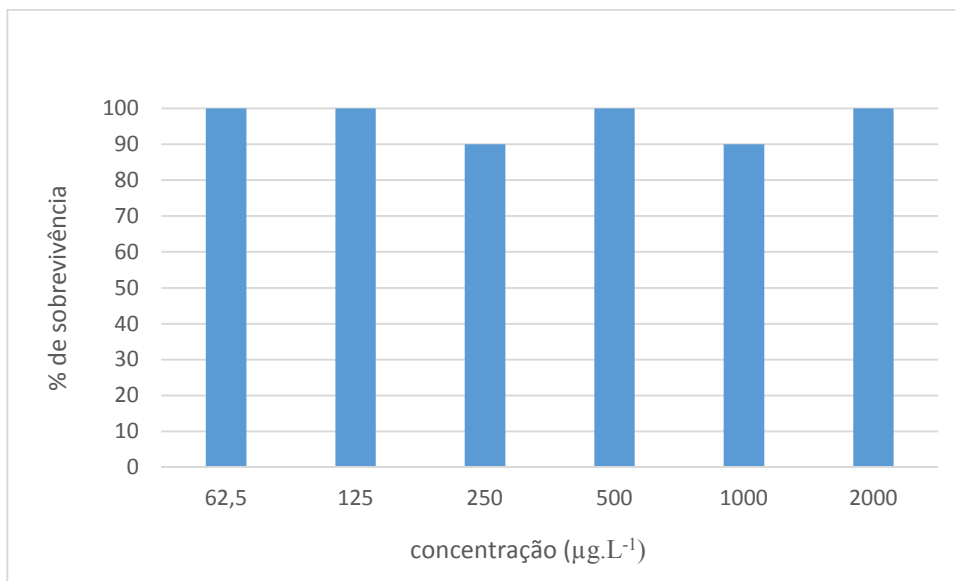
5.3 Bioensaio de toxicidade aguda (96 h) com *Chironomus sancticaroli*

Baseado no preceito de Barbosa (2000), verificou-se o grau de toxicidade do composto ao organismo-teste, conforme a classificação:

- Tóxico (sobrevivência < 50%)
- Indício de toxicidade (50% < sobrevivência < 90%)
- Não tóxico (sobrevivência > 90%)

O experimento mostrou que o composto 17 α - etinilestradiol não apresenta toxicidade aguda, de acordo com os resultados apresentados na Figura 10, sendo os valores expressos em porcentagem de sobrevivência.

Figura 10 - Porcentagem de sobrevivência do *Chironomus sancticaroli* ao composto 17α -etinilestradiol, em teste agudo de 96 horas.

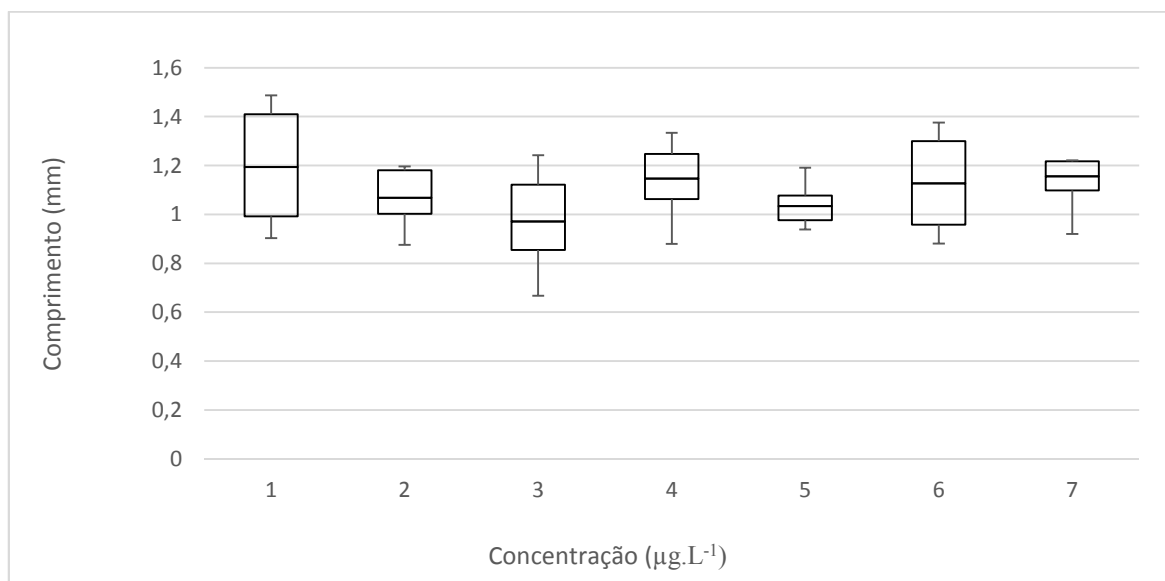


Fonte: Elaborada pelo autor

5.4 Desenvolvimento larval

Foram mensuradas 8 larvas de IV instar por concentração do tratamento. As larvas foram retiradas aleatoriamente e conservadas em álcool 70%. Posteriormente foram fotografadas e medidas com o auxílio do programa computacional IMAGEJ. Para analisar os dados usou-se o teste estatístico ANOVA- one way no programa estatístico PAST, cujo resultado mostrou que não há diferença significativa entre os tratamentos, sendo o p-valor $\geq 0,05$, com posteriori de TUKEY'S, conforme resultados apresentados na figura 11.

Figura 11 – Comprimento das larvas de *Chironomus sancticaroli*, primeira geração, a partir do teste ANOVA one-way.

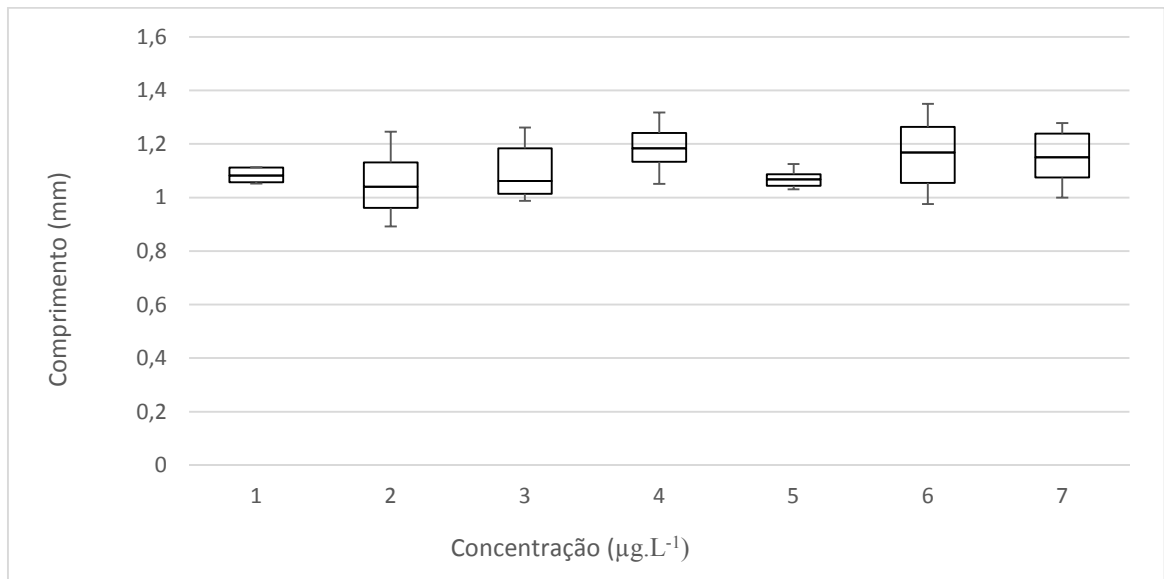


1-(Controle) ; 2- (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$); 3- (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$); 4- (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$); 5- (400 $\mu\text{g.L}^{-1}$); 6- (800 $\mu\text{g.L}^{-1}$); 7- (1600 $\mu\text{g.L}^{-1}$)

Fonte: Elaborada pelo autor

Na segunda geração os procedimentos foram os mesmos usados na primeira geração. Para analisar os dados usou-se o teste estatístico ANOVA- one way, cujo resultado mostrou que não há diferença significativa entre os tratamentos, sendo o p-valor $\geq 0,05$, com posteriori de TUKEY'S, conforme resultados apresentados na figura 12.

Figura 12 – Comprimento das larvas de *Chironomus sancticaroli*, segunda geração, a partir do teste ANOVA one-way.

