

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

**ERIKA SILVA HIGASHI**

**Bioensaios de toxicidade da água do efluente de Biofiltros em areia como  
ferramenta de avaliação da qualidade da água**

**VERSÃO CORRIGIDA**

**São Carlos - SP**

**2016**

ERIKA SILVA HIGASHI

Bioensaios de toxicidade da água do efluente de Biofiltros em areia como ferramenta de  
avaliação da qualidade da água

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

**Orientador:** Prof. Dr. Juliano José  
Corbi

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos - SP

2016

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.

H634b Higashi, Erika Silva  
Bioensaios de toxicidade da água do efluente de Biofiltros em areia como ferramenta de avaliação da qualidade da água / Erika Silva Higashi; orientador Juliano José Corbi. São Carlos, 2016.

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, 2016.

1. Bioindicadores. 2. Biota aquática. 3. Crescimento urbano. 4. Ecotoxicologia. I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela e Licenciada **ERIKA SILVA HIGASHI**.

Título da dissertação: "Bioensaios de toxicidade da água do efluente de biofiltros em areia como ferramenta de avaliação da qualidade da água".

Data da defesa: 22/06/2016

### Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. **Douglas Fernando Peiró**  
(Centro Universitário de Araraquara/UNIARA)

Profa. Dra. **Odete Rocha**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

### Resultado:

APROVADO

APROVADO

APROVADO

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

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

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

*À Deus,  
Aos meus pais Vicência e Hélio,  
Aos meus irmãos Alexandre, Elizabeth e Amanda,  
À minha sobrinha Ana Clara,  
Ao meu grande amor,  
João Vitor.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, pois sem Ele, não seria possível chegar até aqui;

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano José Corbi, por todo apoio, atenção e orientação durante esses dois anos, que foram de grande aprendizado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo nº 2014/12712-8) pelo apoio financeiro e institucional;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Lyda Patrícia Sabogal Paz e Prof. Dr. Guilherme Gorni Rossi pelos conselhos no Exame de Qualificação;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Lyda pelo auxílio durante a realização dos testes em relação aos Biofiltros e por ter me aceito em fazer parte de seu trabalho.

Ao Paulo, por ter cooperado com meu trabalho, me fornecendo água do Biofiltro sempre que necessário para realização dos testes;

Aos colegas do LEAA (Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos), Camila, Mayara, Daniel, José Leonardo, por toda ajuda, conversas e risadas.

A todos os funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento, em especial, a Sá e Priscila, por toda atenção e ajuda.

Aos colegas do Mestrado por toda ajuda e companheirismo durante as disciplinas;

Aos meus avós Kiyoko e Yoshikazu (*in memoriam*) por todos os ensinamentos e conselhos;

À minha mãe, o meu pilar, aquela que me estende a mão quando necessito, obrigada por todo o seu carinho e amor.

Ao meu pai, que me incentiva.

Aos meus queridos irmãos, Alexandre, Elizabeth e Amanda, que são meu orgulho maior, por toda descontração, paciência e apoio;

À minha sobrinha, que apesar de pequena, nos dá tantas lições de vida, nos mostrando valores que ao menos são imperceptíveis aos olhos dos adultos.

Ao meu noivo João Vitor, uma pessoa muito especial em minha vida, pelo companheirismo, amizade e principalmente pela paciência, pois sei que não foi fácil;

À minha família e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“Há duas formas para viver a sua vida:  
Uma é acreditar que não existe milagre.  
A outra é acreditar que todas as coisas  
são um milagre.”*

Albert Einstein

*“Fácil é sonhar todas as noites.  
Difícil é lutar por um sonho. ”*

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

HIGASHI, E.S. **Bioensaios de toxicidade da água do efluente de Biofiltros em areia como ferramenta de avaliação da qualidade da água.** 2016. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Biofiltros em Areia (BFAs) estão sendo aperfeiçoados e testados no Brasil com intuito de auxiliar comunidades carentes que são menos favorecidas em relação à água de boa qualidade. O presente estudo tem como objetivo analisar a qualidade da água tratada pelos BFAs a partir de bioensaios de toxicidade, utilizando larvas do inseto *Chironomus sancticaroli*, oligoqueto *Allonais inaequalis* e peixes da espécie *Danio rerio*, analisando possíveis efeitos tóxicos que possam estar presentes quando a água entra em contato com o PVC do corpo do BFA, além de avaliar a toxicidade da água do poço (AP), captada para abastecimento do BFA. Nos testes de toxicidade agudo (com duração de 96h), crônico (8 dias) e testes mais longos (16 dias) com *Chironomus sancticaroli*, utilizou-se 240mL da solução-teste (água proveniente do BFA ou AP) em 60g de sedimento controle (areia branca fina para aquário) em 4 réplicas, sendo utilizados 6 larvas de IV ínstar por réplica no teste de toxicidade agudo e de I ínstar nos testes de toxicidade crônico e testes mais longos, alimentadas com 5mL de solução contendo 1000mL de água deionizada e 5,0g de ração tipo Tetramim®. Nos testes de toxicidade agudo e crônico com *Allonais inaequalis*, foram utilizados 100mL da solução-teste em 5g de sedimento controle em quatro réplicas, sendo utilizados 6 organismos por réplica, alimentados com 5mL de solução contendo 1000mL de água deionizada e 2,0g de ração tipo Tetramim®, com duração de 96h e 10 dias, respectivamente. Foram realizados apenas testes de toxicidade agudo com *D. rerio* no qual utilizou-se 1000mL de solução-teste e 2 organismos por réplica, em duas réplicas, com duração de 48h, sem alimentação. Os resultados apontam para uma baixa toxicidade do Biofiltro em Areia em relação às três espécies testadas. Além de um índice alto de sobrevivência, a espécie *C. sancticaroli* concluiu seu ciclo em testes mais longos (16 dias), além de reproduzir-se; a espécie *A. inaequalis* apresentou 100% de sobrevivência em todos os testes realizados; e não houve mortalidade nos testes de toxicidade agudo com *D. rerio*. Porém, é importante destacar que estes resultados indicam apenas dados toxicológicos para fauna em relação as efluentes testados, não sendo possível responder a questões de potabilidade da água tratada pelo BFA.

Esta dissertação é parte integrante de um projeto financiado pela FAPESP (Processo nº 2014/12712-8), intitulado “Construção e Desempenho de Filtros Lentos Domiciliares Conforme a Realidade das Comunidades Isoladas do Brasil” que esteve sob coordenação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Lyda Patricia Sabogal Paz e do Prof. Dr. Juliano José Corbi.

**Palavras-chave:** Bioindicadores; biota aquática; crescimento urbano; ecotoxicologia.



## ABSTRACT

HIGASHI, E.S. Bioassays of water toxicity with sand Biofilters' effluent as an instrument of water quality evaluation. 2016. 87 p. Dissertation (Master Degree) – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2016.

Sand Biofilters (SBFs) are being refined and tested in Brazil. These studies are intended to assist needy communities with difficulties to access drinking water. The aim of the current study is analyze the quality of water treated by SBFs, using toxicity bioassays with larvae of fly *Chironomus sancticaroli*, oligochaete *Allonais inaequalis* and zebrafishes *Danio rerio*, as well as verify the occurrence of possible toxic effects of PVC (Polyvinyl chloride), a material component of SBFs' structure, and also evaluate the toxicity of well water quality (AP), extracted to supply the SBF. In the acute toxicity tests (lasting 96h), chronic (lasting 8 days) and longer tests (lasting 16 days), all involving *Chironomus sancticaroli*, it was placed 240mL of sample solution (water from SBF or AP) in 60g of sterile sediment (fine white sand for aquarium) in four replicates, where was added 6 larvae (IV instar) in each replicate for the acute toxicity test, and larvae of I instar for chronic toxicity tests, even as in the longer tests. The organisms were fed by 5mL of Tetramim® solution (5g/L). In the acute and chronic toxicity tests with *Allonais inaequalis*, it was applied 100mL of sample solution with 5g of sterile sand in four replicates, as above, it was added 6 organisms by replicate, fed by Tetramim® ( 2,0g/L) for both tests, with lasting of 96h and 10 days, respectively. It was performed only tests of acute toxicity for *D. rerio* in which was added 1000mL of sample solution and 2 organisms for each replicate, with two replicates, with duration of 48h, without feeding. The results showed a low toxicity of sand Biofilters' effluent in relation to the three species exposed to the liquid. Furthermore, the results demonstrate a high index of survival, even in longer tests(16 days lasting) with *C. sancticaroli* when the organisms could conclude their life cycle. However, besides the 100% of survival in all test, for the *A. inaequalis* were also observed reproduction; and in the acute toxicity tests for *D. rerio* it wasn't noticed mortality. Although, it is important to highlight that these results represent only toxicological data concerning to aquatic wildlife exposed to effluents, what is not regarding to potability issues of the water treated by SBF.

This dissertation is a constituent part of a project financiad by FAPESP (Process number 2014/12712-8), entitled “Building and Performance of Domiciliary Slow Filters According to the Isolated Comunities Reality in Brazil” which was coordinated by Professors PhD. Lyda Patricia Sabogal Paz and PhD. Juliano José Corbi.

**Key-words:** Bioindicators; aquatic biota; urban growth; ecotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	35
<b>Figura 2:</b> Cultivo de <i>Chironomus sancticaroli</i> em bandejas plásticas, cobertas por gaiolas de nylon para retenção dos adultos.....	40
<b>Figura 3:</b> Matriz de <i>Allonais inaequalis</i> do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA). .....	41
<b>Figura 4:</b> Cultivo e manutenção de <i>Danio rerio</i> em caixas com aproximadamente 50 Litros.....	42
<b>Figura 5:</b> Biofiltros em escala real construídos com peças de PVC.....	44
<b>Figura 6:</b> Configuração do BFA a partir de materiais que são disponíveis em lojas de material de construção.....	44
<b>Figura 7:</b> Bombonas utilizadas para transporte de efluente do Biofiltro e água do poço, conduzidos do Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de águas (LATAR) até o Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) para realização dos bioensaios de toxicidade.....	45
<b>Figura 8:</b> Bioensaios de toxicidade aguda com <i>Chironomus sancticaroli</i> . ....	47
<b>Figura 9:</b> Asa da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> , apontando os devidos locais para aferir o comprimento do mesmo. ....	48
<b>Figura 10:</b> Curva dose resposta de <i>Chironomus sancticaroli</i> ao Cloreto de Potássio em teste de toxicidade aguda.....	52
<b>Figura 11:</b> Curva dose resposta de <i>Allonais inaequalis</i> ao Cloreto de Potássio em testes de toxicidade aguda. ....	52
<b>Figura 12:</b> Curva dose resposta de <i>Danio rerio</i> ao Cloreto de Potássio em testes de toxicidade aguda. .....	53
<b>Figura 13:</b> Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade aguda com o efluente BFA, utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> , <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Danio rerio</i> . O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.....	54
<b>Figura 14:</b> Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade aguda com o efluente AP, utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> , <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Danio rerio</i> . O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.....	55
<b>Figura 15:</b> Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônica com o efluente BFA, utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> . O gráfico expressa a em porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.....	56
<b>Figura 16:</b> Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônico com o efluente AP, utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> . O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões. ....	56
<b>Figura 17:</b> Emergência de adultos e observação de desovas em testes de 16 dias. ....	57

<b>Figura 18:</b> Emergência de machos e fêmeas, larvas e desovas de <i>Chironomus sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água deionizada) e grupos expostos ao efluente do Biofiltro. ....	57
<b>Figura 19:</b> Emergência de machos e fêmeas, larvas e desovas de <i>Chironomus sancticaroli</i> demonstrando os grupos controle (água deionizada) e grupos expostos à água do poço.....	58
<b>Figura 20:</b> Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade aguda em caixas sifonadas, utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> . O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.....	58
<b>Figura 21:</b> Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônica em caixas sifonadas, utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> . O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.....	59
<b>Figura 22:</b> Criações de <i>Chironomus sancticaroli</i> em caixas sifonadas.....	60
<b>Figura 23:</b> Vista das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> nas caixas sifonadas após 3 meses de criação para avaliar se houve toxicidade das caixas. ....	60
<b>Figura 24:</b> Criações de <i>Allonais inaequalis</i> em caixas sifonadas. ....	61
<b>Figura 25:</b> Aglomerações de <i>Allonais inaequalis</i> nas caixas sifonadas após 3 meses de criação com intuito de avaliar a toxicidade do mesmo.....	61
<b>Figura 26:</b> Fecundidade potencial de <i>Chironomus sancticaroli</i> calculadas a partir do comprimento da asa das fêmeas expostas ao efluente do Biofiltro, à água do poço e à caixa sifonada.....	62
<b>Figura 27:</b> Peso médio de <i>Danio rerio</i> . Dados calculados a partir do Teste ANOVA one-way, com $p \leq 0,05$ .....	63
<b>Figura 28:</b> Comprimento médio de <i>Danio rerio</i> . Dados calculados a partir do Teste ANOVA one-way, com $p \leq 0,05$ . ....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número de municípios com serviço de abastecimento de água, por tipo de tratamento – 2000/2008.....	29
<b>Tabela 2:</b> Metodologia utilizada nos testes de sensibilidade.....	43
<b>Tabela 3:</b> Análise de algumas variáveis das soluções-teste para realização de bioensaios toxicológicos.....	45
<b>Tabela 4:</b> Metodologia utilizada nos bioensaios de toxicidade com <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	47
<b>Tabela 5:</b> Metodologia utilizada nos bioensaios de toxicidade com <i>Allonais inaequalis</i> . ....	50
<b>Tabela 6:</b> Valores de CL50 e intervalo de confiança de <i>Chironomus sancticaroli</i> para a substância de referência KCl .....	51
<b>Tabela 7:</b> Valores de CL50 e intervalo de confiança de <i>Allonais inaequalis</i> para a substância de referência KCl .....	52
<b>Tabela 8:</b> Valores de CL50 e intervalo de confiança de <i>Danio rerio</i> para a substância de referência KCl .....	53
<b>Tabela 9:</b> Valores dos parâmetros físicos e químicos das soluções-teste para os bioensaios de toxicidade com os organismos-teste <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> .....	53
<b>Tabela 10:</b> Valores dos parâmetros físicos e químicos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e dureza) das soluções-teste realizados durante o bioensaio de toxicidade aguda com <i>Danio rerio</i> .....	54

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivos Gerais .....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1. Ações antrópicas sobre a qualidade da água .....	26
3.2. Biofiltros em Areia para comunidades isoladas .....	29
3.3. Bioensaios ecotoxicológicos.....	31
3.4. Organismos-teste .....	35
3.4.1. <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	35
3.4.2. <i>Allonais inaequalis</i> .....	37
3.4.3. <i>Danio rerio</i> .....	38
4. METODOLOGIA .....	39
4.1. Cultivo e manutenção de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	39
4.2. Cultivo e manutenção de <i>Allonais inaequalis</i> .....	40
4.3. Cultivo e manutenção de <i>Danio rerio</i> .....	41
4.4. Testes de sensibilidade .....	42
4.5. Bioensaios de toxicidade utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> como organismo-teste ...	45
4.6. Avaliação da fecundidade de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	48
4.7. Bioensaios de toxicidade com o organismo-teste <i>Allonais inaequalis</i> .....	49
4.8. Bioensaios de toxicidade aguda utilizando <i>Danio rerio</i> como organismo-teste.....	50
4.9. Análise estatística .....	51
5. RESULTADOS.....	51
5.1. Teste de sensibilidade para <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	51
5.2. Teste de sensibilidade para <i>Allonais inaequalis</i> .....	52
5.3. Teste de sensibilidade para <i>Danio rerio</i> .....	53
5.4. Variáveis físicas e químicas dos bioensaios de toxicidade .....	53
5.5. Bioensaios de toxicidade aguda com <i>Chironomus sancticaroli</i> , <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Danio rerio</i> .....	54
5.6. Bioensaios de toxicidade crônica com <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> ..	55
5.7. Testes mais longos (16 dias) utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> como organismos-teste .....	57
5.8. Bioensaios de toxicidade aguda e crônico em caixas sifonadas utilizando <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Allonais inaequalis</i> como organismos-teste .....	58

5.9.	Criações em caixas sifonadas.....	59
5.10.	Fecundidade potencial.....	62
5.11.	Peso e comprimento de <i>Danio rerio</i> .....	63
6.	DISCUSSÃO .....	64
6.1.	Testes de sensibilidade.....	64
6.2.	Testes de toxicidade aguda e crônica .....	66
6.4.	Bioensaios de toxicidade aguda e crônica em caixas sifonadas e criações em caixas sifonadas .....	67
6.5.	Fecundidade potencial.....	68
6.6.	Crescimento de <i>Danio rerio</i> .....	69
7.	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS .....	71
	APÊNDICES.....	79
	APÊNDICE A: Dados brutos obtidos no teste de toxicidade aguda dos organismos-teste <i>Chironomus sancticarloi</i> , <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Danio rerio</i> às soluções-teste efluente do Biofiltro e água do poço. ....	80
	APÊNDICE B: Dados brutos obtidos no teste de toxicidade crônica dos organismos-teste <i>Chironomus sancticarloi</i> e <i>Allonais inaequalis</i> às soluções-teste efluente do Biofiltro e água do poço. ....	83
	APÊNDICE C: Dados do comprimento das asas das fêmeas de <i>Chironomus sancticarloi</i> (cm) e cálculo da fecundidade potencial.....	85
	APÊNDICE D: Dados brutos referentes às variáveis físicas e químicas das soluções-teste durante o bioensaio de toxicidade aguda com o organismo <i>Danio rerio</i> .....	86
	APÊNDICE E: Dados brutos do peso e comprimento de <i>Danio rerio</i> . ....	87

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O adensamento urbano vem resultando em uma ocupação populacional desordenada de modo que pessoas de baixa renda se instalem nas áreas periféricas sendo muitas vezes desprovidas de serviços urbanos básicos. Esta ocupação irregular reduziu qualitativamente e quantitativamente os recursos naturais, prejudicando áreas de proteção ambiental, contribuindo para a degradação da qualidade da água de rios e reservatórios (SHUBO; ROQUE; FERREIRA, 2003; MORAIS, 2010).