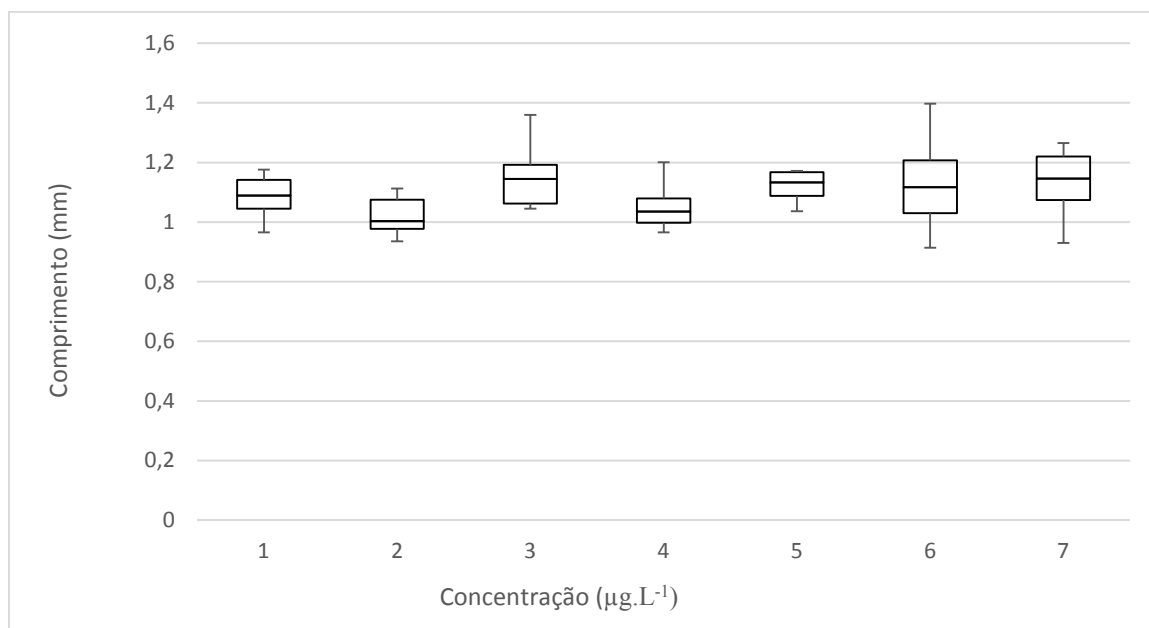


1-(Controle); 2- (50 µg.L⁻¹); 3- (100 µg.L⁻¹); 4- (200 µg.L⁻¹); 5- (400 µg.L⁻¹); 6- (800 µg.L⁻¹); 7- (1600 µg.L⁻¹)

Fonte: Elaborada pelo autor

Na terceira geração usou-se o teste estatístico ANOVA- one way para analisar os dados, cujo resultado mostrou que não há diferença significativa entre os tratamentos, sendo o p-valor $\geq 0,05$, com posteriori de TUKEY'S, conforme resultados apresentados na figura 13.

Figura 13 – Comprimento das larvas de *Chironomus sancticaroli*, terceira geração, a partir do teste ANOVA one-way.



1-(Controle) , 2- (50 µg.L⁻¹), 3- (100 µg.L⁻¹), 4- (200 µg.L⁻¹), 5- (400 µg.L⁻¹), 6- (800 µg.L⁻¹), 7- (1600 µg.L⁻¹)

Fonte: Elaborada pelo autor

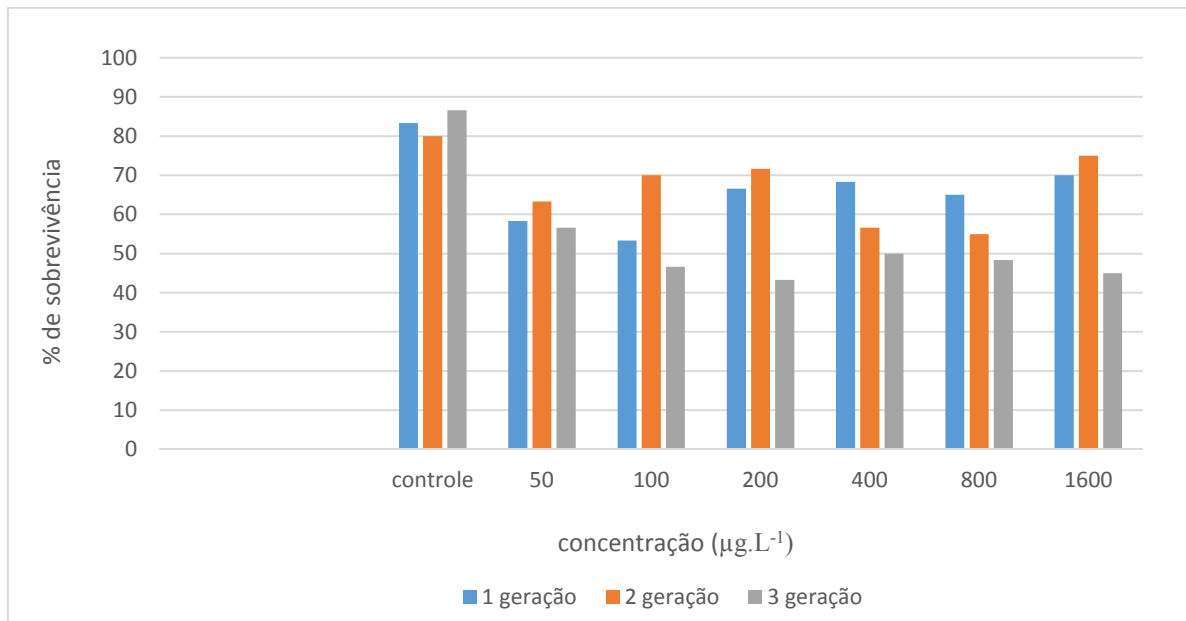
5.5 – Bioensaio de toxicidade crônica (mortalidade) com *Chironomus sancticaroli*

Seguindo os preceitos de Barbosa (2000), verificou-se o grau de toxicidade do composto ao organismo-teste, conforme a classificação:

- Tóxico (sobrevivência < 50%)
- Indício de toxicidade (50% < sobrevivência < 90%)
- Não tóxico (sobrevivência > 90%)

No final dos testes de cada geração, verificou-se a mortalidade das larvas, podendo assim indicar a toxicidade do composto 17 α - etinilestradiol em períodos mais longos. Os resultados mostraram haver indícios de toxicidade na primeira e segunda gerações. Na terceira geração os resultados indicam que o composto é tóxico ao organismo teste, conforme resultados apresentados na figura 14.

Figura 14 - Porcentagem de sobrevivência das larvas de *Chironomus sancticaroli* até a primeira desova, das três gerações analisadas.

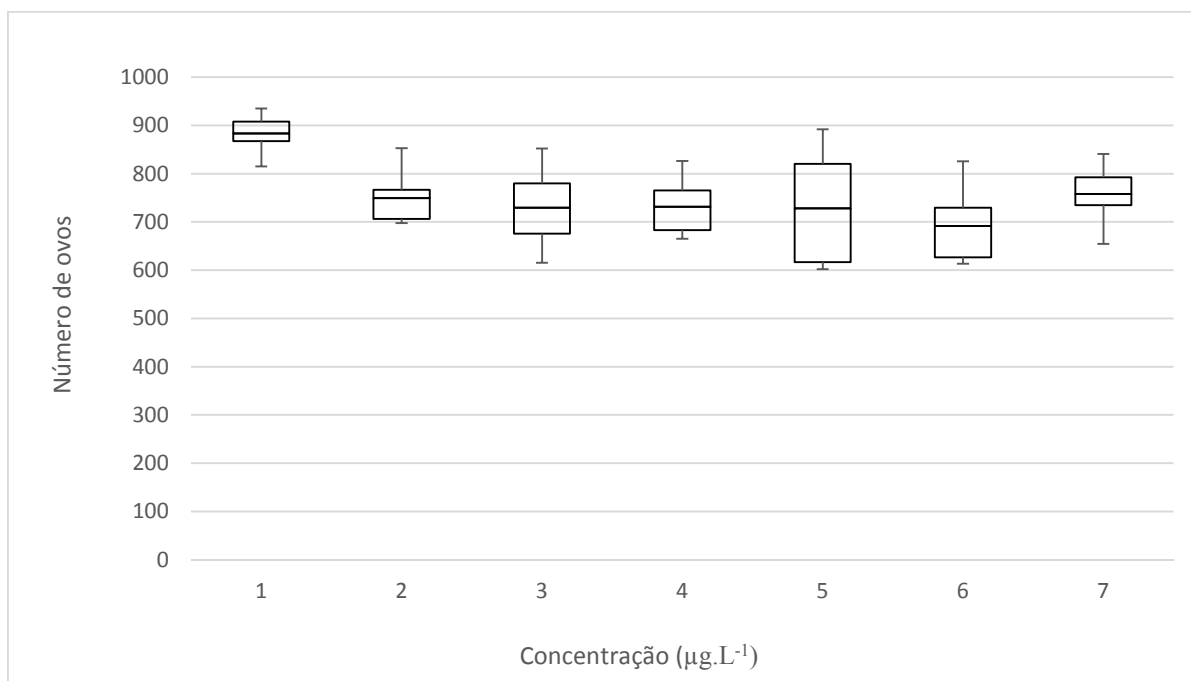


Fonte: Elaborada pelo autor

5.6- Fecundidade potencial

Foi realizado a análise estatística ANOVA- one way, com posteriori de tukey, no programa estatístico PAST, e os resultados mostraram não haver diferença significativa entre os tratamentos e o controle, com $p = 0,1439$, conforme resultados apresentados na Figura 17.

Figura 15 - Fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* na primeira geração

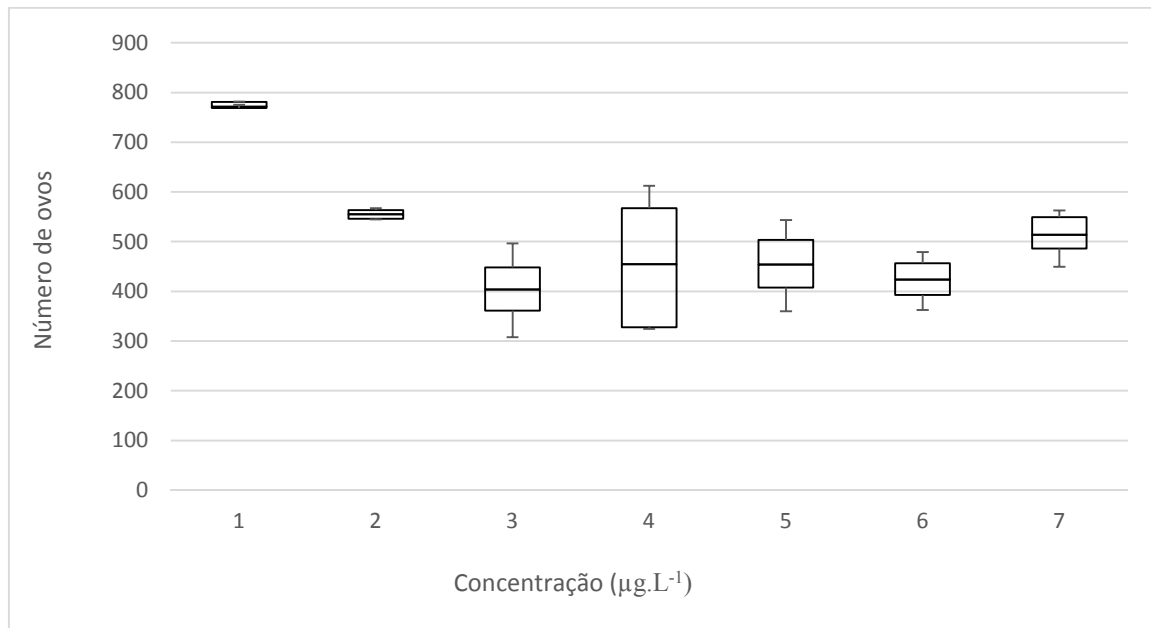


1-(Controle) , 2- (50 µg.L⁻¹), 3- (100 µg.L⁻¹), 4- (200 µg.L⁻¹), 5- (400 µg.L⁻¹), 6- (800 µg.L⁻¹), 7- (1600 µg.L⁻¹)

Fonte: Elaborada pelo autor

Na segunda geração os dados foram analisados em um teste ANOVA- one way, com posteriori de tukey, e os resultados mostraram haver diferença significativa entre os tratamentos e o controle, com $p = 0,000015$, conforme resultados apresentados na Figura 18.

Figura 16 - Fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* na segunda geração.

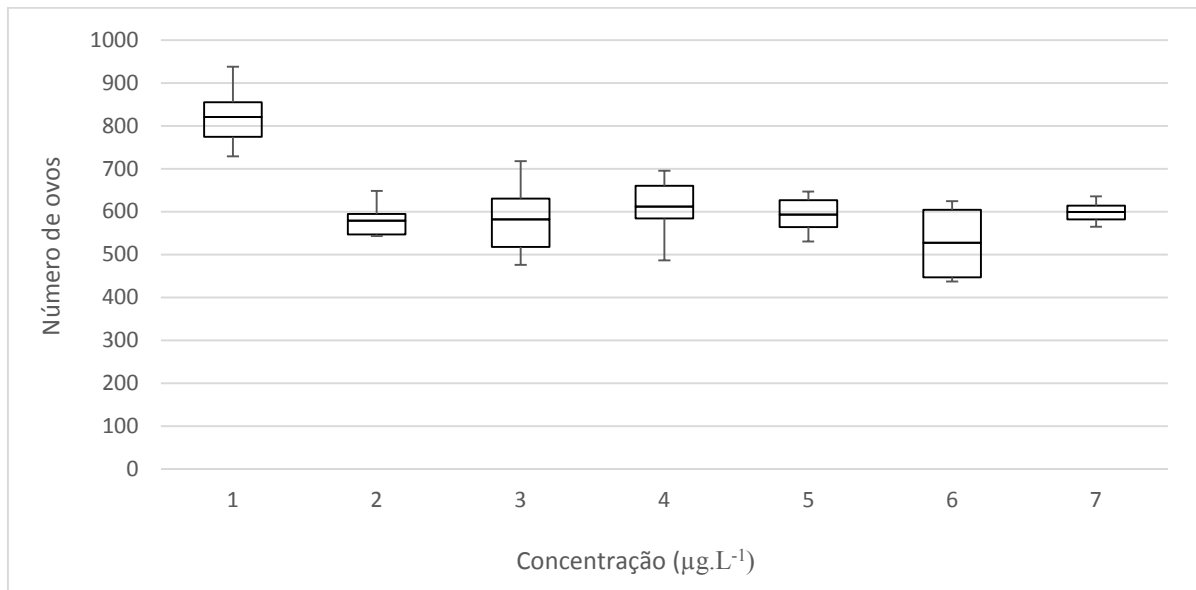


1-(Controle); 2- (50 µg.L⁻¹); 3- (100 µg.L⁻¹); 4- (200 µg.L⁻¹); 5- (400 µg.L⁻¹); 6- (800 µg.L⁻¹); 7- (1600 µg.L⁻¹)

Fonte: Elaborada pelo autor

Na terceira geração os dados foram analisados em um teste ANOVA- one way, com posteriori de tukey, e os resultados mostraram haver diferença significativa entre os tratamentos e o controle, com $p = 0,000962$, conforme resultados apresentados na Figura 19.

Figura 17 - Fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancti-caroli* na terceira geração.



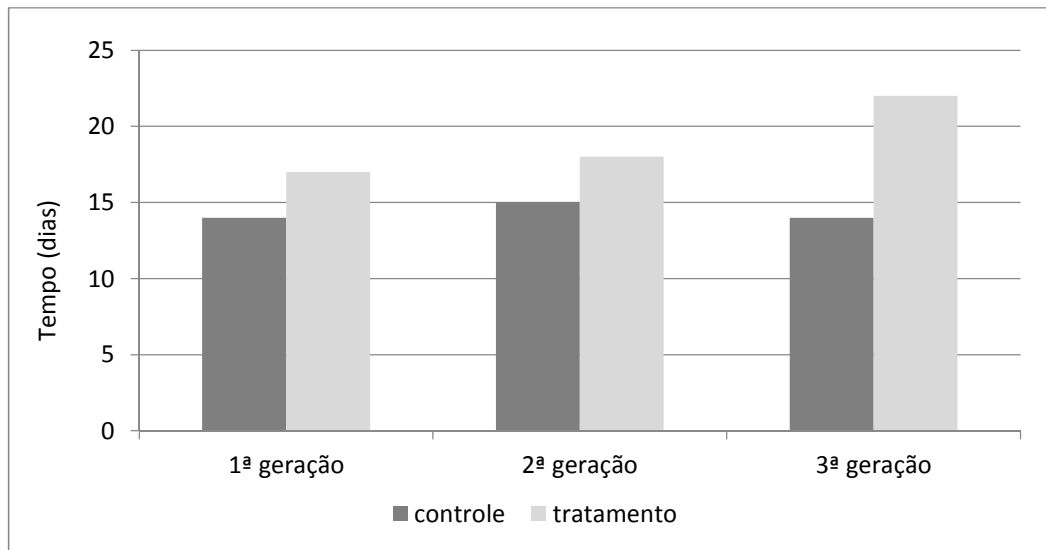
1-(Controle); 2- ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$); 3- ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$); 4- ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$); 5- ($400 \mu\text{g.L}^{-1}$); 6- ($800 \mu\text{g.L}^{-1}$); 7- ($1600 \mu\text{g.L}^{-1}$)

Fonte: Elaborada pelo autor

5.7 – Tempo de emergência

Para padronizar os resultados nas três gerações, encerrou-se a contagem do tempo quando o primeiro adulto emergia em cada concentração e posteriormente foi realizada uma média aritmética. Os valores do tempo da emergência dos adultos estão representados na Figura 20.