O despejo de esgoto sanitário sem tratamento resulta em grandes consequências para o corpo hídrico (BALDAN, 2012). Com a precariedade de serviços básicos necessários, a construção de poços clandestinos sem tratamentos adequados e a deficiência do sistema de coleta e tratamento dos esgotos, vem se tornando cada vez mais frequente o descarte irregular de esgotos nos corpos d'água, comprometendo a qualidade da água utilizada para abastecimento, irrigação, recreação, e desencadeando o surgimento de doenças de veiculação hídrica, relacionadas à falta de saneamento, trazendo riscos a saúde e limitando seu uso, entre elas, a sua utilização para abastecimento público (GIATTI, 2007; SHUBO, 2003).

Outros fatores que contribuem para a degradação dos recursos hídricos são as indústrias, que descartam substâncias que podem ser altamente poluentes, e agricultura, a partir do uso intenso ou até mesmo abusivo de agrotóxicos que muitas vezes chegam aos corpos d'água através do processo de lixiviação, escoamento superficial dos solos, erosão (ALMEIDA, 2007; NUNES, 2010).

Sendo assim, no Brasil, as concentrações de microcontaminantes podem ser significativamente maiores daquelas observadas em países desenvolvidos.

Diante desta realidade, faz-se necessário o acompanhamento da qualidade das águas e o desenvolvimento e validação de sistemas de tratamento de água que sejam simples, baratos e fáceis de construir e operar, utilizando materiais alternativos para auxiliar comunidades carentes, promovendo uma maior qualidade de vida.

Nos últimos anos, pesquisas têm sido realizadas com intuito de propor um melhor sistema para tratamento de água, principalmente voltados a comunidades isoladas, em que muitas vezes são destituídos de mão de obra qualificada, materiais e equipamentos (CARVALHO, 2012).

No Brasil, estudos para aprimoramento de Biofiltros em Areia (BFAs) vêm sendo realizados com o propósito de aperfeiçoar os filtros para a realidade brasileira e de acordo

com o desempenho na remoção de microrganismos emergentes, para obtenção de água potável. Os BFAs podem fornecer tratamento eficiente da água, e assim garantir a geração de água potável, se adequando facilmente nas habitações e possuindo um baixo custo.

Com intuito de avaliar a toxicidade desses BFAs, estudos detalhados em laboratório utilizando-se a água tratada pelos BFAs e espécies que se reproduzem em laboratório, podem fornecer novas e importantes informações sobre a toxicidade da água proveniente dos BFAs e gerar dados sobre processos temporais. Os invertebrados aquáticos vêm sendo utilizados em bioensaios ecotoxicológicos a fim de avaliar a qualidade da água, fornecendo bons resultados do estado de integridade da mesma (DORNFELD, 2006; ALMEIDA, 2007; NOVELLI, 2010).

As análises físicas e químicas da água de acordo com a Legislação vigente, como dureza, pH, demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de substâncias, são importantes ferramentas para verificar (determinar) a qualidade das águas, porém, não são suficientes para avaliar o grau de risco de contaminantes, não sendo capazes de mensurar a contaminação dessas substâncias (metais, por exemplo) em sistemas biológicos, sendo utilizados, portanto como complemento em testes de toxicidade (COSTA, et al., 2008).

Para a seleção de um organismo-teste é necessário levar em consideração alguns fatores, como o ciclo de vida curto, tamanho do corpo relativamente grande, fácil amostragem e elevada diversidade de espécies, oferecendo uma enorme gama de tolerâncias e amplo espectro de respostas frente a diferentes níveis de contaminação, fácil cultivo e manutenção em laboratório, e ter importante papel na cadeia alimentar (CALLISTO; MORETTI; GOULART, 2001; RIOS, 2013). Estes são alguns fatores que levaram a utilização de insetos aquáticos como indicadores.

Espécies dos grupos de insetos Chironomidae, oligoquetos Naididae e de peixes Cyprinidae se enquadram nesses critérios, pois são considerados bons indicadores, além de serem muito utilizados em testes toxicológicos e serem de grande abundância na comunidade bentônica (FONSECA e ROCHA, 2004).

De acordo com Costa et al. (2008), para serem utilizados em testes toxicológicos, os organismos devem possuir ampla diversidade, estabilidade genética nas populações, ser de fácil cultivo e adaptação em laboratório, importância no nível trófico, ciclo de vida curto, apresentando respostas rápidas frente a área de estudo. Dentre as classes de organismos bentônicos, a família Chironomidae é considerada uma das mais abundantes (CALLISTO, et al., 2002). As larvas de *Chironomus sancticaroli* são excelentes bioindicadores. Além disso,



espécies desta família são de fácil cultivo em laboratório tem seu ciclo de vida bem conhecido. *Allonais inaequalis* e *Danio rerio* são duas outras espécies que se enquadram nestas mesmas características.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Analisar a qualidade da água tratada pelo BFA pela utilização de bioensaios toxicológicos utilizando larvas do inseto *Chironomus sancticaroli*, oligoqueto *Allonais inaequalis* e peixes da espécie *Danio rerio*, verificando possíveis efeitos tóxicos que possam estar presentes quando a água entra em contato com o PVC do corpo do filtro, além da análise da água do poço com intuito de avaliar a qualidade da água antes do contato com o Biofiltro.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Utilizar insetos aquáticos, oligoquetos e peixes para avaliação da qualidade da água tratada pelos BFAs e água do poço;
- Avaliar a toxicidade do efluente do BFA e água do poço através de insetos aquáticos, Oligochaetas e peixes para maior conhecimento sobre os impactos provenientes dos materiais utilizados nos Biofiltros e toxicidade da água do poço, captada para o tratamento do mesmo;
- Cultivar *C. sancticaroli* e *A. inaequalis* em caixas sifonadas com intuito de avaliar o material do mesmo;
- Avaliar a fecundidade potencial a partir do comprimento das asas em fêmeas adultas de *C. sancticaroli*;
- Análise do comprimento e peso de *D. rerio* após bioensaios de toxicidade.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Ações antrópicas sobre a qualidade da água

A água potável, embora seja um bem em que todos têm direito sobre ela, não é distribuída de forma igualitária à população, principalmente às pessoas que habitam as áreas mais afastadas dos centros urbanos, que caíram no esquecimento das políticas públicas (RAZZOLINI e GUNTHER, 2008). De acordo com Scalize et al. (2014), os centros urbanos são mais favorecidos, visto que a maior parte dos investimentos são notadas nas áreas centrais em relação as áreas rurais. Enquanto a população de alta renda que ocupam áreas centrais tem disponibilidade de água tratada, a população menos favorecida tem o acesso precário, sendo desprovidos de água potável para suprir suas necessidades básicas.

A expansão das cidades tem proporcionado o aumento das atividades antrópicas sobre os recursos naturais. A contaminação de ambientes aquáticos (lançamento de esgoto clandestino nos corpos d'água, além de descarte irregular do lixo), desmatamentos, contaminação do lençol freático, vem resultando na perda da qualidade da água.

Durante muitos anos, os corpos d'água foram alvos de grande poluição. Isso é resultado de um mau planejamento urbano, resultando em inúmeros malefícios à própria população, que cooperando de forma direta ou indireta, leva ao aparecimento de doenças de veiculação hídrica e vetores (GOULART e CALLISTO, 2003; RAZZOLINI e GUNTHER, 2008).

Os diversos usos da água exigem um rigoroso controle da qualidade do mesmo. Para avaliar a qualidade da água, é necessário definir sua composição física, química e biológica e quais malefícios podem ser causados ao ambiente pelos seus constituintes (BRITO et al., 2005).

O descarte de substâncias nos corpos d'água decorrentes de efluentes domésticos, industriais ou agropecuários, tem provocado modificações em sua composição, implicando no fornecimento de água para diferentes fins (UMBUZEIRO; KUMMROW; REI, 2010).

Há critérios de padrão de qualidade definidos no que diz respeito aos seus diversos usos, que devem seguir parâmetros estabelecidos segundo diretrizes regionais ou do país (UMBUZEIRO; KUMMROW; REI, 2010). São estipulados padrões de qualidade para consumo humano, indústria, irrigação, dentre outros. Contudo, os padrões atribuídos ao consumo humano merecem maior atenção, pelo fato de o homem se preocupar com sua saúde e bem-estar, preservando assim sua própria espécie (RODRIGUES, 2007).

No Brasil contamos com a portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde que dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano (padrão de potabilidade), e a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011 que complementa a Resolução CONAMA nº 357/2005 (dispõe sobre a classificação dos corpos d'água), estabelece condições e padrões de lançamento de resíduos.

Mesmo com a existência da legislação, segundo Scalize et al. (2014), a água considerada para consumo humano é uma das maiores propagadoras de doenças, sendo muito importante a análise da mesma.

A palavra saneamento abrange uma série de sistemas, sendo uma delas, o abastecimento público, oferecendo água de qualidade garantindo proteção a saúde.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), saneamento é o gerenciamento de fatores físicos que podem causar efeitos deletérios ao ser humano, prejudicando seu bem-estar físico, mental e social.

Os casos de doenças de veiculação hídrica têm uma forte relação ao acesso precário à água, atingindo populações consideradas “grupo de risco”, ou seja, crianças, idosos e imunodeficientes.

Dados da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTA) relatam que no ano de 2012 houve aproximadamente 1.146.212 casos de diarreia no Estado de São Paulo (CVE, 2012).

A contaminação dos recursos hídricos, a partir de esgoto doméstico *in natura*, industriais, contaminantes provenientes de atividades agro-pastoris e escoamentos superficiais, atingem a qualidade da água alterando seus fatores físicos, químicos e biológicos, além de modificações no ciclo biogeoquímico (ALMEIDA, 2007).

A partir do uso da máquina e dos agroquímicos, houve a modificação de todo o ambiente visando servir as necessidades humanas (ALMEIDA, 2007). Em relação ao uso de agrotóxicos, a sua aplicação se deve a partir do processo de modernização da agricultura, nos anos de 1960, conhecida como “Revolução Verde”, com objetivo de expandir a produtividade com intuito de preencher a busca por alimentos (NUNES, 2010).

A aplicação de agrotóxicos com finalidade de reduzir ervas daninhas, pragas e doenças da cultura agrícola tem crescido muito nos últimos anos, porém, isso tem afetado espécies não-alvo que acabam se tornando ameaçadas devido ao uso abusivo destes fertilizantes, trazendo riscos à saúde humana, podendo atingir toda a cadeia trófica a partir do processo de bioacumulação (ALMEIDA, 2007; NUNES, 2010).

A procedência do agrotóxico nos corpos d'água tem uma forte relação com a forma na qual é aplicado nas culturas. Ou seja, a utilização de um pesticida através da incorporação direta na superfície gera uma menor consequência em relação ao método de pulverização, pois este último abrange uma área muito maior, não atingindo somente as culturas (RODRIGUES, 2007).

Porém, grande parte dos elementos que são utilizados no meio terrestre, podem passar por vários processos e por fim acabar sendo encontrados em ecossistemas aquáticos. Isso ocorre por conta do escoamento superficial devido às chuvas, contaminando as águas superficiais, por causa da erosão e arraste de solo contaminado, pelo processo de lixiviação comprometendo a água subterrânea, e existem também casos dessas substâncias serem lançadas diretamente na água (DORNFELD, 2006; ALMEIDA, 2007; NUNES, 2010).

Já o setor industrial é responsável pelo despejo de efluentes nos corpos hídricos. Há setores de alimentos, bebidas, têxtil, madeira, borracha, papel e celulose, química, metalúrgica, entre outras.

Outro fator preocupante é a quantidade de mananciais em relação à vazão e qualidade, que além de vazão reduzida, muitas vezes não se adequam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (DANELUZ e TESSARO, 2015).

É preciso a implantação de um novo modelo de desenvolvimento, conciliando a qualidade de vida de toda população à preservação dos recursos naturais, em especial, a água, buscando soluções alternativas para atender aos desejos de comunidades mais afastadas dos centros urbanos, trazendo mais conforto e saúde.

A Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), tem como objetivo avaliar a qualidade dos serviços básicos do país. Dentre eles, encontra-se o de tratamento de água em todo o Brasil (Tabela 1). Segundo dados do IBGE (2010), em municípios contendo mais de 300 mil habitantes, 85,7% do volume de água distribuída são tratadas de modo convencional, enquanto que municípios com menos de 20 mil habitantes, 39,4% da água tratada é utilizada a simples cloração, e 52,6% do volume distribuído é realizado o tratamento convencional. A utilização do flúor, cujo objetivo é diminuir a cárie dental, é realizada por 45,7% dos municípios brasileiros, sendo os maiores índices de tratamento nas regiões Sul e Sudeste.

**Tabela 1:** Número de municípios com serviço de abastecimento de água, por tipo de tratamento – 2000/2008

Existência e tipo de tratamento da água	Ano			
	2000		2008	
	Nº	%	Nº	%
Total geral de municípios	5.507	100,00	5.564	100,00
Total de municípios abastecidos	5.391	97,89	5.531	99,41
Total de municípios com tratamento	4.420	80,26	5.166	92,85
Convencional	2.686	48,77	2.817	50,63
Não-convencional	577	10,48	560	10,06
Simples desinfecção (Cloração e outros)	1.980	35,95	3.005	54,01
Fluoretação	2.466	44,78	3.351	60,23
Sem tratamento	971	17,63	365	6,56

**Fonte:** IBGE - Pesquisa Nacional de Saneamento Básico.

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1364&z=p&o=31&i=P>

Nota: O município pode estar registrado em todas as categorias apresentadas: com tratamento, sem tratamento e com fluoretação da água.

### 3.2. Biofiltros em Areia para comunidades isoladas

Estações de tratamento não são vistas como prioridade para muitas populações, pelo fato dos altos custos da construção, além das dificuldades em relação a manutenção e monitoramento da qualidade da água. Sistemas de tratamento doméstico apresentando baixo custo e construídos a partir de materiais disponíveis localmente, são boas alternativas para sistemas municipais (DUKE; NORDIN; MAZUMDER, 2006).

Biofiltros em Areia (BFAs) são uma inovação dos Filtros Lentos de Areia, projetado para uso intermitente ou doméstico.

O Biofiltro em areia em escala domiciliar foi desenvolvido na década de 1990, pelo Dr. David Manz da Universidade de Calgary (Canadá), criado com intuito de proporcionar água de qualidade para populações desfavorecidas.

O desenvolvimento do BFA teve como base a filtração lenta, um tratamento muito antigo, utilizada por várias populações e considerada eficaz. Contudo, havia restrições quanto ao seu uso, ou seja, a questão de adaptação para uso doméstico, pela necessidade de uma operação contínua. O Biofiltro em areia, desenvolvido pelo Dr. Manz, é uma tecnologia modificada a partir do filtro em areia em larga escala para um filtro de pequena escala, por isso, o BFA pode ser instalado em cada domicílio, demandando pouco investimento e recursos externos (YUNG, 2003).

A filtração inicia-se a partir da água bruta que entra no topo do BFA, acima da base de areia, que em seguida se move pela mesma, seguindo por várias camadas de cascalho até chegar à base do filtro. Durante esta trajetória, a água foi conduzida através de tubos de PVC, material utilizado para formar o corpo do BFA, e para a retirada da água filtrada foi utilizado o mesmo material, apenas com espessura diferente.

O BFA, assim como a filtração lenta, remove mecanicamente patógenos e partículas maiores, no entanto, depende de processos biológicos para remoção de bactérias e vírus. A capacidade de filtração para remoção de microrganismos menores, como bactérias, protozoários e parasitas, ocorre quando os sólidos suspensos passam através da areia do filtro e ocorre a adsorção dessas substâncias em suspensão para a superfície dos grânulos de areia, ou seja, se aderem à uma camada do mesmo formando um biofilme, que também é conhecido como “schmutzdeke”, uma palavra alemã que significa “cobertor sujo”, que é ocupado por uma camada biologicamente ativa que se desenvolve em um microambiente criado entre a areia e água, sendo que nas camadas superiores de areia encontra-se rica em nutrientes. O período é de uma a três semanas para que ocorra a maturação do schmutzdeke e para que este tenha êxito. (DUKE; NORDIN; MAZUMDER, 2006; YOUNG, 2003).

Esta técnica tem se mostrado eficaz em questão da sustentabilidade no tratamento de água, melhorando significativamente a saúde do consumidor. Entretanto, Dr. David Manz da Universidade de Calgary, aponta ainda alguns problemas em relação aos métodos de construção, operação e manutenção desses Biofiltros. Entre eles, a utilização de materiais de construção distintos para construção de BFAs, de acordo com as particularidades de cada comunidade em relação a disponibilidade de recursos. Há outras dificuldades, como a utilização de técnicas de manutenção; a utilização de coagulantes naturais no pré-tratamento antes de passarem pelos BFAs; a utilização de técnicas simples de desinfecção; a identificação de organismos patogênicos presentes na água (CAWST, 2010).

Há poucas pesquisas realizadas no Brasil quanto à filtração lenta em escala domiciliar, também conhecida como Biofiltros em Areia (BFAs). Pesquisas sobre o assunto foram

desenvolvidas por Magalhães e Sabogal Paz (2013) e Carvalho e Sabogal Paz (2013), cujo objetivo do estudo era reduzir custos obtendo maior eficiência dos BFAs em relação às variáveis físicas, químicas e microbiológicas. Porém, ainda existem aspectos a serem aprimorados.

A partir dessa iniciativa, outras pesquisas têm sido desenvolvidas no Brasil com o mesmo objetivo: proporcionar um tratamento eficaz para o abastecimento de água para consumo humano que atendam às diretrizes preconizadas pelos respectivos órgãos responsáveis, ser de fácil instalação nas residências, não exigindo muitas técnicas e habilidades para o uso, ser de baixo custo, tenha uma vida útil longa, se tornando uma utilidade desejável.

Oliveira e Franco Júnior (2014), ambos da Universidade Federal de Uberlândia, realizaram um trabalho no qual utilizaram casca de café ou de pinus *in natura* em filtros de areia, com o propósito de avaliar estes resíduos sobre o tratamento de água, ocasionando a eliminação de contaminantes químicos, físicos e biológicos, melhorando assim, a qualidade da água. Os resultados obtidos mostraram que os filtros testados com casca de café ou de pinus não foram eficientes. A casca de pinus apresentou uma maior redução de turbidez (57%), enquanto que a casca de café apresentou uma menor redução de turbidez (35%) e, além disso, ambas possuem uma tendência em reduzir o pH da água. Porém, houve contaminação da água a partir do arraste de partículas.