Figura 18 – Tempo médio da emergência de adultos de *Chironomus sancticaroli* durante três gerações, a uma temperatura média de 24°C.

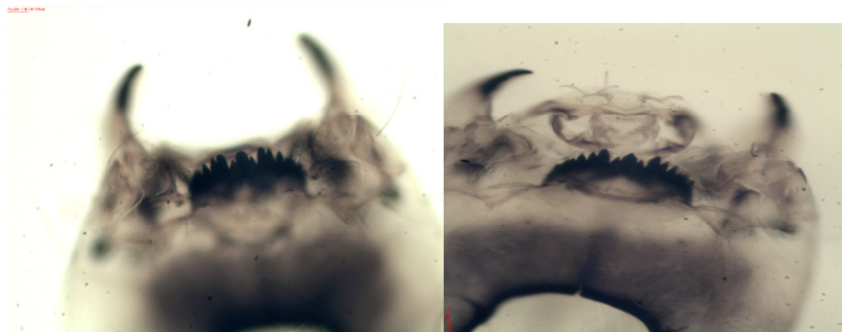


Fonte: Elaborada pelo autor

5.8 - Análise de deformidade bucal

A análise do mento foi realizada com auxílio do microscópio óptico, aumento de 10x, demonstrando não haver deformidade nos dentes, ausência e/ou aumento no número de dentes, conforme as figuras de 21 a 26.

Figura 19 - Mento das larvas de IV ínstar de *Chironomus sancticaroli* na concentração 50 µg.L⁻¹



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 20 - Mento das larvas de IV ínstar de *Chironomus sancticaroli* na concentração $100 \mu\text{g.L}^{-1}$



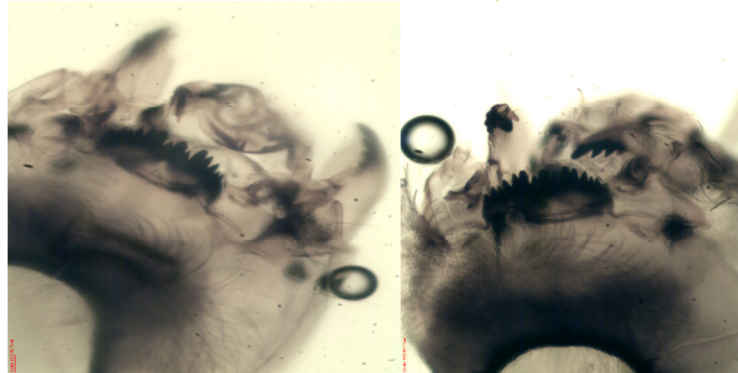
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Mento das larvas de IV ínstar de *Chironomus sancticaroli* na concentração $200 \mu\text{g.L}^{-1}$



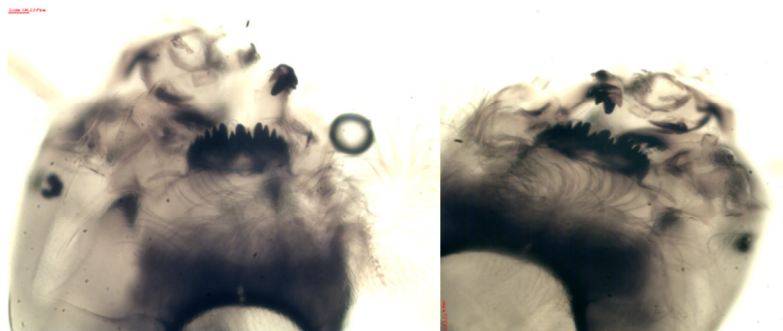
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 22 - Mento das larvas de IV ínstar de *Chironomus sancticaroli* na concentração $400 \mu\text{g.L}^{-1}$



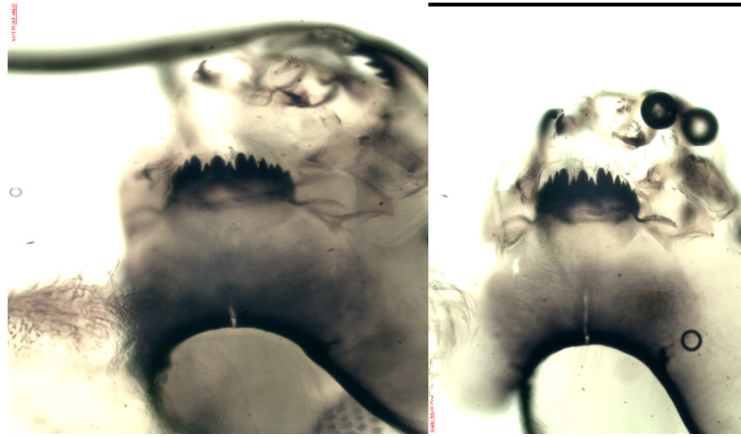
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 23 - Mento das larvas de IV ínstar de *Chironomus sancticaroli* na concentração $800 \mu\text{g.L}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 24 - Mento das larvas de IV ínstar de *Chironomus sancticaroli* na concentração $1600 \mu\text{g.L}^{-1}$



Fonte: Elaborada pelo autor

6 Discussão

6.1 - Teste de sensibilidade

No presente trabalho encontrou-se uma faixa de sensibilidade ao cloreto de potássio (KCL) de 5,03 g.L⁻¹, com limites inferior de 4,02 g.L⁻¹ e superior de 6,04 g.L⁻¹. Comparado com outros autores, como por exemplo fonseca (1997) cuja faixa encontra-se entre os valores inferior e superior de 2,6 a 6,4 g.L⁻¹, respectivamente, ou para Santos (2007) cujo valor médio encontrado foi de 5,84 g.L⁻¹ e Campagna (2010) com uma faixa média de 3,38 g.L⁻¹, os valores encontrados no presente trabalho estão dentro dos valores encontrados por outros autores, como Fonseca (2010) e Santos (2007).

6.2- Toxicidade aguda do *Chironomus sancticaroli* ao composto 17 α -etinilestradiol

O teste foi realizado com larvas de IV ínstar, durante 96 horas, sem aeração e alimentação. Os resultados mostraram que mesmo na maior concentração não houve mortalidade, o que também foi encontrado em concentrações menores e no controle. A mortalidade em algumas concentrações, como na de 250 e 1000 μ g.L⁻¹, pode esta relacionada a outros fatores que não a toxicidade, haja vista que na maior concentração não houve mortalidade.

Para Novelli (2010), as réplicas de um mesmo tratamento podem se comportar de modo diferente. Para Viveiros (2012), o estresse físico provocado pela manipulação potencializa a redução do percentual de sobrevivência.

6.3 - Toxicidade crônica (mortalidade) com *Chironomus sancticaroli*

O tempo de duração do teste crônico foi igualmente estabelecido para todas as concentrações e gerações do experimento, ou seja, até a primeira desova de cada concentração. Em todas as gerações foram seguidos os preceitos de Barbosa (2000), e

dependendo da porcentagem de sobreviventes, o composto poderia ser : Tóxico (sobrevivência < 50%), ter indícios de toxicidade (50% < sobrevivência < 90%) ou não tóxico (sobrevivência > 90%). Seguindo esse raciocínio, os resultados mostraram que o composto 17 α -etinilestradiol apresenta indícios de toxicidade crônica, haja vista que os resultados mostraram uma faixa de 53,3 a 70% de sobrevivência para o tratamento e de 83,3% para o controle. Segundo Dornfeld (2002), o primeiro ínstar (ínstar I) da fase larval é mais sensível que os demais . No experimento de Moraes (2012), as larvas de ínstar I e II mostraram ser mais sensíveis ao composto fenantreno do que as larvas de III e IV ínstar.