Proporcionar água de qualidade para populações desprovidas do mesmo, é garantir uma maior qualidade de vida, minimizando mortes a partir de doenças de veiculação hídrica ou até mesmo de vetores. Doenças causadas principalmente por parasitos são frequentes e atingem a saúde da população vigente, principalmente em áreas periféricas, em perímetro rural em que podem residir famílias mais pobres ou em áreas indígenas, com certa carência de água tratada, não tendo segurança para consumi-la (DUKE; NORDIN; MAZUMDER, 2006).

### **3.3. Bioensaios ecotoxicológicos**

Testes 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). Nesses ensaios, organismos-teste

são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados.

A Ecotoxicologia baseia seus estudos nas modificações dos ecossistemas quando sofrem perturbações agudas ou crônicas, causadas por agentes tóxicos, valendo-se de conceitos pré-estabelecidos da ecologia para avaliar os prováveis efeitos dos contaminantes (ALMEIDA, 2007).

No Brasil, a área de Ecotoxicologia tem crescido nos últimos anos, desenvolvidos por órgãos de monitoramento ambiental e instituições de pesquisas. Realizados em campo ou em laboratório, os testes podem ser trabalhados a partir de substâncias, como metais, agrotóxicos, efluentes, amostras ambientais de água e sedimento, entre outros; e podem ser avaliados desde indivíduos, até comunidades como um todo; na Ecotoxicologia são utilizados vários organismos-teste, como algas, invertebrados aquáticos, peixes e outros, e são considerados vários parâmetros ou “end-points”, como taxa de sobrevivência ou mortalidade, crescimento, taxa de fecundidade, alterações bioquímicas e genéticas, modificações comportamentais, entre outros enfoques, de modo que haja respostas rápidas e de fácil interpretação e que possam ser correlacionadas com outros meios (MELETTI; ROCHA; MARTINEZ, 2003; ALMEIDA, 2007).

A CESTESB (Companhia de Ambiental do Estado de São Paulo) é um órgão que realiza ensaios toxicológicos utilizando organismos aquáticos como bioindicadores a fim de determinar efeitos tóxicos causados por agentes químicos em amostras de água (SILVA; RAVANELI; PASCHOALATO, 2010).

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. A partir de análises físico-químicas não é possível observar efeitos a médio e longo prazo em organismos de tal comunidade, porém, é um instrumento importante em relação as concentrações de contaminantes.

Portanto, em estudos ecotoxicológicos, os sistemas biológicos e as análises químicas e físicas são dependentes, e devem ser utilizadas de forma integrada para refletir o efeito dos poluentes, pois, a partir de correlações entre fatores bióticos e abióticos, é possível explicar melhor a causa (ALMEIDA, 2007; RIOS, 2013). Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam (COSTA et al., 2008).



Ensaio toxicológicos são uma ferramenta utilizada para avaliação da ação de agentes tóxicos a determinados compostos, seus metabólitos e produtos que prejudiquem tanto o ambiente quanto as cadeias alimentares (MOREIRA, 2014).

Ao propor a utilização de organismos tolerantes e sensíveis, estes devem ser testados a partir de experimentos com intuito de avaliar se realmente são capazes de responder, quando submetidos, a diferentes impactos. A partir daí é que será determinada a adequação deste organismo para uso como bioindicador ambiental, podendo trazer respostas rápidas diante de uma situação-problema (BALDAN, 2012).

Após a seleção do organismo-teste como bioindicador, é preciso levar em consideração os efeitos causados no organismo quando este é submetido ao contato com a solução-teste em um determinado tempo, e para isso, podem ser usados os testes agudos e/ou testes crônicos. (BALDAN, 2012).

Testes de toxicidade aguda são utilizados para medir os efeitos de agentes tóxicos em espécies aquáticas, com objetivo de estimar a concentração em que um agente tóxico seria capaz de produzir uma resposta a um organismo-teste em várias concentrações, em um período de geralmente 24 a 96h (FLOHR, 2007). Normalmente a resposta obtida a organismos aquáticos é a letalidade, podendo também entrar em estado de imobilidade.

Os testes agudos têm sido bastante adotados pelo fato de apresentarem uma resposta rápida, além de fornecer uma relação entre a dose estabelecida e a intensidade dos efeitos, indicando possíveis efeitos ao homem (FLOHR, 2007), porém os testes crônicos têm se mostrado eficazes, levando em consideração vários parâmetros finais (DORNFELD, 2006).

Testes de toxicidade crônica geralmente são testes mais longos, utilizados para avaliar alterações nos organismos, como mutações, taxas de crescimento, fecundidade. Esse teste pode incluir parte ou todo o ciclo de vida do organismo. A questão de uma substância não causar mortalidade do organismo, muitas vezes não significa que esta substância não seja tóxica. Exposições prolongadas dos organismos em determinadas concentrações, podem acometer suas funções biológicas, como crescimento e maturação, reprodução, entre outras (COSTA et al., 2008).

Os invertebrados aquáticos vêm sendo utilizados em bioensaios ecotoxicológicos a fim de avaliar a qualidade da água, fornecendo bons resultados do estado de integridade da mesma (DORNFELD, 2006; ALMEIDA, 2007; NOVELLI, 2010). Características bionômicas de seus componentes, como ciclo de vida suficientemente longo (o que proporciona a detecção de alterações em tempo hábil); tamanho do corpo relativamente grande, fácil amostragem e

elevada diversidade de espécies, oferecendo uma enorme gama de tolerâncias e amplo espectro de respostas frente a diferentes níveis de contaminação, são alguns fatores que levaram a utilização de insetos aquáticos como indicadores, além de algumas espécies serem de fácil criação em laboratório (CALLISTO, et al., 2001).

Dentre as classes de organismos bentônicos, a família Chironomidae é considerada a mais abundante (CALLISTO, et al., 2002). Por possuir ampla diversidade de espécies e habitats, as larvas de *Chironomus sancticaroli* são excelentes bioindicadores. Além disso, espécies desta família são de fácil cultivo em laboratório tem seu ciclo de vida bem conhecido.

Outro grupo de invertebrado que vem sendo utilizado em ensaios toxicológicos são os oligoquetos, por proporcionarem resultados rápidos, permitindo assim determinar a eficiência de medidas destinadas a reduzir a magnitude de impactos negativos gerados pelo homem no meio ambiente (LUCIANO, 2008; BEATRICI, 2004).

Ensaio toxicológicos utilizando a espécie *Allonais inaequalis*, tem mostrado eficácia na identificação da toxicidade de substâncias (CORBI; GORNI; CORREA, 2015). Estes são organismos que apresentam morfologia bastante simples, requerem pouco espaço, adaptam-se facilmente às condições laboratoriais, são facilmente manipuláveis e de baixo custo (MARTINS, 2013; BRENTANO, 2006).

Vale ressaltar que é recomendável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, de preferência pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Assim, sempre que possível, é recomendável avaliar o efeito de uma substância ou efluente para mais de uma espécie da biota aquática para que, 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.

Apesar disso, por razões práticas e econômicas, muitas vezes os testes de toxicidade são realizados com uma única espécie de organismo-teste (COSTA et al., 2008). A utilização de mais de uma espécie em testes toxicológicos é recomendado devido às diferenças de sensibilidade apresentadas por organismos de diferentes espécies frente às substâncias químicas.

### 3.4. Organismos-teste

#### 3.4.1. *Chironomus sancticaroli*

A família Chironomidae é constituída por 11 subfamílias, das quais cinco ocorrem no Brasil (Chironominae, Orthoclaadiinae, Podonominae, Tanypodinae e Telmatogetoninae) (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Os quironomídeos pertencem a classe Insecta, ordem Diptera, considerado um dos grupos mais abundantes e mais bem adaptados do grupo dos insetos. O nome vem do grego chir(o) que dá a ideia de “mão”, visto que os adultos possuem um comportamento de manter os apêndices anteriores levantados, lembrando braços estendidos. (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1999). As larvas de algumas espécies apresentam hemoglobina (Figura 1), o que possibilita sua sobrevivência em locais com quantidades baixas de oxigênio dissolvido (GUSMÃO, 2012).

A espécie *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 é de fácil criação em laboratório, além de sua ocorrência na região de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1981).

**Figura 1:** Espécie *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: <http://pragasarroz.xpg.uol.com.br/ArrozOutros.htm>

São organismos holometábolos, ou seja, possuem quatro estágios distintos em seu ciclo de vida, sendo ovo, larva, pupa e adulto (GUSMÃO, 2012). O ciclo de vida desse

organismo ocorre quase que totalmente dentro d'água, iniciando com a ovoposição próxima a vegetação das margens ou folhas. Os ovos ficam contidos em uma massa gelatinosa, que aumentam o volume ao entrarem em contato com a água (VIVEIROS, 2012), seguindo-se ao estágio larval, constituído de quatro instares, que ocorrem no sedimento e na água, o que mostra a sua adaptabilidade frente a diferentes ambientes (BALDAN, 2012).

As larvas a partir do 2º instar geralmente vivem em tubos construídos por seda e lodo, que ficam enterrados a poucos centímetros do sedimento (ALMEIDA, 2007). Larvas de 1º instar não constroem tubos, pois possuem hábitos planctônicos, encontram-se dispersas na coluna d'água para se alimentarem (GUSMÃO, 2012). O estágio de pupa geralmente é o mais curto. Neste instar há a presença de um tubo mais resistente na qual o organismo sofrerá metamorfose, gerando a pupa, com uma coloração castanho-escuro. Quando esta sofre maturação, em poucos segundos há o rompimento do casulo e a ida até a superfície para a emergência do adulto (VIVEIROS, 2012).

Os adultos se mantêm na superfície da água até que suas asas estejam secas. A partir daí, é possível distinguir machos e fêmeas, sendo que machos possuem abdômen afinado e antenas plumosas, e as fêmeas contêm abdômen mais espesso e antenas “lisas” (VIVEIROS, 2012). Cerca de dois dias após a emergência, ocorre a cópula e as fêmeas depositam seus ovos, aproximadamente de 500 a 660 ovos, que eclodem por volta de 44 a 48 horas (FONSECA e ROCHA, 2004). O ciclo de vida dessa espécie ocorre em um período de 13 dias, com grandes chances de sobrevivência dos organismos (FONSECA e ROCHA, 2004).

O tempo para que o ciclo de vida se complete varia entre as espécies. De acordo com Strixino e Trivinho-Strixino (1985), a temperatura é um dos fatores que influencia nas funções bioquímicas, físicas e mecânicas, como por exemplo, o desenvolvimento mais acelerado da espécie.

Segundo Goulart e Callisto (2003), as larvas Chironomidae são classificadas em organismos extremamente tolerantes, denominados grupo resistente, pois são capazes de sobreviver por várias horas em condições sem a presença de oxigênio, e ainda, são detritívoros, alimentando-se de material orgânico sedimentado, contribuindo para sua adaptação a ambientes distintos. Além disso, não são exigentes quanto a diversidade de habitats, se adaptando a praticamente todo o tipo de ambiente aquático (ALMEIDA, 2007).

Há várias pesquisas realizadas com esta família que nos mostram ser um bioindicador adequado para ser utilizado em testes de toxicidade (ROQUE; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2000; GOULART e CALLISTO, 2003; FONSECA E ROCHA, 2004; DORNFELD, 2006), porém, ainda não foi estabelecida uma norma para este organismo

(RIOS, 2013). Além disso, de acordo com Corbi et al. (2010), invertebrados aquáticos, em geral, tem capacidade de bioacumulação, o que reforça o uso deles como bioindicadores.

Foram realizados diversos trabalhos utilizando *Chironomus sancti-caroli* como organismo-teste para avaliar a qualidade da água. Segundo Dornfeld (2006), testes ecotoxicológicos tem se mostrado cada vez mais eficientes a ponto de poderem ser utilizados na elaboração de normas e diretrizes para atender a questões de riscos ecotoxicológicos, colaborando para a obtenção de resposta rápidas frente a diversos compostos.

### 3.4.2. *Allonais inaequalis*

A espécie *Allonais inaequalis* pertence ao Filo Annelida, Classe Clitellata, Ordem Haplotaxida, Família Naididae. Esta espécie foi descrita pela primeira vez como *Nais pectinata* var. *Inaequalis* Stephenson, 1911.

Os oligoquetos podem ser utilizados como bioindicadores com intuito de avaliar efeitos de contaminantes em amostras ambientais, contudo, no Brasil, há poucos estudos que empregam espécies nativas a testes toxicológicos (CORBI, ROSSI, CORREA, 2015). Ribeiro (2008) cita que o grupo é utilizado em testes de toxicidade.

A espécie *Allonais inaequalis* pertence a mesma família do *Tubifex tubifex*, espécie muito utilizada em bioensaios de toxicidade, e é um organismo que apresenta normas bem definidas, podendo assim, servir de base em testes com *Allonais inaequalis* (RIOS, 2013).

Apesar de haver poucos estudos no Brasil relacionados as oligoquetos, a utilização deste grupo em pesquisas na área de impacto ambiental tem crescido, e com o desenvolvimento da toxicología ambiental, esses organismos estão ganhando cada vez mais espaço em relação a sua utilização como organismos-teste (NASCIMENTO, 2014).

São animais detritívoros, ou seja, se alimentam de materia orgânica sedimentada, além de se adaptarem a uma diversidade de habitats (GOULART e CALLISTO, 2003).

Mesmo esse organismo não apresentando uma padronização nos testes de toxicidade, por tratar-se de pesquisas isoladas, é notável que esses estudos possuam uma importância significativa que caminham para uma futura padronização nos métodos empregados para esta espécie.

A distribuição desta espécie foi registrado em vários ambientes. De acordo com um trabalho realizado por Gorni, Peiró e Sanches (2015) em que eles reuniram dados publicados

de oligoquetos no estado de São Paulo, a espécie *Allonais inaequalis* é encontrada nos municípios de Américo Brasiliense, Araraquara e Brotas.

Oligoquetos são organismos capazes de obter respostas frente a testes toxicológicos, pois são organismos que se adaptam a vários tipos de ambientes, além de efeitos bioacumulativos.

### 3.4.3. *Danio rerio*

A espécie *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (1822), é um peixe de água doce, de clima tropical originário da Índia, popularmente conhecido como “paulistinha” ou zebra-fish. Pertence a família Cyprinidae (Ordem Cypriniformes). São os principais representantes da cadeia trófica do ambiente aquático, geralmente desempenhando papel de consumidor secundário (COSTA et al., 2008). É um organismo de pequeno porte e muito utilizado como bioindicador em testes toxicológicos pelo fato de sua reprodução constante que se estende ao longo do ano, além de se adaptar com facilidade às condições experimentais (ARAÚJO; GARCIA; GARCIA, 2008; MELETTI; ROCHA; MARTINEZ, 2003). A espécie *Danio rerio* é internacionalmente utilizada como organismo-teste e possui protocolo de teste (ABNT, 2011).

São animais ovíparos, que possuem hábitos alimentares onívoros e se adaptam a diferentes condições ambientais (SILVA; RAVANELI; PASCHOALATO, 2010). O adulto chega a medir 5 centímetros de comprimento. Em geral, dispõe de uma coloração prateada e cinco listras horizontais de coloração azul, além de dimorfismo sexual (SILVA; RAVANELI; PASCHOALATO, 2010).

A importância de espécies de peixes como bioindicadores ambientais ocorre pelo fato de serem fonte de alimento e geração de renda para muitas populações (MENDES, 2011). Segundo Meletti, Rocha e Martínez (2003), os peixes são organismos capazes de armazenar progressivamente substâncias por biomagnificação. Sendo assim, a medida que percorre a cadeia alimentar, a tendência é que ocorra o aumento de determinada substância no organismo vivo.

Os peixes são muito mais próximos dos humanos do que os invertebrados, do ponto de vista histológico e fisiológico, permitindo assim, uma hipótese mais genuína (MELETTI; ROCHA; MARTINEZ, 2003).

Nos testes de toxicidade aguda utilizando peixes, normalmente avalia-se mortalidade dos organismos expostos as soluções-teste (COSTA et al., 2008).

Testes de toxicidade utilizando peixes são realizados a partir da exposição destes a várias substâncias por um período de 48 horas (RIBEIRO, 2008).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Cultivo e manutenção de *Chironomus sancticaroli***

O cultivo e manutenção das larvas de *C. sancticaroli* foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) a partir de cultivos mantido no respectivo laboratório, seguindo os métodos de manutenção modificados por Fonseca (1997).

Os cultivos de *Chironomus sancticaroli* foram mantidos em bandejas plásticas cobertas por gaiolas de nylon para retenção dos adultos (Figura 2), contendo uma camada de sedimento esterilizado ao fundo (areia fina comum, lavada em água corrente, seca em estufa a 60°C e levada à mufla por 4 horas a 560 °C) e 3 litros de água deionizada, com condutividade entre 25-55 $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>, dureza entre 12 e 16mg.L<sup>-1</sup> para CaCO<sub>3</sub>, pH entre 6,5 e 7,5 e temperatura de 22-26°C e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro.

As bandejas foram alimentadas 3 vezes por semana com 20mL de solução contendo 1 litro de água deionizada e 5,0 g de ração para peixe triturada (tipo Tetramim®) de acordo com métodos padronizados por Dornfeld (2006).

**Figura 2:** Cultivo de *Chironomus sancticarloi* em bandejas plásticas, cobertas por gaiolas de nylon para retenção dos adultos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2. Cultivo e manutenção de *Allonais inaequalis*

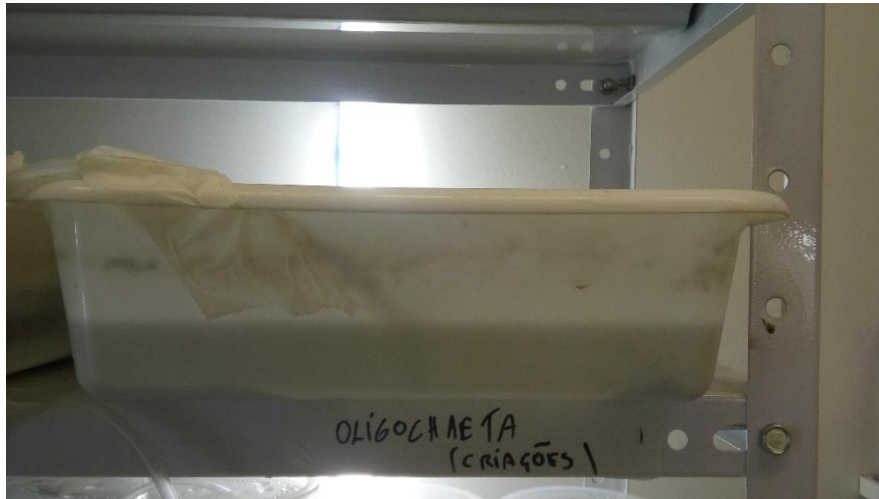
O cultivo e manutenção da espécie *A. inaequalis* foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP), a partir de uma matriz já existente, seguindo os métodos de manutenção de Corbi, Gorni e Correa (2015).