Foi realizado também um teste estatístico ANOVA-one way, visando analisar se havia diferença entre os tratamentos e o controle, e posteriormente um teste estatístico de tukey, visando analisar quais dos tratamentos eram diferentes do controle. Os resultados mostraram não haver diferença significativa entre os tratamento e o controle. No teste a posteriori de tukey, os resultados mostraram não haver diferenças significativas entre os tratamentos.

Portanto, apesar dos resultados mostrarem que o composto 17 α -etinilestradiol apresenta indícios de toxicidade, segundo os preceitos de Barbosa (2001), porém as análises estatísticas mostraram não ser significativa as diferenças entre controle e tratamentos.

Os testes para a segunda geração do *Chironomus sancticaroli* foi realizada a partir das desovas obtidas no experimento da primeira geração, o mesmo acontece com as larvas do controle, obtidas das desovas do controle da primeira geração. Os resultados mostraram uma faixa de sobrevivência que varia de 55 a 75% entre os tratamentos, e de 80% para o controle. Levando-se em conta os preceitos de Barbosa (2000), há indícios de toxicidade ao composto 17 α -etinilestradiol, mas os testes estatísticos ANOVA-one way e tukey mostraram não haver diferenças significativas entre os tratamentos, e destes com o controle.

Os testes para terceira geração do experimento foi realizada a partir das desovas da segunda geração, em suas respectivas concentrações, o que vale também para o controle. Nesse experimento, os resultados mostraram uma faixa de 43,3 a 56,6% de sobrevivência entre os tratamentos, e de 86,6% de sobrevivência para o controle. Esses resultados, portanto, demonstram que o composto 17 α -etinilestradiol é tóxico ao *Chironomus sancticaroli*, o que foi comprovado pelo teste estatístico ANOVA- one way com $p \leq 0,05$ e a posteriori de tukey.

6.4 Desenvolvimento larval

Foram analisadas 2 larvas de IV ínstar em cada réplica, totalizando 8 larvas por concentração e 56 larvas em cada geração. As mesmas foram retiradas aleatoriamente e conservadas em álcool 70%. Posteriormente foram fotografadas e medidas com o auxílio do programa computacional IMAGEJ (versão 1.51k).

As larvas da primeira geração foram medidas e os dados analisados através do programa estatístico ANOVA one-way com a posteriori de tukey. Os resultados mostraram não haver diferenças significativas entre os tratamentos e o controle, com $p = 0,1361$.

As larvas da segunda geração foram medidas e os dados analisados através do programa estatístico ANOVA one-way com a posteriori de tukey. Os resultados mostraram não haver diferença significativa entre os tratamentos e o controle com $p = 0,1109$.

As larvas da terceira geração foram medidas e os dados analisados através do programa estatístico ANOVA one-way com a posteriori de tukey. Os resultados mostraram não haver diferença significativa entre os tratamentos e o controle com $p = 0,05687$.

6.5 Tempo de emergência

Na primeira geração o tempo médio de desenvolvimento, da eclosão das larvas até a fase adulta no controle e nos tratamentos foram de 14 e 17 dias, respectivamente, em uma temperatura média de 24°C. Segundo Strixino e Strixino (1982a), o tempo de desenvolvimento relaciona-se com a temperatura, podendo ir de 15-17 dias (21,0 a 24,0 °C) a 28-30 dias (15,0 a 19,5 °C). Segundo Zilli *et al.*, (2008) outro fator a ser observado é a quantidade e a qualidade do alimento, o que pode ocasionar um aumento ou atraso no desenvolvimento larvar. Para Trivinho-Strixino (2011) pouco alimento pode reduzir a sobrevivência dos organismos adultos, principalmente as fêmeas, que ficam menores e menos fecundas. Além disso, as baixas temperaturas também podem reduzir a sobrevivência dos organismos adultos. O tempo de desenvolvimento encontrado no presente trabalho está de acordo com os encontrados em outros trabalhos, como o de Fonseca (1997) e Strixino e Strixino (1982a), mostrando que o composto testado não afetou o tempo de desenvolvimento da espécie.

Na segunda geração o tempo médio de desenvolvimento, da eclosão das larvas até a fase adulta no controle e nos tratamentos foram de 15 e 18 dias, respectivamente, em uma temperatura média de 24°C. Os procedimentos, na questão de alimentação e temperatura, foram os mesmos para a primeira geração e os resultados estão de acordo com os encontrados em trabalhos de outros autores, como os citados na primeira geração.

Na terceira geração o tempo médio de desenvolvimento, da eclosão das larvas até a fase adulta no controle e nos tratamentos foram de 14 e 22 dias respectivamente, em uma temperatura média de 24°C. Os procedimentos de cultivos foram os mesmos nas duas gerações anteriores. Nessa geração observou-se um atraso no desenvolvimento, que foi de 22 dias, em relação ao controle dessa e das outras gerações : 14, 15 e 14 dias respectivamente, e em relação aos tratamentos das outras gerações : 17, 18 e 22 dias respectivamente. Segundo Strixino e Strixino (1982a) o desenvolvimento pode se dar entre 15 a 17 dias, valores esses encontrados na primeira e segunda geração. Já na terceira geração, o atraso de 5 dias corrobora com a hipótese de que o composto 17 α -etinilestradiol pode causar um atraso no tempo de desenvolvimento larvar até a fase adulta.

6.6 – Deformidade bucal

Foram analisadas 4 cápsulas cefálicas de *Chironomus sancticaroli*, de IV ínstar, em cada réplica do tratamento e do controle, escolhidas aleatoriamente, totalizando 16 cápsulas por tratamento. Em todas as gerações não foram encontradas mutações no mento, como GAP (achatamento em partes dos dentes), deformidade, ausência/aumento de dentes ou bifurcação no dente central, conforme Warwick *et al.* (1987). Nos estudos de Dornfeld (2006) observou-se de 2,0 \pm 2,8% de deformidade no mento nos organismos do controle. Em outros estudos, como os de Vermeulen *et al.* (2000), verificou-se alta incidência de deformidade no mento em suas culturas e nos controles de seu experimento (34 a 56%), concluindo, assim, que o cruzamento entre parentes nas culturas é tido como maior fator responsável pelas deformidades nos controles. Apesar dos resultados não apontarem deformidades nas peças bucais, é prematuro afirmar que o composto testado não causa deformidades no mento na espécie *Chironomus sancticaroli*. Para tanto faz-se necessário estudos mais detalhados com uma maior quantidade de larvas, priorizando gerações que não sejam aparentadas.

6.7 – Fecundidade potencial

Na primeira geração, o número de ovos encontrados foram de 883 para o controle e de 691 a 758 ovos para os tratamentos. O teste estatístico ANOVA mostrou não haver diferença significativa entre o controle e os tratamentos com $p \geq 0,05$. Na segunda geração verificou-se um número de 771 ovos para o controle e uma variação média de 404 a 555 ovos para os tratamentos. Neste caso o teste ANOVA mostrou um $p \leq 0,05$, indicando que há diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Na terceira geração encontrou-se um número de 820 ovos para o controle e uma variação média de 527 a 611 ovos para os tratamentos. O teste ANOVA mostrou um $p \leq 0,05$ indicando que há diferença significativa entre o controle e os tratamentos.

Em outros trabalhos, como o de Fonseca e Rocha (2004) foram encontrados de 500 a 600 ovos. No trabalho de Strixino-Strixino (1982) foram encontrados de 500 a 1045 ovos, com um valor médio de 744 ovos. Segundo Strixino e Strixino (1982), a quantidade de alimento, na fase larval, está diretamente relacionada com tempo de desenvolvimento e a quantidade de ovos depositadas pelas fêmeas. O mesmo acontece com a variação de temperatura, onde variações de 15 a 18°C verificou-se um atraso na maturação dos ovos nas fêmeas adultas e diminuição da fecundidade potencial devido a energia absorvida ser utilizada para a própria manutenção.

Apesar dos resultados estatísticos indicarem uma diferença significativa entre os tratamentos e os controles das três gerações, não se pode afirmar que o composto testado 17 α -etinilestradiol afeta a fecundidade das fêmeas. Faz-se, portanto, necessário testes mais aprofundados, com uma maior quantidade de fêmeas na população e um maior número de gerações, haja vista ter sido mensurado apenas quatro asas de fêmeas em cada concentração do tratamento.

7. Conclusão

Os experimentos demonstraram que o hormônio feminino 17 α -etinilestradiol não apresenta toxicidade aguda ao organismo da espécie *Chironomus sancticaroli*. Em testes crônicos, que compreendeu um período entre 17 a 22 dias, o composto mostrou indícios de toxicidade na primeira e segunda gerações (50% < sobrevivência < 90%), e apresentou ser tóxico (sobrevivência < 50%) na terceira geração, o que indica que o organismo fica mais suscetível ao hormônio com o passar das gerações.

No desenvolvimento do *Chironomus sancticaroli*, os resultados demonstraram não haver modificação morfológica, aumento ou diminuição do tamanho, nas larvas de IV ínstar dos tratamentos em relação ao controle nas três gerações.

No tempo de emergência de adultos, na terceira geração, houve um atraso de 5 dias em relação ao controle, indicando que o composto pode retardar o desenvolvimento até a fase adulta em gerações subsequentes, porém não se pode afirmar que o composto testado afeta o desenvolvimento dessa espécie. Para tanto faz-se necessário a continuidade dos testes, fazendo com que o ciclo de vida seja completo e não interrompido a cada desova, para que assim se possa obter uma média exata do ciclo de vida em cada tratamento.

Na fecundidade potencial das fêmeas, as análises estatísticas mostraram haver diferença significativa entre os tratamentos e os controles na segunda e terceira gerações, indicando que o composto pode afetar a quantidade de desovas depositados pelas fêmeas em gerações subsequentes, porém é precoce afirmar que o 17 α -etinilestradiol afeta a fecundidade das fêmeas. Para tanto faz-se necessários estudos posteriores com um maior número de fêmeas e com um maior número de gerações, podendo-se assim obter não somente a fecundidade mas se o composto afeta a razão macho/fêmea.

Na análise do mento não houve indícios de deformidade, entretanto é prematuro afirmar que o composto não afeta o organismo em relação a deformidade bucal, uma vez que foram analisadas poucas cápsulas cefálicas. Portanto, faz-se necessários testes posteriores com um maior número larvas de IV ínstar em um maior número de gerações.

Referências bibliográficas

ALEGRE, G. F. **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do Rio Tietê, entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP.** 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALMEIDA, C. A. **Estudo ecotoxicológica do sedimento de represa do rio Tietê com organismo-teste bentônico: *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera).** 2002. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

ALMEIDA, C. A. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos naturais e reservatórios.** 2007. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, 2007.

ALVES, F. Ministério do meio ambiente quer garantias na recuperação de áreas. **Saneamento Ambiental**, 48, p. 14-19, 1997.

ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais.** 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. Disponível: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-17012007-144901/>>. Acesso em: 2014-12-02.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. **Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review.** Environment International, 69, 104-119, 2014. doi:10.1016/j.envint.2014.04.011.

BALDAN, L. T. **Macroinvertebrados em cavas adjacentes ao rio Iguçu e uso de *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 como potencial bioindicador ambiental.** 97 f. tese (doutorado). Universidade federal do Paraná. 2012.

BARBOSA, R. M. **Avaliação do impacto de efluentes (lodos) de estações de tratamento de água à biota aquática através de testes de toxicidade.** 199 f. Tese (Doutorado) – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.

BERNADUCE, A. P. S. **Toxicidade do Cádmio em Embriões e Larvas de *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) em Diferentes Alcalinidades da Água.** 61 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

BERTOZI, R. I.; **Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento.** Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-06072011-151352/>>. Acesso em: 2014-12-10.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** Quím. Nova, São Paulo, v.26, n.4, p.523-530. 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências.** Quimica Nova, 2007.

BOTTS, P. S. **Spatial pattern, patch dynamics and successional change: chironomid assemblages in a Lake Erie coastal wetland.** *Freshwater Biol.* 37:277-286, 1997.

BROWNING, T. O. **The influence of temperature on the rate of development of Insects, with special reference to the eggs of *Gryllulus commodus* Walker.** *Aust. J. Scient. Res. Ser. B*, 5(1): 96-111, 1952.

CALLAGHAN, A.; Hirthe, G.; Fisher, T.; Crane, M. **Effects of short-term exposure to chlorpyrifos on biochemical, behavioural and life-history biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen.** *Ecotoxicology and Environmental Safety.* v. 50, p.19-24, 2001.

CALLISTO, M. et al **Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos.** *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v.6, p.71-82, 2001.

CAMPAGNA, A. F. **Estudos limnológicos e ecotoxicológicos da bacia do alto Jacaré – Guaçu com ênfase no desenvolvimento de sedimentos artificiais para avaliação da toxicidade do cromo.** Tese (Doutorado). 2010, 188 p. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

CAVALCANTI, V. A. **Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*.** 2010.78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

CLOUZOT, L.; MARROT, B.; DOUMENQ, P.; ROCHE, N. **17 α -ethnylestradiol: an endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification.** A review. *Environmental progress.* v. 27, n. 23, p. 383 – 396, 2008.

COLPO, K. D.; CAMARGO, M. T.; VIELMO, B.; **Macroinvertebrados bentônicos como indicadores do impacto ambiental promovido pelos efluentes de áreas orizícolas e pelos de origem urbana/industrial.** Cienc. Rural [online]. 2009, vol.39, n.7, pp. 2087-2092. Epub Aug 14, 2009. ISSN 0103-8478. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000161>.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Relatório de qualidade das águas interiores de São Paulo.** Relatório da Diretoria de Controle da Poluição do Interior, CETESB, São Paulo, 213 p, 2010.

CORBI, J.J.; SAMPAIO, E.V.; DE RIBEIRO, V.R.; DOMINGOS, M.D.; FERRAZ FREIRE, C.; FERREIRA, P.S.; PELAEZ RODRÍGUEZ, M.; ROJAS, N.T.; STRIXINO, S.T. **Levantamento preliminar da entomofauna aquática do centro nacional de pesquisa de peixes tropicais (CEPTA),** Bol. Téc. Cepta, v.13, 2000.

CORRÊA, P.F. **Importância da avaliação ecotóxica de sedimentos aquáticos como ferramenta na perícia ambiental judicial.** 2011. 41 f. Monografia (Especialista em Auditoria e Perícia Ambiental) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2011.

COSTA, C. R. C.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.R.; ESPINDOLA, E. L. G. **A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação.** Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1820 – 1830, 2008.

CZAJKA-ORANIEC, I.; SIMPSON, E. R. **Aromatase research and its clinical significance.** Endokrynologia Polska, v. 61, p. 126–134, 2010. Disponível em:<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-17012007-144901/>>. Acesso em: 2014-12-02.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microrganismos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** v. 1, p. 63-66, 2006.

DOMINGUES, R. S. **A influência de contraceptivos orais combinados na condição periodontal**. 2009. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25135/tde-02062009-093810/>>. Acesso em: 2014-12-03.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. 2006. 239 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

FERREIRA, A. C. P.; MONTES, M. B. A.; FRANCESCHINI, S. A.; TOLOI, M. R.T. **Efeitos do contraceptivo oral contendo 20 µg de etinilestradiol e 150 µg de desogestrel sobre os sistemas de coagulação e fibrinólise**. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. [online]. vol.22, n.2, pp. 77-87, 2000. ISSN 1516-8484. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-4842000000200004>.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológico com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais**. 2007. 121 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na Bacia do Rio Piracicaba através de testes de toxicidade com invertebrados**. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 211 p, 1997.

FONSECA, A. L. & Rocha, O. **Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera, Chironomidae).** Acta Limnologica Brasiliensia 16: 153–161, 2004.

GALLARDO, A.; Prenda, J. **Influence of some environmental factors on the freshwater macroinvertebrates distribution in two adjacent river basins under Mediterranean climate. I. dipteran larvae (excepting chironomids and simuliids) as ecological indicators.** Arch. Hydrobiol. 131:435-447, 1994.

GENNARO, A.R. **Remington's pharmaceutical sciences.** 18. ed. Easton: Mack Publishing Company, 1990.

GEROLIN, E. R. R. **Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – SP.** Tese de Doutorado –Programa de pós-graduação em Engenharia Civil. Universidade Estadual de Campinas, 2008.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** Tese de doutorado, 190p. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2006.

GHISELLI, G. & JARDIM, W.F. **Interferentes Endócrinos No Ambiente.** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 695-706, 2007.