Os cultivos de *A. inaequalis* foram mantidos em bandejas plásticas contendo cerca de 2 litros de água deionizada e 1Kg de sedimento esterilizado (areia fina comum, lavada em água corrente, seca em estufa a 60°C e levada à mufla por 4 horas a 560 °C) e 3 litros de água deionizada, com condutividade entre 25-55 $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>, dureza de 20  $\pm$ 2mg.L<sup>-1</sup> para CaCO<sub>3</sub>, pH entre 6,5 e 7,5 e temperatura de 23-25°C e fotoperíodo de 12h luz/ 12hescuro) (Figura 3).

Os organismos foram alimentados a cada 7 dias com 20mL de solução contendo 1 litro de água destilada e 2,0 g de ração para peixe triturada (tipo Tetramim®), e sobre aeração constante de acordo com métodos padronizados por Corbi, Gorni e Correa (2015).



**Figura 3:** Matriz de *Allonais inaequalis* do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA).



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 4.3. Cultivo e manutenção de *Danio rerio*

Os Juvenis de *Danio rerio* foram obtidos comercialmente e mantidos no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP).

As condições para a manutenção dos organismos seguiram as recomendações das normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para testes de toxicidade com peixes (ABNT, 2011), em que os adultos de *Danio rerio* foram aclimatados por um período mínimo de 15 dias antes da realização dos testes, em caixas de 50 litros (Figura 4), com metade do volume composto pela água do próprio cultivo e outra parte com água reconstituída (ABNT, 2011). A substituição de 1/3 da água por água reconstituída foi realizada a cada 24h, sendo verificados os valores de temperatura, pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e dureza. A água reconstituída foi mantida em aeração constante, com temperatura controlada em  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro, com dureza entre 40 e 48  $\text{mg.L}^{-1}$  e pH entre 7,0 e 7,6. Foram realizadas troca de água diárias de cerca de 1/3 do volume do aquário e a alimentação foi administrada uma vez ao dia com ração comercial Tetramin® até 24h antes da montagem dos testes.

**Figura 4:** Cultivo e manutenção de *Danio rerio* em caixas com aproximadamente 50 Litros.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4. Testes de sensibilidade

Os testes de sensibilidade com *Chironomus sanctiparoli* foram realizados utilizando Cloreto de Potássio (KCl), como substância de referência. As concentrações de KCl utilizadas foram 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5g.L<sup>-1</sup> e mais o controle contendo apenas água reconstituída (FONSECA, 1997; FONSECA e ROCHA, 2004). Para a realização dos testes, utilizou-se 240mL da solução-teste, e 6 organismos por réplica, em triplicata, alimentados apenas no início do teste com 5mL de uma solução composta por 5g de ração tipo Tetramin e 1 litro de água deionizada, com duração de 96h, em temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro.

Foram realizados testes de sensibilidade com *Allonais inaequalis* utilizando a substância de referência cloreto de potássio (KCl), seguindo as recomendações da Fonseca e Rocha (2004). Foram utilizadas as concentrações: 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g L<sup>-1</sup>. Para o teste utilizou-se 200 mL de solução-teste e 6 organismos em cada réplica, em triplicata, expostos a um período de 96 horas (FONSECA, 1997), em temperatura de 25 ± 2° C e fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro.

Para avaliar as condições fisiológicas do lote de *Danio rerio*, foram realizados testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl). As concentrações de KCl utilizadas foram 0,45; 0,6; 0,75; 0,9 e 1,05g.L<sup>-1</sup> e mais o controle contendo apenas

água reconstituída. Foram realizados testes em béqueres contendo 1000 mL da solução-teste e 2 peixes por réplica, em duplicata, sem alimentação, com aeração constante, sem renovação da solução-teste (estático) e duração de 48h.

A tabela 2 apresenta resumidamente a metodologia utilizada para a realização dos testes de sensibilidade realizados para os três organismos.

**Tabela 2:** Metodologia utilizada nos testes de sensibilidade.

	<i>Chironomus sancticaroli</i>	<i>Allonais inaequalis</i>	<i>Danio rerio</i>
<b>Substância de referência</b>	Cloreto de potássio (KCl)		
<b>Concentrações</b>	1,5; 2,25; 3,5; 5,0; 7,5g.L <sup>-1</sup>	1,5; 2,25; 3,5; 5,0; 7,5g.L <sup>-1</sup>	0,45; 0,6; 0,75; 0,9; 1,05g.L <sup>-1</sup>
<b>Solução-teste</b>	240mL	200mL	1000mL
<b>Organismos por réplica</b>	6	6	2
<b>n° réplicas</b>	3	3	2
<b>Alimentação</b>	5mL solução	5mL solução	Sem alimentação
<b>Duração</b>	96h	96h	48h
<b>Temperatura/ Fotoperíodo</b>	25 ±2°C (12h:12h)	25 ±2°C (12h:12h)	25 ±2°C (12h:12h)
<b>Aeração</b>	Não	Não	Sim

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

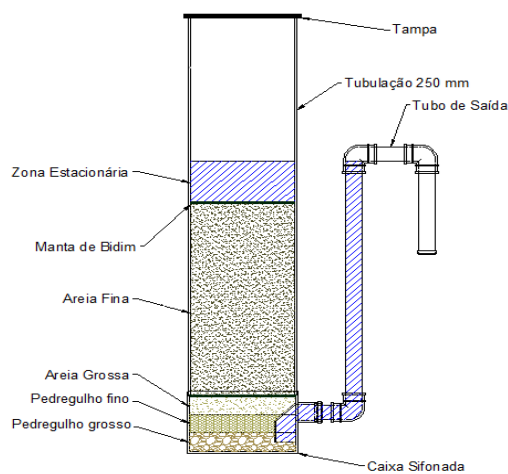
Os ensaios toxicológicos serão realizados com a água tratada pelo Biofiltro em escala real apresentados na Figura 5 e sua configuração na Figura 6, visando estimar a segurança da água gerada para fins de consumo. Além disso, será analisada a água obtida do poço em que são coletadas para abastecer o Biofiltro.

**Figura 5:** Biofiltros em escala real construídos com peças de PVC.



**Fonte:** Calixto e Sabogal Paz (2005).

**Figura 6:** Configuração do BFA a partir de materiais que são disponíveis em lojas de material de construção.



**Fonte:** Magalhães e Sabogal Paz (2013).

Os efluentes eram transportados do Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas (LATAR), localizado no Campus I, ao Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), localizado no Campus II da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, a partir de bombonas plásticas de 10 Litros (Figura 7). A água normalmente era captada no mesmo dia dos testes.

**Figura 7:** Bombonas utilizadas para transporte de efluente do Biofiltro e água do poço, conduzidos do Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de águas (LATAR) até o Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) para realização dos bioensaios de toxicidade.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Para os testes, foram analisadas algumas variáveis físicas e químicas, como pH, oxigênio dissolvido, dureza, temperatura e condutividade (Tabela 3):

**Tabela 3:** Análise de algumas variáveis das soluções-teste para realização de bioensaios toxicológicos.

Variável analisada	Método
Temperatura	Medidor de temperatura de bancada - Gehaka PG 1800
pH	Medidor de pH de bancada - Gehaka PG 1800
Condutividade	Medidor portátil - Prolab® CON-300
Oxigênio dissolvido	Medidor de oxigênio dissolvido – WTW
Dureza	Kit medidor de dureza - Visocolor® HE

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

#### 4.5. Bioensaios de toxicidade utilizando *Chironomus sancticaroli* como organismo-teste

Os testes foram realizados utilizando-se as recomendações apresentadas em Novelli (2010), na qual se utiliza 240 mL da solução-teste (água proveniente do BFA ou água do poço) em 60 g de sedimento controle (areia branca fina para aquário) em quatro réplicas. Os testes controle serão obtidos pela utilização de água reconstituída (Figura 8).

As condições de temperatura são de 22-26 °C e fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro. O procedimento adotado nos testes com a espécie foi recomendada por Fonseca (1997) e Strixino e Strixino (1995).

Nos testes de toxicidade aguda foram utilizadas 6 larvas de IV instar com 4 réplicas. As larvas foram alimentadas somente no início do teste com 5 mL de solução contendo 1 litro de água deionizada e 5,0 g de ração para peixe triturada (tipo Tetramim®) de acordo com métodos padronizados por Dornfeld (2006) e mantidas sem aeração por 96h.

Nos testes de toxicidade crônica foram utilizadas 6 larvas de I instar em potes de 500mL contendo 240 mL da solução-teste (água do Biofiltro ou água do poço) e 60g de sedimento controle mais o Controle, composto por água reconstituída e sedimento controle, com 4 réplicas. As larvas foram mantidas sob aeração constante e alimentadas a cada dois dias com 5 mL de solução por 192 horas (8 dias).

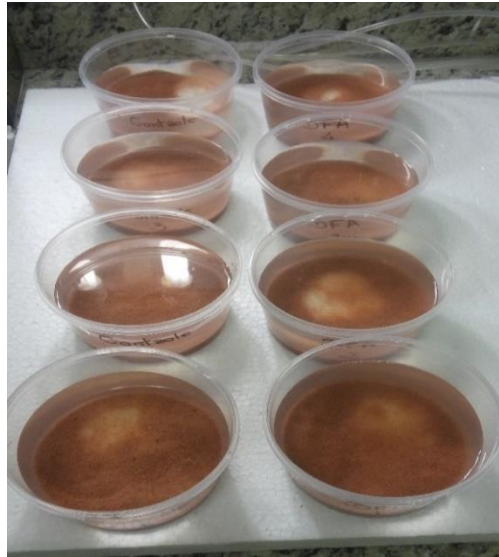
Nos testes de toxicidade mais longos, foram utilizadas 6 larvas de I instar em 4 réplicas. As larvas foram alimentadas a cada dois dias com 5 mL de solução e mantidas em aeração até o final do teste, com duração de 384 horas (16 dias).

Em testes de toxicidade aguda em caixas sifonadas foram utilizados 12 larvas de IV instar em caixas sifonadas contendo 120g de sedimento controle e 3000 mL de água reconstituída, em duplicata. A duração do teste foi de 96 horas, sem aeração, sendo os organismos alimentados somente no início do teste com 10 mL de solução.

Em testes de toxicidade crônica em caixas sifonadas, foram utilizadas 12 larvas de I instar em caixas sifonadas contendo 120g de sedimento esterilizado e 3000 mL de água reconstituída, em duplicata. As larvas foram alimentadas a cada 2 dias com 10mL de solução, submetidas a aeração até o final do teste, com duração de 192 horas (8 dias).

Fizeram-se criações dessa espécie a fim de detectar algum tipo de toxicidade da caixa sifonada sobre os organismos, em um período mais extenso, contendo 240g de sedimento, 3000 mL de água reconstituída, 20 mL de alimento composto. Foram colocados 20 organismos em cada caixa, em duplicata, que permaneceram por um período de 3 meses. Ao retirá-los da caixa, os organismos foram contabilizados.

A tabela 4 apresenta de forma resumida a metodologia utilizada para a realização dos bioensaios de toxicidade com *Chironomus sancticaroli*.

**Figura 8:** Bioensaios de toxicidade aguda com *Chironomus sancticaroli*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 4:** Metodologia utilizada nos bioensaios de toxicidade com *Chironomus sancticaroli*.

	<b>Agudo</b>	<b>Crônico</b>	<b>Mais longos</b>	<b>Agudo (Caixa Sifonada)</b>	<b>Crônico (Caixa sifonada)</b>	<b>Criações (Caixa sifonada)</b>
<b>Solução-teste</b>	240mL	240mL	240mL	3000mL	3000mL	3000mL
<b>Sedimento</b>	60g	60g	60g	240g	240g	240g
<b>Larvas por réplica</b>	6	6	6	12	12	20
<b>Ínstar</b>	IV	I	I	IV	I	I
<b>n° de réplicas</b>	4	4	4	2	2	2
<b>Temperatura</b>	23 – 25°C	23 – 25°C	23 -25°C	23 – 25°C	23 – 25°C	23 – 25°C
<b>Fotoperíodo</b>	12luz:12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro
<b>Alimentação</b>	Início do teste (5mL)	A cada 2 dias (5mL)	A cada 2 dias (5mL)	Início do teste (10mL)	A cada 2 dias (10mL)	A cada 2 dias (20mL)
<b>Aeração</b>	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
<b>Duração do teste</b>	96 horas (4 dias)	192 horas (8 dias)	384 horas (16 dias)	96 horas (4 dias)	192 horas (8 dias)	Aprox. 3 meses

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.6. Avaliação da fecundidade de *Chironomus sancticaroli*

Além da realização dos testes de toxicidade, os adultos provenientes do bioensaio de toxicidade crônica de 8 dias, de testes mais longos (16 dias) e das criações em caixas sifonadas, foram contabilizados e separados em machos e fêmeas e congelados para posterior análise de fecundidade. As asas foram preservadas em lâminas permanentes em meio Hoyer para possibilitar a mensuração da asa.

A avaliação da fecundidade potencial (número de ovos da primeira desova presentes nos ovários das fêmeas) foi realizada segundo os métodos de Trivinho-Strixino e Strixino (1989), a partir da medida do comprimento da asa, desde a alula até o ápice da asa (Figura 9), realizado com auxílio de um microscópio óptico da marca Quimis®

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

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

Onde,

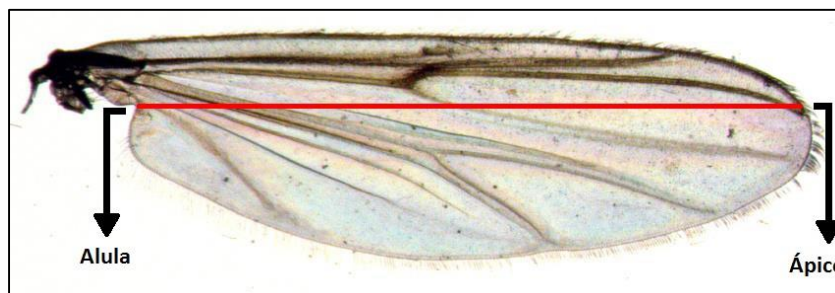
F = fecundidade potencial

k = constante (471,64)

L = comprimento da asa

m = constante (707,41)

**Figura 9:** Asa da fêmea de *Chironomus sancticaroli*, apontando os devidos locais para aferir o comprimento do mesmo.



Fonte: Rebechi, 2012.



#### 4.7. Bioensaios de toxicidade com o organismo-teste *Allonais inaequalis*

Nos testes de toxicidade aguda com a espécie *A. inaequalis* foram utilizados 5g de sedimento controle (areia branca fina para aquário) e 100 mL de solução-teste (água resultante do Biofiltro ou água do poço) em potes de 250mL, em quatro réplicas. Os testes controle foram obtidos pela utilização de água reconstituída. Foram utilizados 6 oligoquetos por réplica. Os organismos foram alimentados apenas no início do teste com 5 mL de solução contendo 1 litro de água deionizada e 2,0 g de ração para peixe triturada tipo Tetramim® de acordo com métodos padronizados por Corbi, Gorni e Correa (2015) e mantidas sem aeração até o final do teste, com duração de 96h.

Nos testes de toxicidade crônica utilizando *A. inaequalis*, utilizou-se 5g de sedimento controle e 100 mL de solução teste (água do Biofiltro ou água do poço), em 4 réplicas. Os testes controles foram realizados utilizando água reconstituída como solução-teste. Foram utilizados 6 organismos por réplica, alimentados duas vezes durante o teste, com 5mL de alimento composto, com duração de 240 horas (10 dias) submetidos a aeração até o final do teste.

Em testes de toxicidade aguda em caixas sifonadas foram utilizados 10g de sedimento controle e 3000 mL de água reconstituída, em duplicata. Utilizaram-se 12 organismos por réplica, com duração de 96 horas (4 dias), sem aeração. Foram alimentados somente no início do teste com 10mL de alimento composto.

Em testes de toxicidade crônica em caixas sifonadas, foram utilizados 10g de sedimento esterilizado, 3000 mL de água reconstituída e 12 organismos por réplica, em duplicata. Os organismos foram alimentados duas vezes durante o teste, com 10mL de alimento composto. As caixas foram submetidas a aeração até o final dos testes, cuja duração foi de 240 horas (10 dias).

Criações em caixas sifonadas a fim de detectar algum tipo de toxicidade da mesma sobre os organismos foram realizadas utilizando-se 240g de sedimento controle, 3000 mL de água deionizada, 20 mL de alimento composto e 20 organismos por réplica, em duplicata, com aeração constante, e um período de 3 meses de duração. Ao retirá-los da caixa, os organismos foram contabilizados.

A tabela 5 mostra, de forma resumida, a metodologia utilizada para a realização dos bioensaios de toxicidade com *Allonais inaequalis*.