GROSS-SOROKIN, M. Y.; ROAST, S. D.; BRIGHTY, G. C. **Assessment of feminization of male fish in english rivers by the environment agency of England and Wales.** *Environmental Health Perspectives*, v. 114, p. 147–151, 2006.

GUIMARÃES, E. S.; LACAVA, P. M.; MAGALHÃES, N. P. **Avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia similis* na água captada no Rio Paraíba do Sul e processada na Estação de Tratamento de Água do município de Jacareí - SP – Brasil.** Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 9, n. 2, p. 124-130, 2004.

HENRIQUES-OLIVEIRA, A. L.; NESSIMIAN, J. L.; DORVILLÉ, L. F. **Feeding habits of chironomid larvae (Insecta: Diptera) from a stream in the Floresta da Tijuca, Rio de Janeiro, Brazil.** Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia, v. 63, p. 269–281, 2003.

IHARA, P. M. **Aplicação de Ensaio Ecotoxicológicos com Diferents Organismos-Testes na Determinação da Toxicidade da Água Produzida.** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) -Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

IPCS - INTERNATIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY . **Global Assessment of the State-of-Science of Endocrine Disruptors.** Geneva, 2002.

IRWIN, L. K.; Gray, S.; Oberdörster, E.; *Aquatic. Toxicol.* 55, 49, 2001.

JOHNSON, A. C.; Belfroid, A.; Di Corcia, A.; Sci. **Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent;** *Total Environ.* 256, 163, 2000.

JONES, G. et al. **Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators** *Endangered Species Research*, 2009.

KANG, I. J.; Yokota, H.; Oshima, Y.; Tzuruda, Y.; Yamaguchi, T.; Maeda, M.; Imada, N.; Tadokoro, H.; Honjo, T.; **Chemosphere**. 47, 71, 2002.

KIDD, K. A. et al. **Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 21, p. 8897–901, 22 maio 2007.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. **Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems**. The Science of the total Environment. , vol. 289, 159-168 p, 2002.

LANDIS, W.G. & Yu, M. **Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems**. 3rd ed. p.390, 2005.

MANAHAN, S. E. **Toxicological Chemistry and Biochemistry**. 3 ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.

MRC - MEDICAL RESEARCH COUNCIL'S INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND HEALTH . **Appraisal of Test Methods for Sex-Hormone Disrupting Chemicals Capable of Affecting the Reproductive Process**. London, 1998.

MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-31032016-101847/>>.

NAZAROVA, L.B.; H.W. RISS & A. KAHLHEBER. **Some observation of buccal deformities in chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia.** *Caldasia* **26** (1): 275-290, 2004.

NEGREIROS, S. **CETESB conclui inventário e prepara plano de ação, Saneamento Ambiental**, n. 46, p. 30-34, 1997.

NOVELLI, A. **Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ.** Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, 2010.

NUNES, B. **Pharmaceutical drugs in the environment.** *Fármacos no meio ambiente*, v. 26, p. 523–530, 2006.

OMETO, J.P.H.B.; MARTINELLI, L.A.; BALLISTER, M.V.; GESSNER, A.; KRISCHE, A.V.; VICTORIA, R.L. **The effects of land use on water chemistry and macroinvertebrates rates in two streams of the Piracicaba river basin South-east Brazil.** *Fresh. Biol.* 44:(2) p. 327-337, 2000.

PELLEY, J.; **Environ. Sci. Technol.** 37, 313^a, 2003.

PERES, M. R. **Remoção dos interferentes endócrinos 17 α - etinilestradiol, 17 β -estradiol e 4-nonilfenol por adsorção em carvão ativado em pó em água de abastecimento público.** 2011. (Tese (mestrado em engenharia civil) – UNICAMP - Campinas, SP: [s.n.], 2011.

PROSAB. **Remoção de micro-organismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. 1ª edição. Rio de Janeiro: ABES. 392 p. 2009. (ISBN: 978-85-7022-165-0).

QUEIROZ, J. F.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; NASCIMENTO, V. M. C. **Organismos Bentônicos Bioindicadores da Qualidade das Águas da Bacia do Médio São Francisco**. Comunicado Técnico. Embrapa Meio Ambiente, 2000.

RANTIN, F. T. **Temperaturas letais, aclimação e tolerância térmica do acará *G. brasiliensis***. (Quoy & Gaimard, 1824) - Represa do Broa, Represa da UFSCar Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado Inst. Biociências, USP. 181 p, 1978.

RASMUSSEN, J.B. **Comparison of gut contents and assimilation efficiency of fourth instar larvae of two coexisting chironomids, *Chironomus riparius* Meigen and *Glyptotendipes paripes* (Edwards)**. Canadian Journal of Zoology, 62: 1022-1026, 1984.

REBECHI, D. **Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) expostos ao malathion**. Dissertação (Mestrado). 2012. 85 p. Universidade Federal do Paraná, 2012.

REIS FILHO, R.W., Araújo, J.C.; Vieira, E. M. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos**. *Química Nova*. v.29, p.817-822, 2005.

RIBEIRO, L.O.; UIEDA, V.S. **Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos de um riacho de serra em Itatinga, São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira de Zoologia, v.22, n.3, p.613-618, 2005.

RODGERS-GRAY, T. P.; Jobling, S.; Kelly, C.; Morris, S.; Brighty, G.; Waldock, M. J.; Sumpter, J. P.; Tyler, C. R.; **Environ. Sci. Technol.** v.35, p.462, 2001.

ROQUE F.O., CORBI J.J. & TRIVINHO-STRIXINO S. **Considerações sobre o uso de larvas de Chironomidae (Diptera) na avaliação da qualidade da água de Córregos do Estado de São Paulo.** In: Ecotoxicologia perspectivas para o século XXI (Eds Espíndola E.L.G., Paschoal C.M.R.B., Rocha O, Bohrer M.B.C. & Neto A.L.O.), p. 115-126. Rima Editora, São Carlos. 2000.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates.** New York: Chapman & Hall, 488 p. 1993.

ROUTLEDGE, E. J.; Sheahan, D.; Desbrow, C.; Brighty, G. C.; Waldock, M.; Sumpter, J. P.; **Environ. Sci. Technol.** 32, 1559, 1998.

SANKARPERUMAL, G.; Pandian, T.J. **Larval abundance of Chironomus circumdatus in relation to biotic and abiotic factors.** Hydrobiol. 246: p.205-212, 1992.

SEMINARA, M.; Bazzanti, M. **Trophic level assessment of profundal sediments of the artificial lake Campotosto (Central Italy), using midge larval community (Diptera: Chironomidae).** Hydrobiol. Bull. 22: p.183-193, 1988.

SILVA, A. L. **Interferentes endócrinos no meio ambiente: um estudo de caso em amostras de água in natura e efluente de estação de tratamento de esgotos da região metropolitana de São Paulo.** 2009. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6134/tde-21072009-091520/>>. Acesso em: 2014-12-02.

SILVA, F. L.; RUIZ, S. S.; MOREIRA, D. C.; BOCHINI, G. L. **Composição e Diversidade de Imaturos de Chironomidae (Insecta, Diptera) no Ribeirão dos Peixes, Dois Córregos, SP.** Revista Brasileira de Biociências, v. 6, n. 4, p. 341-346. 2008.

SIMMONDS, R. J.; Chemistry of Biomolecules: An Introduction, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1992.

SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M. A. F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W. F. **Interferentes endócrinos no ambiente. Instituto de Química da UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Caderno temáticos Vol. 06, p.26, 2007.**

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C.; Química Orgânica, 7a ed., LCT: Rio de Janeiro, 2000.

SONNENSCHNIG, C.; SOTO, A. M. An updated review environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. Journal of Steroid Biochemistry and molecular Biology. v. 65 (1-6), 143-150. 1998.

STRIXINO, S. T. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancticaroli* sp. n. (Diptera: Chironomidae).** Tese de Doutorado Inst. Biociências, USP. 157 p., 1980

STRIXINO, G. & Strixino, S. T. **Macrobenetos da represa do Monjolinho (São Carlos, SP).** *Revta bras. Biol.*2(1): 165-179, 1982a.

STRIXINO, S. T. & Strixino, G. **Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae).** *Revta bras. Ent.*, 26(2): 183-189, 1982b.

STRIXINO, Giovanni and STRIXINO, Susana Trivinho. **A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae)**. *Rev. Bras. Zool.* [online]. 1985, vol.3, n.4, pp.177-180. ISSN 0101-8175. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751985000400003>.