**Tabela 5:** Metodologia utilizada nos bioensaios de toxicidade com *Allonais inaequalis*.

	<b>Agudo</b>	<b>Crônico</b>	<b>Agudo (Caixa Sifonada)</b>	<b>Crônico (Caixa sifonada)</b>	<b>Criações (Caixa sifonada)</b>
<b>Solução-teste</b>	100mL	100mL	3000mL	3000mL	3000mL
<b>Sedimento</b>	5g	5g	10g	10g	240g
<b>Organismo por réplica</b>	6	6	12	12	20
<b>nº de réplicas</b>	4	4	2	2	2
<b>Temperatura</b>	23 – 25°C	23 – 25°C	23 – 25°C	23 – 25°C	23 – 25°C
<b>Fotoperíodo</b>	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro	12 luz: 12 escuro
<b>Alimentação</b>	Início do teste (5mL)	A cada 2 dias (5mL)	Início do teste (10mL)	A cada 2 dias (10mL)	A cada 2 dias (20mL)
<b>Aeração</b>	Não	Sim	Não	Sim	Sim
<b>Duração do teste</b>	96 horas (4 dias)	240 horas (10 dias)	96 horas (4 dias)	240 horas (10 dias)	Aprox. 3 meses

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

#### **4.8. Bioensaios de toxicidade aguda utilizando *Danio rerio* como organismo-teste**

Os testes de toxicidade aguda (48 horas) seguiram a metodologia descrita pela ABNT (2011), utilizando-se o organismo adulto. Os testes foram conduzidos em béqueres contendo 1000 mL de solução-teste (água do Biofiltro ou água do poço) e 2 organismos por béquer, em duplicata, além do controle, composto por apenas água reconstituída, sob condições de temperatura de 25°C ±2 e fotoperíodo de 12 horas, com duração de 48h, em condições estáticas. Para os testes de toxicidade aguda, foi avaliada a sobrevivência. Medidas de pH, condutividade, dureza, e oxigênio dissolvido foram realizados nos testes de toxicidade aguda no início e final do experimento. No final dos testes foram realizadas a avaliação biométrica dos organismos, obtendo-se o peso fresco (g), em balança analítica da marca Gehaka®, e o

comprimento total (mm) dos organismos através de paquímetro. Para a retirada dos testes foi utilizado para cada litro de solução-teste, 30 mL de uma solução composta por óleo de cravo e etanol, em uma proporção de 1:9 para eutanasiar os peixes.

#### 4.9. Análise estatística

Para o cálculo da CL50 da substância de referência utilizada nos testes de sensibilidade com os organismos *C. sancticaroli*, *A. inaequalis* e *D. rerio*, utilizou-se o pacote “RDC” no software “R” (R Core Team, 2014), para encontrar a faixa de sensibilidade dos organismos testados. Os dados foram plotados em curvas dose-padrão, no eixo x as concentrações de KCl (g/L) e no eixo y, a porcentagem de mortalidade.

Para o cálculo da fecundidade potencial de *C. sancticaroli*, peso e comprimento de *D. rerio*, a análise estatística foi realizada através da comparação dos organismos-testes expostos a diferentes soluções-testes com o controle. Foi aplicado o teste de variância (ANOVA), com auxílio do programa computacional Past® para análise estatística, sendo considerado como significativos os testes que apresentam valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram plotados em gráficos “box-plot”.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Teste de sensibilidade para *Chironomus sancticaroli*

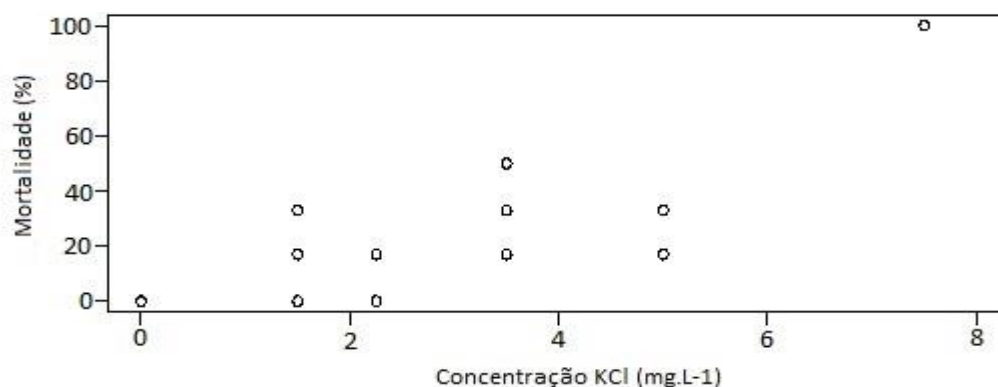
A faixa de sensibilidade do organismo-teste *Chironomus sancticaroli*, estabelecida para a substância de referência Cloreto de potássio (KCl), está apresentada na tabela 6 e figura 10. O resultado da  $CL_{50,96h}$  para *Chironomus sancticaroli* ao cloreto de potássio foi de 5,03  $g.L^{-1}$ , com limites inferior e superior de 4,02 e 6,04  $g.L^{-1}$ .

**Tabela 6:** Valores de CL50 e intervalo de confiança de *Chironomus sancticaroli* para a substância de referência KCl

CL50 ( $g.L^{-1}$ )	Desvio padrão	Intervalo de confiança ( $g.L^{-1}$ )
5,03	0,47	4,02 - 6,04

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 10:** Curva dose resposta de *Chironomus sancticaroli* ao Cloreto de Potássio em teste de toxicidade aguda



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2. Teste de sensibilidade para *Allonais inaequalis*

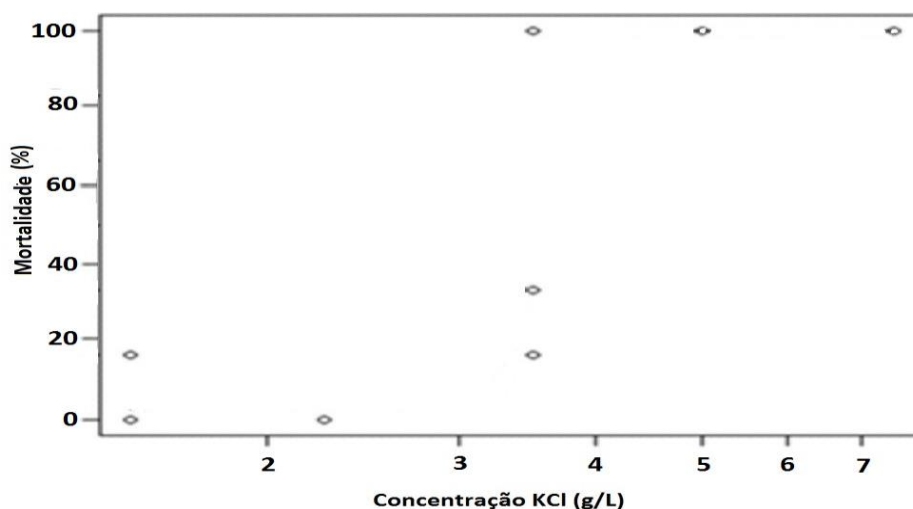
O resultado da CL50 (96h) para *Allonais inaequalis* ao cloreto de potássio (KCl) foi de 3,50 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 2,97 e 5,36 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 7 e Figura 11).

**Tabela 7:** Valores de CL50 e intervalo de confiança de *Allonais inaequalis* para a substância de referência KCl

CL50 (g.L <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	Intervalo de confiança (g.L <sup>-1</sup> )
3,50	1,17	2,97 – 5,36

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 11:** Curva dose resposta de *Allonais inaequalis* ao Cloreto de Potássio em testes de toxicidade aguda.



Fonte: Corbi; Gorni e Correa (2015).

### 5.3. Teste de sensibilidade para *Danio rerio*

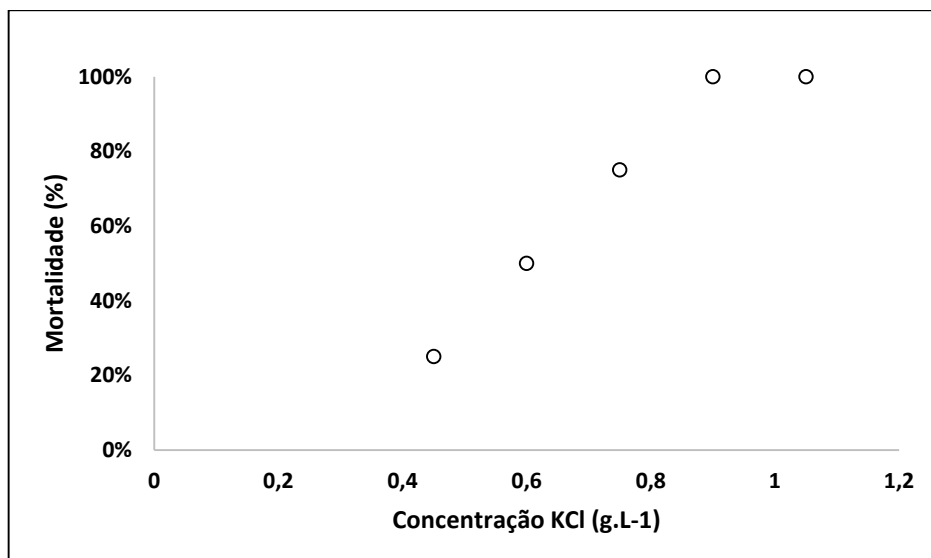
O resultado da CL50 (48h) para *Danio rerio* ao cloreto de potássio foi de 0,58 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 0,54 e 0,62 g.L<sup>-1</sup>, apresentados na Tabela 8 e Figura 12.

**Tabela 8:** Valores de CL50 e intervalo de confiança de *Danio rerio* para a substância de referência KCl

CL50(g.L <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	Intervalo de confiança (g.L <sup>-1</sup> )
0,58	0,01	0,54 – 0,62

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 12:** Curva dose resposta de *Danio rerio* ao Cloreto de Potássio em testes de toxicidade aguda.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.4. Variáveis físicas e químicas dos bioensaios de toxicidade

No início dos testes, alguns parâmetros foram aferidos, conforme Tabela 9 e 10:

**Tabela 9:** Valores dos parâmetros físicos e químicos das soluções-teste para os bioensaios de toxicidade com os organismos-teste *Chironomus sanctiparoli* e *Allonais inaequalis*.

Teste	pH	Temperatura (°C)	Condutividade (µS)	Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> )
Controle	7,76 - 8,14	22,5 - 23,3	48 - 51	17,8 - 22,25
BFA	7,83 - 8,9	22,7 - 23,2	45 - 66	17,8 - 22,25
AP	7,32 - 8,46	22,3 - 23,1	44 - 50	17,8 - 22,25

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 10:** Valores dos parâmetros físicos e químicos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e dureza) das soluções-teste realizados durante o bioensaio de toxicidade aguda com *Danio rerio*

Teste	pH		Temperatura (°C)		Oxigênio (mg.L <sup>-1</sup> )		Condutividade (µS)		Dureza (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	
	<i>i</i>	<i>F</i>	<i>i</i>	<i>F</i>	<i>i</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>F</i>	<i>i</i>	<i>f</i>
Controle	8	8	23,2	22,6	6,42	6,08	123	123	44,5	41,16
BFA	8	8	23,2	21,6	6,38	6,55	48	51	38,11	26,7
AP	8	8	23,5	22,4	6,32	6,13	49	52	36,31	26,7

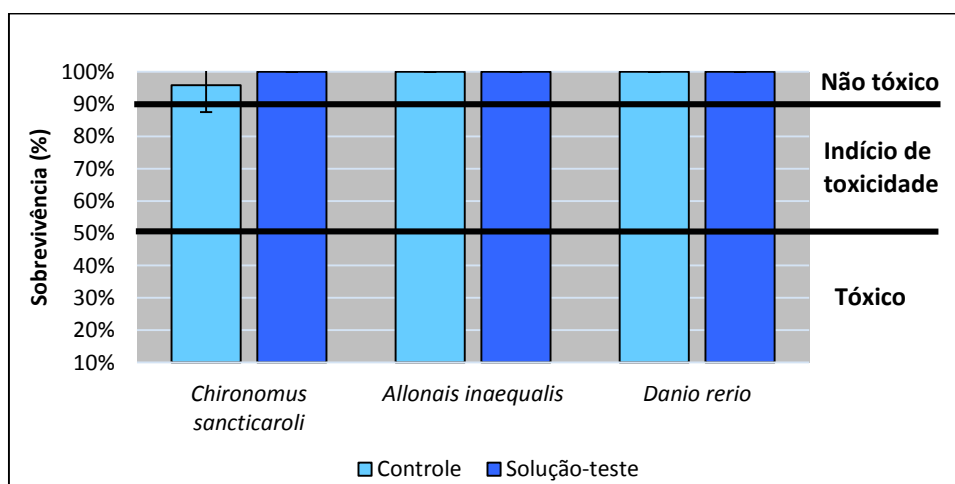
*i*= início dos testes; *f*= final dos testes

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 5.5. Bioensaios de toxicidade aguda com *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* e *Danio rerio*

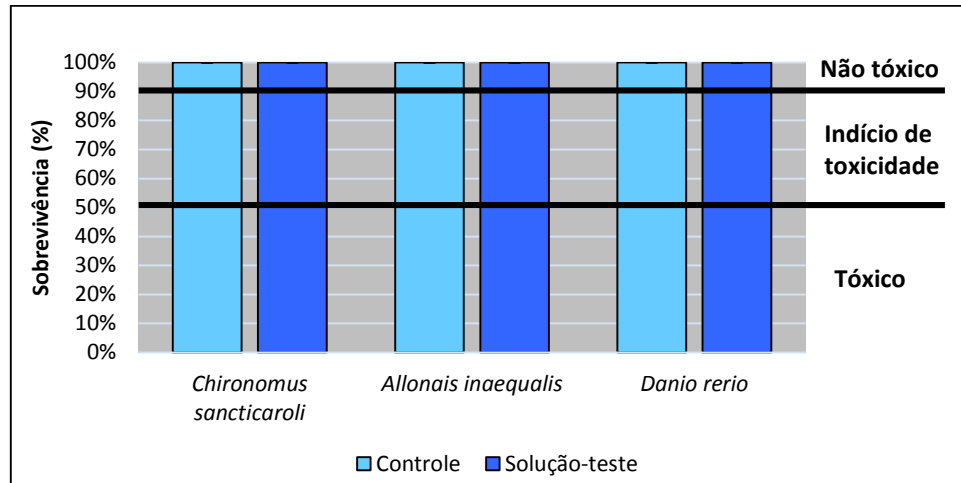
Para os testes de toxicidade, visou-se classificar a porcentagem de sobrevivência dos organismos quando expostos a solução-teste em tóxico (sobrevivência < 50%), indício de toxicidade (50% > sobrevivência > 90%) e não tóxico (sobrevivência > 90%) como proposto por Barbosa (2000). Baseado nessa classificação, os bioensaios de toxicidade aguda realizados com *C. sancticaroli*, *A. inaequalis* e *D. rerio*, em contato com a água do BFA e com a água do poço, não apresentaram toxicidade de acordo com os resultados obtidos e apresentados nas Figuras 13 e 14, pois seus valores de sobrevivência foram maiores que 98%.

**Figura 13:** Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade aguda com o efluente BFA, utilizando *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* e *Danio rerio*. O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 14:** Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade aguda com o efluente AP, utilizando *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* e *Danio rerio*. O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.



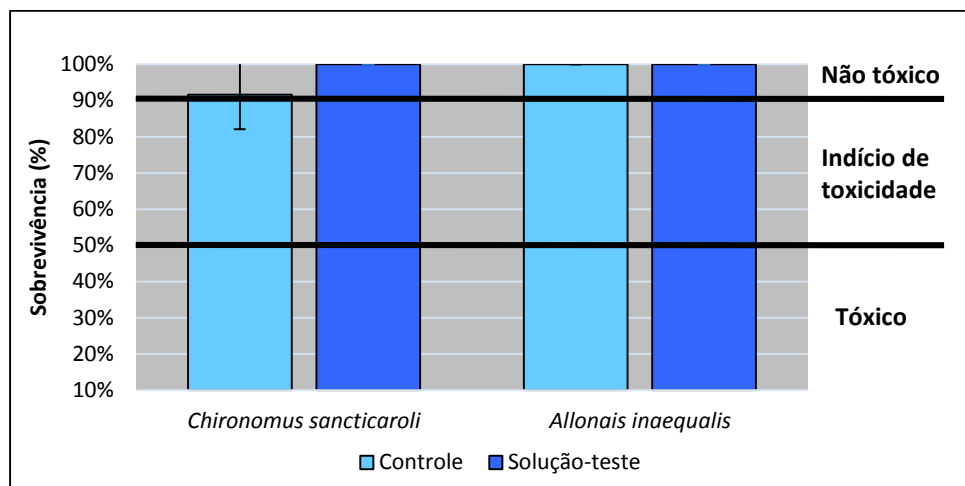
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os gráficos permitiram uma interpretação mais visual dos resultados, uma vez que cada teste pode ser avaliado individualmente e comparada entre os organismos estudados. Ao analisar os gráficos, foi possível observar que não houve toxicidade do efluente do Biofiltro em areia e nem da água do poço. Apesar do teste-controle da espécie *C. sancticaroli* ter apresentado uma faixa de 96% de sobrevivência, o mesmo mostrou ser não tóxico, segundo a classificação de Barbosa (2000) e Dornfeld (2002).

### 5.6. Bioensaios de toxicidade crônica com *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis*

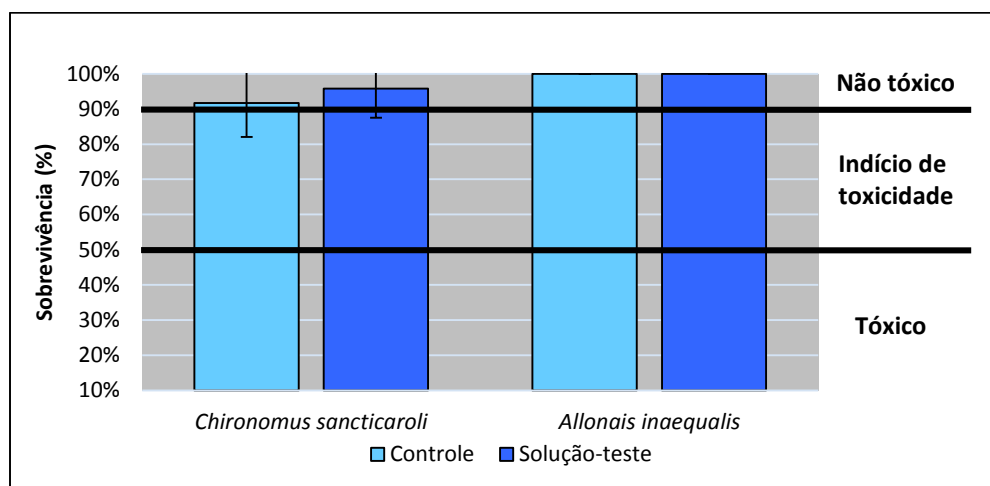
Os bioensaios de toxicidade crônica realizados apenas com os organismos-teste *C. sancticaroli* e *A. inaequalis* (não foi realizado com *D. rerio*), os quais, quando em contato com a água do Biofiltro ou com a água do poço, não apresentaram toxicidade. Os resultados estão expressos nas Figuras 15 e 16, em porcentagem de sobrevivência.

**Figura 15:** Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônica com o efluente BFA, utilizando *Chironomus sanctlicaroli* e *Allonais inaequalis*. O gráfico expressa a em porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 16:** Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônica com o efluente AP, utilizando *Chironomus sanctlicaroli* e *Allonais inaequalis*. O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O teste de toxicidade a partir do efluente do BFA como solução-teste, não apresentou toxicidade, apesar do teste-controle do organismo *C. sanctlicaroli* apresentar um índice de sobrevivência de  $92\% \pm 0,09$ , mas esta não foi uma porcentagem significativa a ponto de ser considerado tóxico, levando em conta a classificação em porcentagem de sobrevivência dos organismos, proposta por Barbosa (2000) e Dornfeld (2002). O mesmo ocorre no bioensaio de



toxicidade crônica para *C. sancticaroli*, em que a sobrevivência do organismo foi acima de 90%, não apresentando, portanto, toxicidade.

### 5.7. Testes mais longos (16 dias) utilizando *Chironomus sancticaroli* como organismos-teste

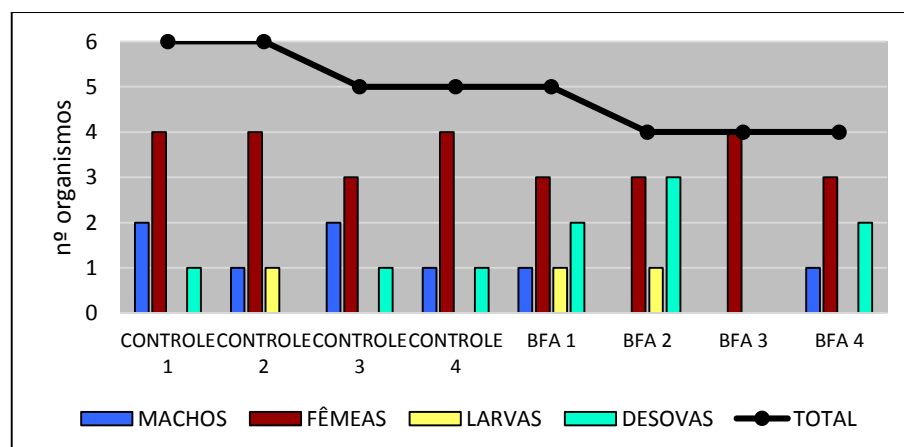
Nos testes mais longos, obteve-se o ciclo de vida completo do organismo-teste quando exposto ao efluente do BFA e a água do poço, apresentando emergência de machos e fêmeas, desovas e larvas de 4º instar (Figura 17) que já estavam seguindo para a fase de pupa. Estes resultados encontram-se nas Figuras 18 e 19.

**Figura 17:** Emergência de adultos e observação de desovas em testes de 16 dias.



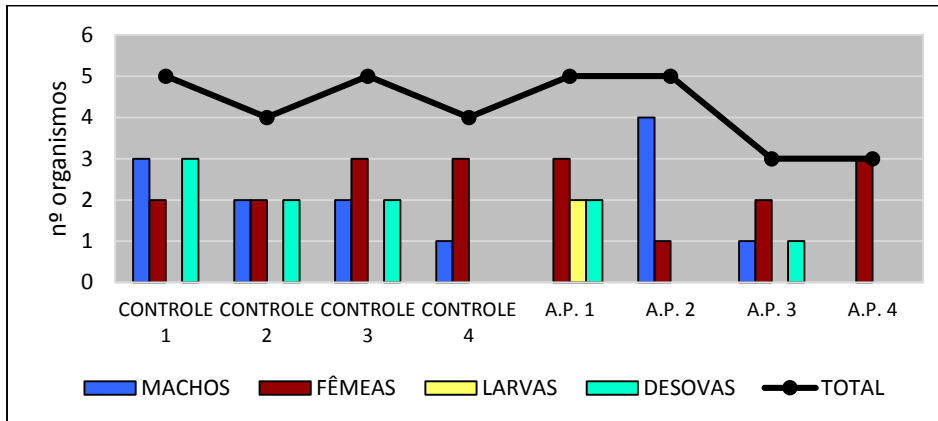
**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 18:** Emergência de machos e fêmeas, larvas e desovas de *Chironomus sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água deionizada) e grupos expostos ao efluente do Biofiltro.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 19:** Emergência de machos e fêmeas, larvas e desovas de *Chironomus sancticaroli* demonstrando os grupos controle (água deionizada) e grupos expostos à água do poço.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

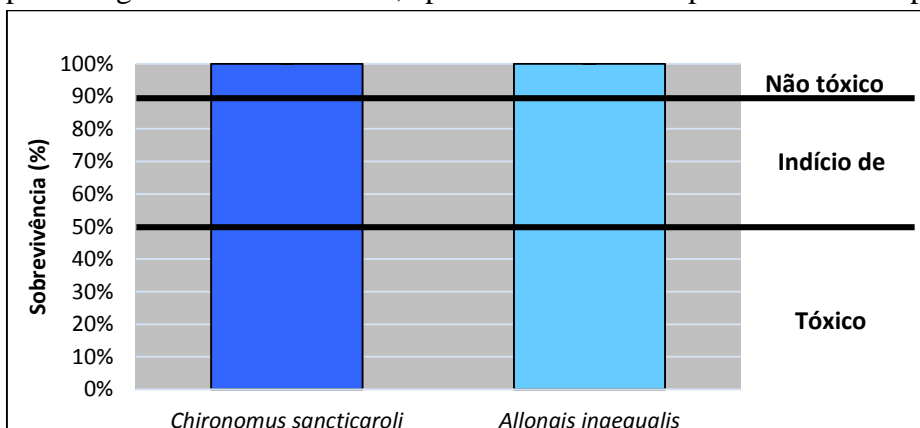
Apesar da mortalidade de algumas larvas, este teste mostrou que grande parte dos organismos apresentaram um ciclo de vida normal, além da incidência de desovas nos testes.

A proporção de fêmeas foi maior nos dois testes, levando a diferenças significativas em relação a emergência de machos e fêmeas.

### 5.8. Bioensaios de toxicidade aguda e crônico em caixas sifonadas utilizando *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis* como organismos-teste

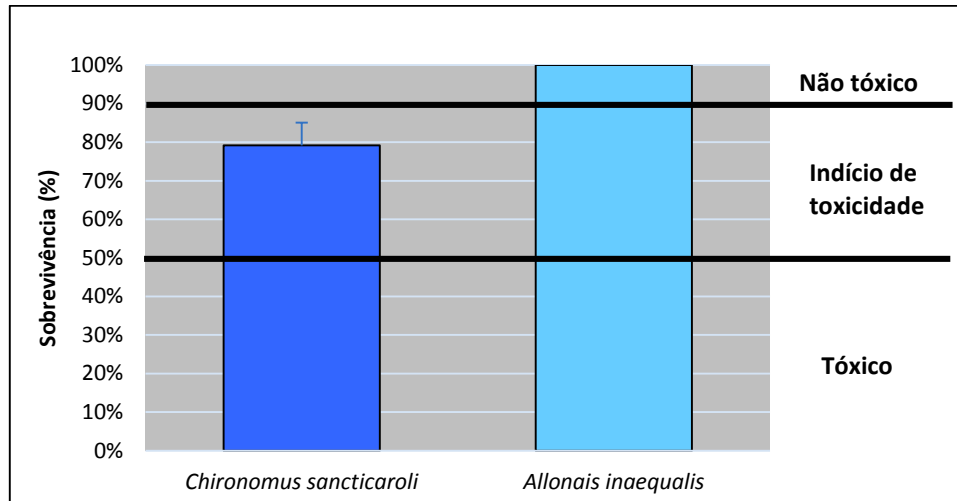
O resultado dos testes de toxicidade agudos e crônicos utilizando os organismos-teste *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*, em caixas sifonadas estão expressos nas Figuras 20 e 21.

**Figura 20:** Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade aguda em caixas sifonadas, utilizando *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis*. O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 21:** Valores de sobrevivência dos organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônica em caixas sifonadas, utilizando *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis*. O gráfico expressa a porcentagem de sobrevivência, apresentando seus respectivos desvios-padrões.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Ao observarmos a figura 21, podemos afirmar que houve 100% de sobrevivência das espécies *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*. Pode-se dizer que esses organismos não apresentaram toxicidade às caixas sifonadas quando expostos a um curto período de tempo, que compõem parte do corpo do Biofiltro. Porém o bioensaio de toxicidade crônica (Figura 22) apresentou um indício de toxicidade para a espécie *C. sancticaroli*,

Neste ensaio, ocorreu mortalidade de 21% dos organismos de *C. sancticaroli*. De um total de 24 organismos, houve sobrevivência de 19 organismos, indicando um indício de toxicidade, segundo a classificação de Barbosa (2000) e Dornfeld (2002).

### 5.9. Criações em caixas sifonadas

Nas caixas sifonadas com a criação de *Chironomus sancticaroli*, obteve-se uma média de 196 larvas, 45 adultos (sendo 21 fêmeas e 24 machos) e 13 desovas, sendo esta a 3ª geração (Figuras 22 e 23).

Já a espécie *Allonais inaequalis* apresentou uma média de 1504 organismos (Figuras 24 e 25). Esses resultados apontam que não houve toxicidade a partir das caixas sifonadas, pois os organismos além de sobreviverem, ainda se reproduziram nas caixas, mostrando ter se adaptado muito bem ao ambiente no qual foi introduzido.

**Figura 22:** Criações de *Chironomus sancticaroli* em caixas sifonadas.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 23:** Vista das larvas de *Chironomus sancticaroli* nas caixas sifonadas após 3 meses de criação para avaliar se houve toxicidade das caixas.



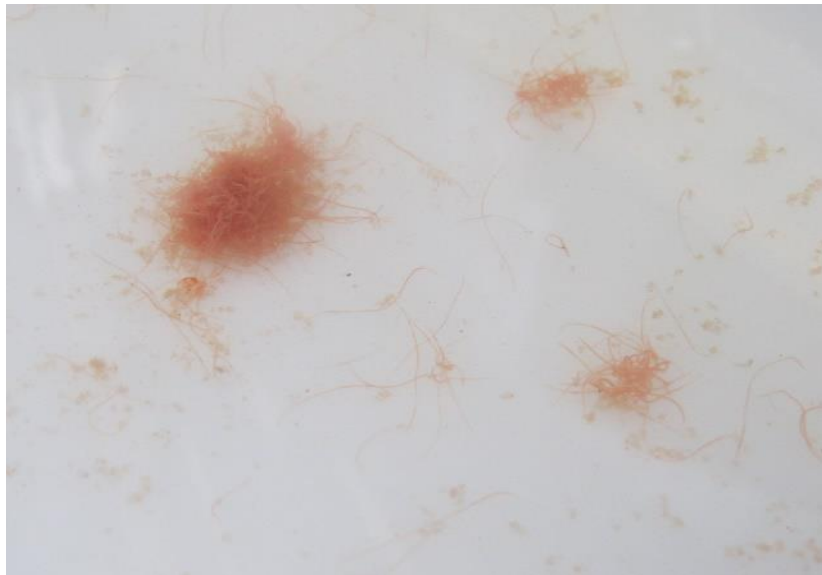
**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 24:** Criações de *Allonais inaequalis* em caixas sifonadas.



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 25:** Aglomerações de *Allonais inaequalis* nas caixas sifonadas após 3 meses de criação com intuito de avaliar a toxicidade do mesmo.

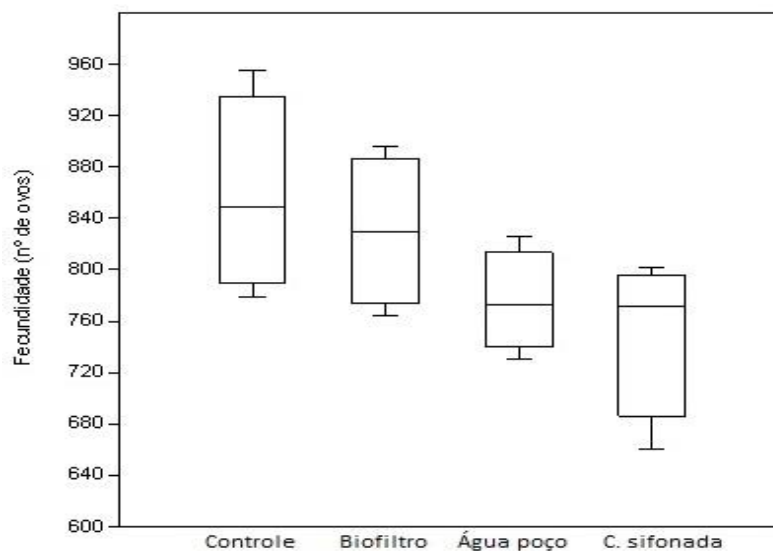


**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 5.10. Fecundidade potencial

Para a avaliação da fecundidade potencial, foram mensuradas as asas das fêmeas de *C. sancticaroli* provenientes de bioensaios mais longos (16 dias), expostas ao efluente do Biofiltro (Figura 18), água do poço (Figura 19) e criações em caixas sifonadas (Figura 22). Foram medidas 16 asas, incluindo as do controle (Figura 26).

**Figura 26:** Fecundidade potencial de *Chironomus sancticaroli* calculadas a partir do comprimento da asa das fêmeas expostas ao efluente do Biofiltro, à água do poço e à caixa sifonada.



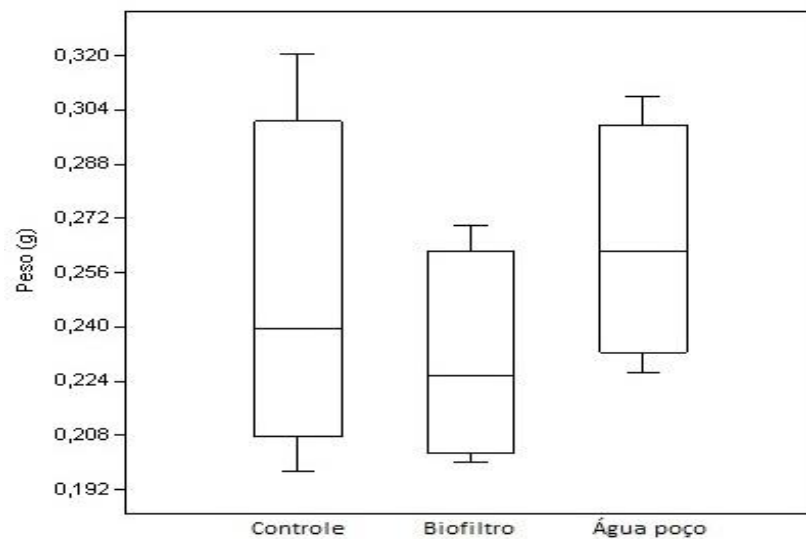
**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Os resultados para fecundidade potencial das fêmeas de *C. sancticaroli* indicaram que os organismos testados a partir da água do poço e caixa sifonada apresentaram uma fecundidade potencial menor quando comparadas ao controle, sendo em torno de 770 o n° de ovos, ou seja, que o efluente do BFA, a água do poço e Caixa sifonada não afetam o número de ovos possíveis de serem produzidos pelas fêmeas, não ocorrendo diferença significativa entre os testes e o controle ( $p=0,09732$ ). Esses dados foram corroborados pelo teste ANOVA, com  $p \leq 0,05$  com teste *aposteriori* de Tukey.

### 5.11. Peso e comprimento de *Danio rerio*

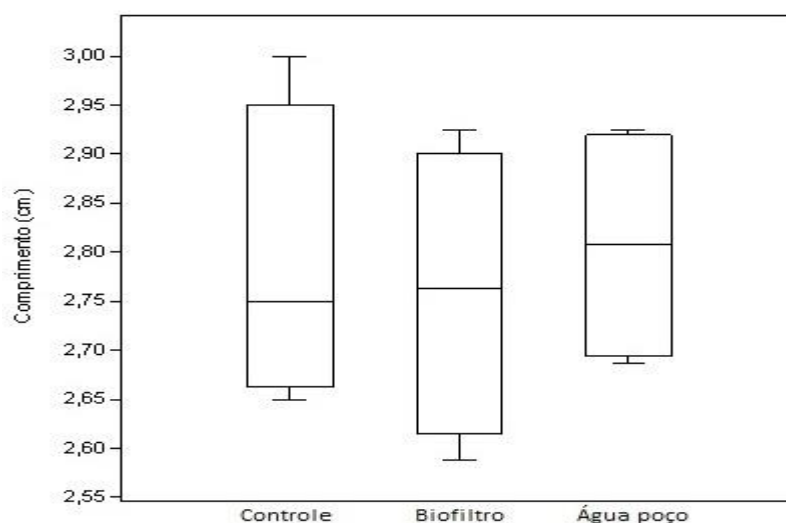
Foram medidos o peso e comprimento de *D. rerio* após o bioensaio de toxicidade aguda (Figuras 13 e 14), expostas ao efluente do Biofiltro, água do poço e caixa sifonada. Os resultados apontam que não há diferenças significativas no peso de *D. rerio*, quando comparadas ao controle ( $p=0,5037$ ) (Figura 27). Quanto ao comprimento do corpo, os resultados também mostram que não há diferenças significativas em relação ao controle, com  $p=0,895$  (Figura 28). Os resultados foram calculados a partir do teste ANOVA one-way, com  $p \leq 0,05$ , com teste *aposteriori* de Tukey.

**Figura 27:** Peso médio de *Danio rerio*. Dados calculados a partir do Teste ANOVA one-way, com  $p \leq 0,05$ .



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Figura 28:** Comprimento médio de *Danio rerio*. Dados calculados a partir do Teste ANOVA one-way, com  $p \leq 0,05$ .