STRIXINO, S.T. & G. STRIXINO. 1981. Nova espécie do gênero *Chironomus* Meigen do sul do Brasil (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 25 (4): 333-340, 1981.

TAPIERO, H.; NGUYEN-BA, G.; TEW, K. D. **Estrogens and environmental estrogens**. *Biomed. Pharmacother*, v. 56, 36-44, 2002.

VERMEULEN, A.C.; LIBERLOO, G.; DUMONT, P.; OLLEVIER, F. GODDEERIS, B. **Exposure of *Chironomus riparius* larvae (diptera) to lead, mercury and b-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting**. *Chemosfere*. v. 41, p. 1581- 1591, 2000.

VIVEIROS, William. ***Chironomus sancticaroli* - do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento**. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/D.85.2012.tde-04062012-151653. Acesso em: 2016-12-07.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology**. 3ª ed. Boca Raton.: Taylor & Francis Group. 315 p, 2006.

WARWICK, W. F.; Fitchko, J.; McKee, P. M.; Hart, D. R.; Burt, A. J. 1987: **The incidence of deformities in *Chironomus* spp. from Port Hope Harbour, Lake Ontario**. *Journal of Great Lakes research* 13: 88-9, 1987.

YOUNG, et al. **Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECS) for natural and synthetic steroid estrogens in surface water**. Bristol: Environment Agency. 180 p. R&D Technical Report P2-T04/1, 2004.

ZILLI, F.L.; MONTALTO, L.; PAGGI, A.C.; MARCHESE, M.R. 2008. **Biometry and life cycle of *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera, Chironomidae) in laboratory conditions**. *Interciência*, 33(10): 767- 770, 2008.

APÊNDICES:

APÊNDICE A: Dados brutos do comprimento das asas e cálculo da fecundidade potencial das três gerações do experimento

Tabela 1: comprimento das asas de *Chironomus sancticaroli* (C) em mm, e resultados do cálculo de fecundidade potencial (F) da primeira geração.

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Réplica	C	F
Controle	1	3,376	884,84
Controle	2	3,405	898,52
Controle	3	3,485	935,25
Controle	4	3,228	815,04
50	1	3,308	852,77
50	2	3,065	738,16
50	3	3,004	709,39
50	4	2,979	697,6
100	1	3,307	852,3
100	2	2,975	695,71
100	3	2,804	615,06
100	4	3,102	755,61
200	1	3,252	826,36
200	2	2,910	665,06
200	3	2,961	689,11
200	4	3,080	745,24
400	1	2,817	621,19
400	2	2,777	602,33
400	3	3,391	891,92
400	4	3,189	796,64
800	1	2,800	613,18
800	2	2,838	631,1
800	3	2,979	697,6
800	4	3,252	825,36
1600	1	3,146	776,36
1600	2	3,283	840,98
1600	3	3,114	761,27
1600	4	2,887	654,21

Tabela 2: Comprimento das asas de *Chironomus sancticaroli* (C) em mm, e resultados do cálculo de fecundidade potencial (F) da segunda geração

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Réplica	C	F
Controle	1	3,144	775,42
Controle	2	3,086	748,07
Controle	3	3,156	781,08
Controle	4	3,158	782,02
50	1	2,659	546,68
50	2	2,655	544,79
50	3	2,691	561,77
50	4	2,703	567,43
100	1	2,304	379,24
100	2	2,153	308,03
100	3	2,416	432,07
100	4	2,553	496,68
200	1	2,673	552,28
200	2	2,798	612,23
200	3	2,188	324,53
200	4	2,197	328,78
400	1	2,397	423,11
400	2	2,263	359,91
400	3	2,539	490,08
400	4	2,652	543,37
800	1	2,516	479,23
800	2	2,269	362,74
800	3	2,354	402,83
800	4	2,452	449,05
1600	1	2,655	544,79
1600	2	2,693	562,71
1600	3	2,557	498,57
1600	4	2,453	449,52

Tabela 3: Comprimento das asas de *Chironomus sancticaroli* (C) em mm, e resultados do cálculo de fecundidade potencial (F) da terceira geração

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Réplica	C	F
Controle	1	3,045	728,73
Controle	2	3,173	789,1
Controle	3	3,254	827,3
Controle	4	3,489	938,14
50	1	2,663	548,56
50	2	2,875	648,55
50	3	2,651	542,9
50	4	2,722	576,39
100	1	2,774	600,91
100	2	3,021	717,41
100	3	2,628	532,05
100	4	2,509	475,93
200	1	2,808	616,85
200	2	2,974	695,24
200	3	2,876	649,02
200	4	2,531	486,31
400	1	2,720	575,45
400	2	2,815	620,25
400	3	2,624	530,17
400	4	2,871	646,66
800	1	2,455	450,46
800	2	2,767	597,61
800	3	2,823	624,02
800	4	2,427	437,26
1600	1	2,787	607,05
1600	2	2,848	635,82
1600	3	2,745	587,24
1600	4	2,698	565,07

APÊNDICE B: Dados brutos do comprimento das larvas

Tabela 4: Comprimento das larvas (em milímetros) da primeira geração de *Chironomus sancticaroli*

1ª Geração						
Controle	50 µg.L ⁻¹	100 µg.L ⁻¹	200 µg.L ⁻¹	400 µg.L ⁻¹	800 µg.L ⁻¹	1600 µg.L ⁻¹
1,073	0,988	1,026	0,879	0,974	1,224	1,216
0,959	0,875	0,668	1,334	1,191	0,973	0,920
0,903	1,007	1,121	0,997	1,072	1,298	1,195
1,478	1,048	0,974	1,226	0,985	1,041	1,221
1,255	1,177	0,898	1,242	1,093	0,881	1,127
1,487	1,193	0,722	1,265	1,038	0,914	1,401
1,387	1,056	1,242	1,084	0,938	1,304	1,113
1,003	1,197	1,122	1,147	0,977	1,376	1,052

Tabela 5: Comprimento das larvas (em milímetros) da segunda geração de *Chironomus sancticaroli*

2ª Geração						
Controle	50 µg.L ⁻¹	100 µg.L ⁻¹	200 µg.L ⁻¹	400 µg.L ⁻¹	800 µg.L ⁻¹	1600 µg.L ⁻¹
1,255	1,142	1,261	1,230	1,050	1,294	1,278
1,059	1,246	1,178	1,153	1,067	0,975	1,000
1,067	0,948	0,987	1,318	1,125	1,234	1,065
1,113	0,892	1,022	1,205	1,074	1,350	1,080
1,052	1,003	1,200	1,051	1,030	0,983	1,260
0,936	1,128	1,031	1,170	0,905	1,253	1,205
1,060	0,965	1,120	1,272	1,048	1,172	1,078
1,112	0,999	0,698	1,072	1,243	1,079	1,231

Tabela 6: Comprimento das larvas (em milímetro) da terceira geração de *Chironomus sancticaroli*

3ª Geração						
Controle	50 µg.L ⁻¹	100 µg.L ⁻¹	200 µg.L ⁻¹	400 µg.L ⁻¹	800 µg.L ⁻¹	1600 µg.L ⁻¹
1,137	1,004	1,094	1,040	1,172	1,109	1,202
1,176	1,085	1,176	1,201	1,091	1,072	1,265
1,154	1,112	1,057	1,068	1,166	1,202	1,084
1,113	0,991	1,359	1,112	1,128	1,054	1,202
1,100	0,812	1,120	1,022	1,091	0,914	1,218
0,965	1,010	1,064	0,965	1,078	1,397	1,225
1,010	0,935	1,240	0,866	1,301	1,224	0,930
1,056	1,071	1,045	1,008	1,036	0,959	1,044

APÊNDICE C: Dados brutos da taxa de sobrevivência de *Chironomus sancticaroli*

Tabela 7: Número de larvas e porcentagem de sobrevivência da primeira geração

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Nº de larvas / adulto	Sobrevivência (%)
Controle	50	83,3
50	35	58,3
100	32	53,3
200	40	66,6
400	41	68,3
800	39	65
1600	42	70

Tabela 8: Número de larvas e porcentagem de sobrevivência da segunda geração

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Nº de larvas / adultos	Sobrevivência (%)
Controle	48	80
50	38	63,3
100	42	70
200	43	71,6
400	34	56,6
800	33	55
1600	45	75

Tabela 9: Número de larvas e porcentagem de sobrevivência da terceira geração

Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Nº de larvas / adultos	Sobrevivência (%)
Controle	52	86,6
50	34	56,6
100	28	46,6
200	26	43,3
400	30	50
800	29	48,3
1600	27	45