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Testes de sensibilidade

Os resultados encontrados neste trabalho foram distintos de outros autores. A faixa de sensibilidade encontrada no presente trabalho para *Chironomus sancticaroli*, ao cloreto de potássio (KCl) foi de 5,03 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 4,02 e 6,04 g.L<sup>-1</sup>. A faixa de sensibilidade para *Chironomus sancticaroli* encontrado por Fonseca (1997) foi de 2,6 a 6,4 g.L<sup>-1</sup>. Por outro lado, o valor médio da CL50; 96h obtido por Dornfeld (2002) para *C. sancticaroli*, foi de 7,55 g.L<sup>-1</sup>, com limites superiores e inferiores de 3,39 e 6,38 g.L<sup>-1</sup>. Já para Pusceddu (2009), o valor médio da CL50;96 encontrado para *C. sancticaroli* foi de 7,55 g.L<sup>-1</sup>, um valor um pouco acima do limite encontrado por Fonseca (1997). Para Richard (2013), a média da CL50; 96h para o mesmo organismo-teste foi de 4,42 g.L<sup>-1</sup> de KCl, com limites superiores e inferiores de 2,83 e 6,09 g.L<sup>-1</sup>. Em um trabalho realizado por Santos (2007), o valor médio da CL50;96h encontrado para *C. sancticaroli* foi de 5,84 g.L<sup>-1</sup>. Campagna (2010) encontrou uma média de 3,38 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 2,05 e 4,70 g.L<sup>-1</sup>. Portanto, os dados do presente trabalho corroboram com a faixa de sensibilidade para *Chironomus sancticaroli* encontrado por Fonseca (1997) e pelos demais autores citados, com



exceção daqueles em que os resultados apresentados foram maiores ou menores que os limites apresentados por vários autores.

O resultado da CL50; 96h, realizado por Corbi; Rossi e Correa (2015) para *Allonais inaequalis* ao cloreto de potássio (KCl) foi de 3,50 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 3,55 e 5,36 g.L<sup>-1</sup>. No teste de sensibilidade com *A. inaequalis*, a faixa de sensibilidade ao KCl encontrada por Almeida (2007) para a espécie *Branchiura sowerbyi* foi de 0,364 (0,177 - 0,551) g.L<sup>-1</sup>. Em um trabalho realizado por Nascimento (2014) na qual ele avaliou a sensibilidade a partir de teste de toxicidade aguda de Arsênio e Zinco presentes na água e sedimento, para duas espécies de Oligochaeta, *Tubifex tubifex* e *Branchiura sowerbyi*, o mesmo observou que a espécie *B. sowerbyi* apresentou uma sensibilidade maior quando exposto aos compostos testados. Enquanto *T. tubifex* apresentou uma CL50 de 297 μmol.As<sup>-1</sup> e 14,89 μmol.Zn<sup>-1</sup>, a espécie *B. sowerbyi* obteve um valor de 1577,43 μmol.As<sup>-1</sup> e 132,51 μmol.Zn<sup>-1</sup> podendo então, ser incluída em testes de toxicidade, pois a sua sensibilidade aumenta sua importância na utilização em monitoramentos ambientais. Em relação a *B. sowerbyi*, a espécie *A. inaequalis* é menos sensível, quando comparados os resultados dos testes de sensibilidade. Porém, vale lembrar que a substância utilizada para os testes não foram os mesmos. Isso pode interferir nos resultados.

O resultado da CL50; (48h) encontrado neste trabalho para *Danio rerio* ao cloreto de potássio (KCl) foi de 0,579 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 0,54 e 0,62 g.L<sup>-1</sup>. Ribeiro (2008) realizou um teste de sensibilidade para *D. rerio* com a substância de referência KCl e obteve em seu resultado uma CL50; 48h de 0,962 g.L<sup>-1</sup>. Mendes (2011), utilizando a mesma substância de referência para *D. rerio*, apresentou uma CL50; 48h de 0,785 g.L<sup>-1</sup>, com limites inferior e superior de 0,584 e 0,987 g.L<sup>-1</sup>. No trabalho de Leonel (2012), verificou-se que a CL50 média de *D. rerio* ao cloreto de potássio foi de 0,790g.L<sup>-1</sup>. De acordo com a ABNT (2011), o limite superior e inferior da faixa de sensibilidade da espécie *D. rerio* à substância de referência KCl são de 0,986 e 0,593 g.L<sup>-1</sup> resultado para o teste de sensibilidade de *D. rerio* encontra-se abaixo da faixa, porém, Corbi, Gorni e Correa (2015) ressaltam que o teste é aceitável se a mortalidade dos controles não ultrapassar 10%.

## 6.2. Testes de toxicidade aguda e crônica

Em relação aos parâmetros físico-químicos das soluções-teste aferidos no início do bioensaio, não houve diferenças significativas em comparação ao controle para o bioensaio de toxicidade para os organismos *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*.

Nos bioensaios de toxicidade aguda, o efluente do BFA não apresentou toxicidade para nenhum dos organismos testados (*C. sancticaroli*, *A. inaequalis* e *Danio rerio*). Houve uma mortalidade no controle da espécie *C. sancticaroli*, porém, não foi significativa, visto que o índice de sobrevivência foi de aproximadamente 96%, não apresentando toxicidade, de acordo com a classificação proposta por Barbosa (2000) e Dornfeld (2002). Nos bioensaios de toxicidade aguda utilizando água do poço como solução-teste, houve 100% de sobrevivência para as três espécies testadas. No bioensaio de toxicidade crônica com água do BFA, o Controle da espécie *C. sancticaroli* também apresentou uma sobrevivência de  $92\% \pm 0,09$ , enquanto que *A. inaequalis* apresentou 100% de sobrevivência. Já nos testes cuja solução-teste foi água do poço, houve  $92\% \pm 0,09$  de sobrevivência do teste controle para a espécie *C. sancticaroli* e  $96\% \pm 0,08$  de sobrevivência para a mesma espécie. Segundo Dornfeld (2006), a utilização de testes de toxicidade crônica, é de grande importância, visto que os resultados apresentam os efeitos subletais dos contaminantes para os organismos quando sujeitos a um tempo de exposição maior, sendo uma importante análise de efeitos a saúde, tanto ambiental quanto humana. Segundo Dornfeld (2002), há diferença de sensibilidade entre os ínstars das larvas de *Chironomus tentans*, sendo as larvas de I ínstar mais sensíveis que as demais. Isso pode explicar a mortalidade de alguns indivíduos no bioensaio de toxicidade crônica com *C. sancticaroli* e menor índice de mortalidade em testes agudos. Morais (2012) ao utilizar a espécie *C. sancticaroli* na exposição aguda e crônica ao composto fenantreno, observou que larvas de I e II instar são mais sensíveis que as larvas de terceiro e quarto ínstar que apresentaram menor taxa de mortalidade. Novelli (2010) menciona que há também a questão da falta de respostas semelhantes em réplicas de um mesmo tratamento, pois quando expostas a solução-teste, podem apresentar variações internas distintas umas das outras. Neste caso, a dificuldade em compreender algumas respostas é maior. A sobrevivência de *A. inaequalis* foi de 100% quando testada com água do poço. Um ponto positivo que ocorreu durante os bioensaios de toxicidade crônica, foi a reprodução da espécie *A. inaequalis*, que em 10 dias (duração do teste crônico), o número de organismos quadruplicou, tanto com o efluente do BFA, como com a água do poço.

### 6.3. Emergência de adultos

Na emergência de adultos, durante os testes mais longos, pode-se verificar uma incidência maior de fêmeas. De acordo com Richard (2013) as fêmeas recém-emergidas ainda não apresentam ovários maduros, e por isso, não estão preparadas para se reproduzir, ou seja, elas apresentam folículos (futuros óvulos) imaturos e que só vão ser tornar maduros, trinta e três horas após a emergência. Segundo Trivinho-Strixino e Strixino (1989), o amadurecimento dos ovócitos ocorre trinta e três horas após a emergência. Ainda, Richard (2010) relata que em machos de *C. sancticaroli* não ocorre este tempo de maturação, pois a espermatogênese (processo de formação de gametas masculinos) está completa quando o mesmo emerge. Em vista disso, podemos concluir que a emergência de fêmeas foi maior devido à preparação da maturação sexual, visto que em alguns testes ainda havia organismos que ainda se encontravam no IV instar da fase larval. Além disso, no grupo de insetos não há parceiro fixo, podendo várias fêmeas se acasalar com um mesmo macho. Isso é vantajoso do ponto de vista reprodutivo, pois há um aumento de desovas e conseqüentemente, de organismos, caso este que não ocorreria se houvesse um número maior de machos em relação a fêmeas.

Em relação ao número total de organismos sobreviventes, houve mortalidade de alguns indivíduos, podendo apontar para um indício de toxicidade. Ao observar o teste em que se utilizou efluente do BFA, a sobrevivência de *C. sancticaroli* foi em torno de 100%, 100%, 83% e 83% para o controle, e 83%, 66%, 66% e 66% para organismos expostos ao efluente do BFA. Já nos testes com água do poço, os resultados foram 83%, 0,66%, 83% e 66% para o controle, e 83%, 83%, 50% e 50% de sobrevivência para organismos expostos a água do poço. Porém, vale ressaltar que as larvas de I instar são mais sensíveis, segundo Dornfeld (2002).

### 6.4. Bioensaios de toxicidade aguda e crônica em caixas sifonadas e criações em caixas sifonadas

Nos bioensaios de toxicidade aguda, houve 100% de sobrevivência dos dois organismos testados (*C. sancticaroli* e *A. inaequalis*). Já nos bioensaios de toxicidade crônica, a espécie *C. sancticaroli* apresentou uma taxa de sobrevivência de  $79\% \pm 0,06$ , representando um indício de toxicidade, enquanto que *A. inaequalis* apresentou 100% de sobrevivência. Essa

mortalidade pode ter ocorrido devido a sensibilidade de larvas de I instar, já que nos bioensaios de toxicidade aguda, não houve mortalidade de *C. sancticaroli*. Porém, também pode estar associado a algum tipo de toxicidade presente na caixa sifonada.

Em relação as criações em caixas sifonadas, as duas espécies (*A. inaequalis* e *C. sancticaroli*) responderam bem em 3 meses de exposição, pois chegaram a fase adulta, apresentaram um ciclo de vida e se reproduziram, dando origem a outras gerações. De acordo com Magalhães e Ferrão Filho (2008), quanto maior a faixa de tolerância de um organismo a diferentes condições, menor será o nível exigido pelo organismo para sobreviver, crescer e reproduzir-se. Na retirada dos testes realizados em duplicata, foram contabilizados organismos das caixas sifonadas. Na criação de *C. sancticaroli*, obteve-se uma média de 196 larvas, 45 adultos (sendo 21 fêmeas e 24 machos) e 13 desovas, sendo esta a 3ª geração. Na espécie *A. inaequalis*, a média foi de 1504 organismos. Esses resultados apontam que as caixas sifonadas, material que compõe o corpo do filtro, não apresentou toxicidade aos organismos testados, pois os organismos além de sobreviverem, ainda se reproduziram nas caixas, mostrando ter se adaptado muito bem ao ambiente no qual foram introduzidos. Segundo Magalhães e Ferrão-Filho (2008), quando uma determinada substância é tóxica para uma ou mais espécies, representado a partir de testes, é possível esta mesma substância ser tóxica para componentes maiores e talvez mais importantes de um ecossistema, como o ser humano, por exemplo. Ainda, segundo o mesmo autor, a ecotoxicologia tem como propósito a relação do custo-benefício no quesito de formação de bens de consumo, em que um dos principais focos é a diminuição de custos na produção e seus efeitos a partir da poluição química para a fabricação de determinado produto, principalmente em seres humanos. Vale destacar que o teste em caixas sifonadas é inédito, criado no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Universidade de São Paulo (USP). Por esta questão, não há referências para comparação dos resultados.

### **6.5. Fecundidade potencial**

Na questão de fecundidade potencial, os organismos expostos à água do poço e caixa sifonada apresentaram um índice menor no nº de ovos (em torno de 770) em comparação com o controle e efluente do BFA (aproximadamente 850). O número de ovos relatado por Fonseca e Rocha (2004) para *C. sancticaroli* é de 500 a 600 ovos. Entretanto, Strixino-Strixino (1982) constatou um número maior para *C. sancticaroli*, entre 500 e 1045, com valor médio de 744,9 ovos, sob uma temperatura de 24°C. Em relação a temperatura aferida no

presente trabalho, estas se enquadram no limite com base no trabalho de Strixino e Trivinho-Strixino (1985), em que em épocas quentes (temperaturas entre 21,0 e 24,0°C) o desenvolvimento da espécie *C. sancticaroli* ocorre em cerca de 15 a 17 dias. Segundo Costa et al. (2008), testes longos nos permitem analisar além de efeitos letais, avaliar efeitos adversos durante exposições mais longas, que podem durar o ciclo de vida inteiro da espécie, como reprodução, fecundidade, mutações, entre outros. Em um trabalho realizado por Moraes (2014) em que foram analisados os efeitos biológicos e genotóxicos de *C. sancticaroli* causados pela exposição ao fenantreno, a mesma observou que a fecundidade potencial não foi alterada em exposição ao fenantreno, com  $p=0,167$  para  $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $p=0,295$  para  $0,83 \text{ mg.L}^{-1}$ , porém, é gonotóxico para as larvas de *C. sancticaroli*, provocando alterações em nível populacional. Já o trabalho realizado por Rebechi (2012), que expôs organismos da espécie *C. sancticaroli* ao Malathion, verificou-se que a fecundidade potencial das fêmeas sofreu uma redução de 13% exposto a concentração de  $0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ , enquanto que na concentração de  $0,25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  não houve alterações significativas, não permitindo uma conclusão clara de como esse produto afeta a fecundidade da espécie. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que não houve interferência do efluente do Biofiltro, da água do poço e nem da caixa sifonada, não afetando o número de ovos que podem ser produzidos pelas fêmeas de *C. sancticaroli*, mesmo havendo uma diferença entre o número de ovos entre água do poço e caixa sifonada com o controle e efluente do BFA, pois estes resultados encontram-se dentro do limite encontrado por Strixino-Strixino (1982).

#### 6.6. Crescimento de *Danio rerio*

Não houve diferenças significativas do peso e comprimento da espécie *D. rerio* em relação ao controle. Rodrigues (2007) ao expor o organismo *D. rerio* a amostras de sedimento coletados em culturas de batatas e morangos, tratados a partir do uso de agrotóxicos, verificou que houve diferenças significativas no peso e comprimento de *D. rerio*, quando comparados ao controle, ocorrendo uma diferença significativa maior no comprimento do organismo. Para Rubinger (2009), o bioensaio de toxicidade geralmente são analisados a intensidade do efeito sobre o organismo, a intensidade do efeito produzido, o crescimento e a reprodução do organismos-teste. No presente estudo, os resultados calculados a partir do Teste ANOVA com  $p \leq 0,05$  para o peso foi de  $p=0,5037$ , e para o comprimento,  $p=0,895$ , mostrando que não ocorreu diferenças significativas em comparação com o controle.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir de bioensaios toxicológicos, apontam que o Biofiltro apresenta um índice baixo de toxicidade em relação as três espécies testadas. Além de um índice alto de sobrevivência, a espécie *C. sancticaroli* concluiu seu ciclo em testes mais longos (16 dias), além de reproduzir-se. A espécie *Allonais inaequalis* apresentou uma ótima reprodução em testes crônicos e na criação em caixas sifonadas. Isso significa que estes organismos se adaptaram bem as condições dos testes.

Porém, é importante destacar que estes resultados indicam apenas dados toxicológicos para fauna em relação as soluções testadas, não sendo possível responder a questões de potabilidade da água tratada pelo Biofiltro.

Para Costa, et al. (2008), a questão de que uma determinada substância não apresente efeitos tóxicos sobre os organismos em testes toxicológicos, não significa que esta substância não seja tóxica para os mesmos.

É importante refinar os testes para que se tenha resultados mais exatos quanto a toxicidade do Biofiltro, pois é um utensílio que está sendo aprimorado para atender comunidades isoladas que desprovem de água de boa qualidade. Sendo assim, é recomendável a realização de maiores diversidades de testes possíveis.

Uma sugestão para resultados mais precisos são análises de genotoxicidade, que abrange duas áreas de estudo, a genética e a toxicologia que estão relacionadas a interação de agentes genotóxicos com o material genético do organismo, causando alterações na função e estrutura do DNA, como perdas de genes e, ainda, podendo ser transmitidas a gerações futuras.

## REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Norma técnica NBR 15088, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – **Método de ensaio com peixes**. Rio de Janeiro, 2011.

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). Universidade de São Paulo, 2007.

ARAÚJO, R. S.; BASTOS-GARCIA, M. V.; GARCIA, T. B. Toxicidade aguda do herbicida glifosato (Roundup) para *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), em condições tropicais. In: **III Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**, 2008.

BALDAN, L. T. **Macroinvertebrados em cavas adjacentes ao Rio Iguaçu e uso de *Chiironomus xanthus* Rempel, 1939 como potencial bioindicador ambiental**. 2012. 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**. 2000. 199 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2000.

BEATRICI, A. C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (Crustácea, Cladocera) submetidas a diferentes tipos de dietas e meios de cultivo**. 2004. 46f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

BOGNI, A.; SABOGAL PAZ, L. P. Uso de Coagulante Natural e de Desinfetante Alternativo para o Tratamento de Águas em Comunidades Isoladas. **Relatório Parcial de Iniciação Científica**. FAPESP. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 2005. **Resolução N°357, de 16 março de 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**. Diário Oficial da União, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 2011. **Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução N° 357, de 17 de março de**

**2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.** Diário Oficial da União, Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, 2011.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** 2006. 145p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

BRITO, L. T.; SRINIVASAN, V. S.; SILVA, A. S.; GHEYI, H. R.; GALVÃO, C. O.; HERMES, L. C. Influência das atividades antrópicas na qualidade das águas da bacia hidrográfica do Rio Salitre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v.9, n.4, p.596-602, 2005.

CALIXTO, K. G.; SABOGAL PAZ, L. P. Aceleração do Amadurecimento de Biofiltros em Areia. **Relatório Final de Iniciação Científica.** FAPESP. 2015.

CALLISTO, M.; MORENO, P.; GONÇALVES J. F.; LEAL, J. J. F.; ESTEVES, F. A. Diversity and biomass of Chironomidae (Diptera) larvae in na impacted coastal lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology.** v.62, n.2, p.77-84, 2002.

CALLISTO, M.; MORETTI, M.; GOULART, M. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos.** v.6, n.1, p.71-78, 2001.

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

CARVALHO, T.K; SABOGAL PAZ, L. P. Filtração Lenta em Areia como Alternativa Doméstica de Tratamento da Água – Eficiência do Método de Operação por Batelada. Relatório Final. **Pesquisa de Iniciação Científica. PIBIC.** EESC/USP. São Carlos/SP. 2013.

CAWST – CENTRE FOR AFFORDABLE WATER AND SANITATION TECHNOLOGY. **Biosand Filter Manual. Design, Construction, Installation, Operation and Maintenance. CAWST Training Manual.** Canadá, 2010. Disponível em: <<http://www.cawst.org/>>. Acessado em 12 de dezembro de 2014.



CORBI, J. J., FROEHLICH, C. G., TRIVINHO-STRIXINO, S., SANTOS, A. Bioaccumulation of metals in aquatic insects of streams located in areas with sugar cane cultivation. **Química Nova**. v.33, n.3, p.644-648. 2010.

CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v.10, n.1, p.7-11, 2015.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPÍNDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes Aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

CVE – CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta\\_mdda.htm#2014](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_mdda.htm#2014)>. Acessado em 19 de julho de 2015.

DANELUZ, D.; TESSARO, D. Padrão físico-químico e microbiológico da água de nascentes e poços rasos de propriedades rurais da região sudoeste do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.82 p. 1-5, 2015.

DORNFELD, C. B. **Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP)**. 2002. 27p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

DORNFELD, C.B. **Utilização de *Chironomus* sp. (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. 2006. 172p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.

DUKE, W. F., NORDIN, R., MAZUMDER. Comparative Analysis of the Filtron and Biosand Water Filters. **Victoria, British Columbia: University of Victoria, Restoration of Natural Systems Program**, 2006.

EARWAKER, P. **Evaluation of Household BioSand Filters in Ethiopia**. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Hídricos). Institute of Water and Environment, Cranfield University, Silsoe, United Kingdom. 2006.

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

FONSECA, A.L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 1997. 217p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**. v.16, n.2, p.153-161, 2004.

GIATTI, L. L. Reflexões sobre água de abastecimento e saúde pública: um estudo de caso na Amazônia brasileira. **Saúde e sociedade**. v.16, n.1, p.134-144, 2007.

GORNI, G.; PEIRÓ, D. F.; SANCHES, N. Aquatic Oligochaeta (Annelida: Clitellata) from State of São Paulo, Brazil: Diversity and Occurrence review. **Biota Neotropica** v.15, n.1, e20140063, 2015.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**. v.2, n.1, p.153-164, 2003.

GUSMÃO, G. A. ***Chironomus Meigen, 1803 (Diptera: Chironomidae) na cidade de Manaus, AM, Brasil: taxonomia e biologia***. 85p. 2012. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – 2008**. Rio de Janeiro. Brasil. 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1364&z=p&o=31&i=P>> Acessado em 10 de junho de 2015).

LEONEL, L. F. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para a avaliação dos ecossistemas aquáticos na bacia hidrográfica dos rios Itaqueri/Lobo (Itirapina/Brotas, SP)**. Monografia (Graduação). 2012, 10p. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LUCIANO, M. M. **Avaliação da toxicidade da água do reservatório da Barragem do Rio São Bento, Siderópolis, Santa Catarina, utilizando como bioindicador *Daphnia magna***. 35p. 2008. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2008

MAGALHAES, E. V.; SABOGAL PAZ, L. P. Filtração Lenta Domiciliar como Alternativa de Tratamento de Água para Comunidades Isoladas do Brasil - Desafios na Construção. In: **21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP**. São Carlos/SP. 2013.

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

MANZ, D. H. **The Household Concrete Design: BSF Technology. 2007**. Disponível em: <http://www.manswaterinfo.ca/pubs.htm> Acessado em 03/01/2015.

MARTINS, J.G. **Efeitos tóxicos de biocidas (hipoclorito de sódio e bionopol) no crustáceo cladóceros *Daphnia magna***. 2013. 69p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Porto, Portugal. 2013.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Ed.) **Limnologia Fluvial: um Estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Paulo: São Carlos, Rima Editora. Cap. 9, p. 149-180, 2003

MENDES, L. B. **Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec 18CE em Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de estudos experimentais**. 123p. 2011. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

MOLINA, M. F.; RONCACIO, D. J.; RIVERA, S.; MATIZ, M. I. **Mejoramiento del desempeño de um filtro em punto de uso utilizado como tecnologia de tratamento de agua em las escuelas rurales del município de Apulo, Cundinamarca**, 2011.

MORAIS, E. B. **Indicadores microbiológicos, metais e índice de qualidade da água (IQA) associados ao uso e ocupação da terra para avaliação da qualidade ambiental da microbacia do Rio Cabeça, na bacia do Rio Corumbataí-SP**. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 157p. 2010.

MORAIS, G. S. **Efeitos genotóxicos e biológicos em *Chironomus sancticaroli* (Strixino & Strixino, 1981) causado pela exposição ao fenantreno**. 75p. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 2014.

NASCIMENTO, H. L. S. **Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos.** 2014, 114p. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

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

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo.** 2010, 175p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OLIVEIRA, V. M. F.; FRANCO JÚNIOR, M. R. Melhoria das condições da água através do uso de filtro de areia modificado com biomassa. In: **XIX Jornada em Engenharia Química.** Uberlândia, Minas Gerais, 2014.

RAZZOLINI, M. T. P.; GUNTHER, W. M. R. Impacto na saúde das deficiências de acesso a água. **Saúde e sociedade.** São Paulo, v.17, n.1, p.21-32, 2008.

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

RIBEIRO, E. N. **Avaliação da sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade nos efluentes das indústrias de explosivos: seleção de uma bateria de testes na busca dos “organismos ideais”.** 2008. 165p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

RICHARD, V. S. **Descrição histológica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) e efeitos histopatológicos e biológicos após a exposição ao fenantreno.** Dissertação (Mestrado). 2013, 114p. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

RIOS, K. C. R. C. **Avaliação ecotoxicológica do sedimento a montante e a jusante da barragem do Ribeirão João Leite – Goiânia/GO.** 2013, 150p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

RODUIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes,**

**Cyprinidae**). 2007, 138p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

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

RUBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. 2009. 89p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. R. Sensitivity of four test organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.2, n.3, p.229-236, 2007.

SCALIZE, P. S.; BARROS, E. F. S.; SOARES, L. A.; HORA, K. E. R.; FERREIRA, N. C.; BAUMANN, L. R. F. Avaliação da qualidade da água para abastecimento no assentamento de reforma agrária Canudos, Estado de Goiás. **Revista Ambiente & Água**. Taubaté, v.9, n.4, 2014.

SILVA, B. M.; RAVANELI, M. A. C.; PASCHOALATO, C. F. P. R. Toxicidade aguda dos herbicidas Diuron e Hexazinona à *Danio rerio*. **Revista ecotoxicologia e meio ambiente**. Curitiba, v.20, 2010.

SHUBO, T.; ROQUE, O. C. C.; FERREIRA, A. P. Avaliação da sustentabilidade da água urbana: indicadores sanitários e económicos. In: **Saneamento Ambiental: Ética e Responsabilidade Social**. ABES, p. 1-10, 2003

SHUBO, T. **Sustentabilidade do abastecimento e da qualidade da água potável urbana**. 2003. 125p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003.

STRIXINO, G. TRIVINHO-STRIXINO, S. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. São Paulo, v.3, n.4, p.177-180, 1985.

STRIXINO, G.; TRIVINHO-STRIXINO, S. **Insetos aquáticos: guia de identificação**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, Depto. de Ciências Biológicas, 1982.

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

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancticaroli* sp. n. (Diptera: Chironomidae)**. 157p. 1980. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1981.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Insetos dípteros: quironomídeos. In: **Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX** (C.A. Joly & C.E.M. Bicudo org.). FAPESP, São Paulo, v.4, 176p. 1999.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo: **Guia de identificação e diagnose de gêneros**. São Carlos. PPG-ERN/UFSCar, 1995. 227p.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Nova espécie do gênero *Chironomus* MEIGEN do sul do Brasil (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v.25, n.4, p.333-340, 1981.

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

TUCCI, C. E. M. Águas urbanas. **Estudos Avançados**. v.22, n.63, 2008.

UMBUZEIRO, G. A.; KUMMROW, F.; REI, F. F. C. Toxicologia, padrões de qualidade de água e a legislação. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**. v.5, n.1, 2010.

VIVEIROS, W. ***Chironomus sancticaroli* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento**. 2012, 91p. Dissertação (Mestrado). Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

YUNG, Kathleen. Biosand filtration: Application in the developing world. **Civil Engineering (CE)**, v. 401, 2003.

# APÊNDICES

**APÊNDICE A:** Dados brutos obtidos no teste de toxicidade aguda dos organismos-teste *Chironomus sanctlicaroli*, *Allonais inaequalis* e *Danio rerio* às soluções-teste efluente do Biofiltro e água do poço.

**Tabela 1:** Número de organismos vivos de *Chironomus sanctlicaroli* em bioensaios de toxicidade aguda com efluente do BFA.

Teste agudo <i>C. sanctlicaroli</i> - Efluente do Biofiltro		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	5	83%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	6	100%
BFA 1	6	100%
BFA 2	6	100%
BFA 3	6	100%
BFA 4	6	100%

**Tabela 2:** Número de organismos vivos de *Allonais inaequalis* em bioensaios de toxicidade aguda com efluente do BFA.

Teste agudo <i>A. inaequalis</i> - Efluente do Biofiltro		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	6	100%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	6	100%
BFA 1	6	100%
BFA 2	6	100%
BFA 3	6	100%
BFA 4	6	100%



**Figura 3:** Número de organismos vivos de *Chironomus sancticaroli* em bioensaios de toxicidade aguda com água do poço.

Teste agudo <i>C. sancticaroli</i> - Água do poço		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	6	100%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	6	100%
AP 1	6	100%
AP 2	6	100%
AP 3	6	100%
AP 4	6	100%

**Figura 4:** Número de organismos vivos de *Allonais inaequalis* em bioensaios de toxicidade aguda com água do poço.

Teste agudo <i>A. inaequalis</i> - Água do poço		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	6	100%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	6	100%
AP 1	6	100%
AP 2	6	100%
AP 3	6	100%
AP 4	6	100%

**Figura 5:** Número de organismos vivos de *Danio rerio* em bioensaios de toxicidade aguda com efluente do Biofiltro e água do poço (1° teste).

1° Teste agudo <i>Danio rerio</i>		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	2	100%
Controle 2	2	100%
Controle 3	2	100%
Controle 4	2	100%
BFA 1	2	100%
BFA 2	2	100%
BFA 3	2	100%
BFA 4	2	100%
AP 1	2	100%
AP 2	2	100%
AP 3	2	100%
AP 4	2	100%

**Figura 6:** Número de organismos vivos de *Danio rerio* em bioensaios de toxicidade aguda com efluente do Biofiltro e água do poço (2° teste).

2° Teste agudo <i>Danio rerio</i>		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	2	100%
Controle 2	2	100%
Controle 3	2	100%
Controle 4	2	100%
BFA 1	2	100%
BFA 2	2	100%
BFA 3	2	100%
BFA 4	2	100%
AP 1	2	100%
AP 2	2	100%
AP 3	2	100%
AP 4	2	100%

**APÊNDICE B:** Dados brutos obtidos no teste de toxicidade crônica dos organismos-teste *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis* às soluções-teste efluente do Biofiltro e água do poço.

**Figura 7:** Número de organismos vivos de *Chironomus sancticaroli* em bioensaios de toxicidade crônica com efluente do Biofiltro.

Teste crônico <i>C. sancticaroli</i> - Efluente do Biofiltro		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	5	83%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	5	83%
BFA 1	6	100%
BFA 2	6	100%
BFA 3	6	100%
BFA 4	6	100%

**Figura 8:** Número de organismos vivos de *Allonais inaequalis* em bioensaios de toxicidade crônica com efluente do Biofiltro.

Teste crônico <i>A. inaequalis</i> - Efluente do Biofiltro		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	6	100%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	6	100%
BFA 1	6	100%
BFA 2	6	100%
BFA 3	6	100%
BFA 4	6	100%

**Figura 9:** Número de organismos vivos de *Chironomus sancticaroli* em bioensaios de toxicidade crônica com água do poço.

Teste crônico <i>C. sancticaroli</i> - Água do poço		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	6	100%
Controle 2	6	100%
Controle 3	5	83%
Controle 4	5	83%
AP 1	6	100%
AP 2	5	83%
AP 3	6	100%
AP 4	6	100%

**Figura 10:** Número de organismos vivos de *Allonais inaequalis* em bioensaios de toxicidade crônica com água do poço.

Teste crônico <i>A. inaequalis</i> - Água do poço		
	Sobrevivência	(%)
Controle 1	6	100%
Controle 2	6	100%
Controle 3	6	100%
Controle 4	6	100%
AP 1	6	100%
AP 2	6	100%
AP 3	6	100%
AP 4	6	100%

**APÊNDICE C:** Dados do comprimento das asas das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* (cm) e cálculo da fecundidade potencial.

**Tabela 11:** Comprimento das asas de *Chironomus sancticaroli* (c) em cm, e resultados do cálculo da fecundidade potencial (f).

	c	f
CONTROLE 1	3,35	872,584
CONTROLE 2	3,525	955,121
CONTROLE 3	3,25	825,42
CONTROLE 4	3,15	778,256
BFA 1	3,2	801,838
BFA 2	3,32	858,4348
BFA 3	3,4	896,166
BFA 4	3,12	764,1068
AP 1	3,05	731,092
AP 2	3,15	778,256
AP 3	3,125	766,465
AP 4	3,25	825,42
C. Sifonada 1	3,2	801,838
C. Sifonada 2	3,12	764,1068
C. Sifonada 3	2,9	660,346
C. Sifonada 4	3,15	778,256

**APÊNDICE D:** Dados brutos referentes às variáveis físicas e químicas das soluções-teste durante o bioensaio de toxicidade aguda com o organismo *Danio rerio*.

**Tabela 12:** Variáveis físico-químicas aferidas no início dos testes com *Danio rerio*.

	pH	T°C	Condutividade ( $\mu$ S)	Dureza (mg.L-1 CaCO <sub>3</sub> )	Oxigênio
Controle 1	8	23,2	127	44,5	6,74
Controle 2	8	23,2	119	44,5	6,26
Controle 3	8	23,1	128	44,5	6,19
Controle 4	8	23,3	11	44,5	6,48
BFA 1	8	23,1	46	35,6	6,5
BFA 2	8	23,4	47	40,05	6,74
BFA 3	8	23,3	48	40,05	6,39
BFA 4	8	23,1	49	44,5	6,14
AP 1	8	23,4	49	40,05	6,14
AP 2	8	23,4	50	35,6	6,35
AP 3	8	23,7	53	35,6	6,57
AP 4	8	23,5	51	35,6	6,55

**Figura 13:** Variáveis físico-químicas aferidas no final dos testes com *Danio rerio*.

	pH	T°C	Condutividade ( $\mu$ S)	Dureza (mg.L-1 CaCO <sub>3</sub> )	Oxigênio
Controle 1	8	22,4	128	40,05	5,68
Controle 2	8	22,3	120	40,05	5,59
Controle 3	8	22,4	126	40,05	6,25
Controle 4	8	23,3	119	44,5	6,8
BFA 1	8	21,6	50	26,7	7,56
BFA 2	8	21,4	52	26,7	6,36
BFA 3	8	21,3	50	26,7	6,02
BFA 4	8	21,5	49	26,7	6,7
AP 1	8	23,3	54	26,7	5,94
AP 2	8	22,5	56	26,7	5,9
AP 3	8	22,9	57	26,7	6,02
AP 4	8	22,5	54	26,7	5,73

**APÊNDICE E:** Dados brutos do peso e comprimento de *Danio rerio*.

**Tabela 14:** Peso bruto (g) do organismo-teste *Danio rerio* nas duas repetições.

1° Teste	Peso (g)		2° Teste	Peso (g)	
	Peixe 1	Peixe 2		Peixe 1	Peixe 2
CONTROLE 1	0,2625	0,2188	CONTROLE 1	0,2625	0,2188
CONTROLE 2	0,1827	0,2118	CONTROLE 2	0,1827	0,2118
CONTROLE 3	0,2388	0,2383	CONTROLE 3	0,2388	0,2383
CONTROLE 4	0,3346	0,3068	CONTROLE 4	0,3346	0,3068
BFA 1	0,2842	0,2351	BFA 1	0,1285	0,1529
BFA 2	0,2722	0,2445	BFA 2	0,2274	0,2137
BFA 3	0,274	0,2411	BFA 3	0,3261	0,2388
BFA 4	0,2421	0,2413	BFA 4	0,2089	0,1534
AP 1	0,4666	0,3504	AP 1	0,2319	0,1832
AP 2	0,234	0,2335	AP 2	0,2339	0,204
AP 3	0,2879	0,1746	AP 3	0,2634	0,1743
AP 4	0,2703	0,2407	AP 4	0,3226	0,2634

**Tabela 15:** Dados brutos do comprimento do organismo-teste *Danio rerio* nas duas repetições.

1° Teste	Comprimento (cm)		2° Teste	Comprimento (cm)	
	Peixe 1	Peixe 2		Peixe 1	Peixe 2
CONTROLE 1	2,7	2,7	CONTROLE 1	2,7	2,7
CONTROLE 2	2,6	2,7	CONTROLE 2	2,6	2,7
CONTROLE 3	2,8	2,8	CONTROLE 3	2,8	2,8
CONTROLE 4	3	3	CONTROLE 4	3	3
BFA 1	2,95	2,8	BFA 1	2,3	2,3
BFA 2	2,9	2,8	BFA 2	2,8	2,8
BFA 3	2,8	2,8	BFA 3	3,1	3
BFA 4	2,85	2,9	BFA 4	2,7	2,35
AP 1	3,3	3,1	AP 1	2,7	2,6
AP 2	2,65	2,8	AP 2	2,8	2,6
AP 3	2,9	2,45	AP 3	2,8	2,6
AP 4	2,9	2,8	AP 4	3,06	2,85