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

ALINE CHRISTINE BERNEGOSI

**Efeito tóxico da cafeína sobre o ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*
(Chironomidae, Diptera) e *Daphnia magna* (Daphnidae, Cladocera)**

São Carlos
2019

ALINE CHRISTINE BERNEGOSI

Efeito tóxico da cafeína sobre o ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera) e *Daphnia magna* (Daphnidae, Cladocera)

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

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2019

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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

BB482e Bernegossi, Aline Christine
Efeito tóxico da cafeína sobre o ciclo de vida de
Chironomus sancticaroli (Chironomidae, Diptera) e
Daphnia magna (Daphnidae, Cladocera) / Aline Christine
Bernegossi; orientador Juliano José Corbi. São Carlos,
2019.

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,
2019.

1. Cafeína. 2. Toxicidade. 3. Contaminantes
emergentes. 4. Concentrações detectadas. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ALINE CHRISTINE BERNEGOSI**.

Título da dissertação: "Efeito da cafeína sobre o ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera) e *Daphnia Magna* (Daphniidae, Cladocera)".

Data da defesa: 02/04/2019.

Comissão Julgadora:

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

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

Prof. Dr. **Giuliano Buzá Jacobucci**
(Universidade Federal de Uberlândia/UFU)

Resultado:

Aprovado

APROVADA

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendlondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu senhor maior, por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, mamis e papis, por sempre apoiarem as minhas decisões e me ajudarem com muito amor e carinho.

Minhas irmãs, Agda e Aninha, por entenderem meus surtos e me fazerem rir sempre que necessário.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano, pela oportunidade do desenvolvimento do mestrado, pelos conselhos e todo auxílio prestado.

Ao POVO e, em especial, meus migos de sempre: Laurinha, Jacque, Jé, TP, Plets, Mimi, Tia, por serem meu suporte e família.

Aos novos migos e LEAAenses, Carina, Mayara, Mara, Bárbara, Lidia, Bruninha, Elisa, Gleyson, Gui por me sempre me incentivar, ajudar, cuidar e fazer da rotina do laboratório algo mágico.

Ao amigo Bruno, por estar ao meu lado durante toda essa pesquisa e fazer mais que o necessário para me manter bem.

Aos amigos e funcionários tia Vânia, Tchê, Rose, Sá, Pri, Fernanda, dona Maria e Socorro por serem tão prestativos e pelos sorrisos e simpatia.

À USP, EESC, SHS e LEAA por estarem presentes durante toda minha caminhada.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro por meio das bolsas concedidas.

RESUMO

Bernegossi, A.C. **Efeito tóxico da cafeína sobre o ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) e *Daphnia magna* (Cladocera: Daphnidae)**. 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A cafeína está presente no cotidiano humano desde o tradicional café até como constituinte de medicamentos, estimulantes, chás, chocolate entre outros produtos alimentícios. Essa substância é considerada um contaminante orgânico emergente provindo de águas residuárias não tratadas. Sua presença nos corpos hídricos vem sendo documentada em baixas concentrações, desde $\eta\text{g.L}^{-1}$ até $\mu\text{g.L}^{-1}$ e os efeitos dessas concentrações nos organismos aquáticos ainda não foram efetivamente investigados. Com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos da cafeína em concentrações comumente encontradas em corpos hídricos, foram realizados testes de ecotoxicidade aguda e crônica com os organismos-teste *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna* e intergeracional com *C. sancticaroli*, com enfoque em respostas biológicas de mortalidade, imobilidade, crescimento, desenvolvimento e reprodução. Como resultado, a cafeína não apresentou toxicidade aguda no teste de curta duração realizado para *D. magna* e *C. sancticaroli*. Foi observado efeito de toxicidade crônica da cafeína, havendo interferência no desenvolvimento das larvas de *Chironomus* principalmente na concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ e no crescimento e reprodução de *D. magna*, na qual foi observada indução na produção de neonatos e desaceleração para o desenvolvimento do organismo (retardo no processo de ecdise). No teste intergeracional, foram observadas mudanças nos padrões de desenvolvimento larval. Os resultados demonstram que a cafeína, em concentrações ambientalmente detectadas, pode causar pequenas alterações no ciclo de vida dos organismos, como por exemplo, alterações no tamanho das asas das fêmeas e no comprimento do corpo das larvas de *C. sancticaroli*. Recomendam-se o uso de técnicas biomoleculares para avaliar as respostas metabólicas dos organismos quando exposto à cafeína em baixas concentrações.

Palavras-chave: Cafeína. Toxicidade. Contaminantes emergentes. Concentrações detectadas.

ABSTRACT

Bernegossi, A.C. **Caffeine toxic effect on *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) life cycle and *Daphnia magna* (Cladocera: Daphnidae).** 2019. 111p Dissertation (Master degree in Science) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2019.

Caffeine is present in human daily life either as traditional coffee or constituent of medicines, stimulants, teas, chocolate, among other products. This substance is an emerging organic contaminant from untreated wastewater. Its presence in aquatic systems has been documented at low concentrations, from ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$ and the effects of these concentrations on aquatic organisms have not yet been effectively investigated. In order to evaluate the toxic effects of caffeine, at concentrations usually found in aquatic systems, acute and chronic ecotoxicological tests were performed with *Chironomus sancticaroli* and *Daphnia magna* and, an intergenerational with *C. sancticaroli*, focusing on biological responses of mortality, immobility, growth, development and reproduction. As a result, caffeine did not present acute toxicity in the short-term test performed for *D. magna* and *C. sancticaroli*. Chronic toxicity of caffeine was observed, with interference in the *Chironomus* larvae development, mainly in the concentration of $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, and in the growth and reproduction of *D. magna*, in which it was observed presence of induction in the production of neonates and deceleration to the development of the organism (delay in the process of ecdysis). In intergeneration test, changes in the larval developmental patterns were observed. In intergenerational testing, changes in larval developmental patterns were observed. The results demonstrate that caffeine, in concentrations detected environmentally, can cause small influences in the organism's life cycle of the, for example, changes in the size of the wings of the females and in the length of the body of the larvae of *C. sancticaroli*. The use of biomolecular techniques to evaluate the metabolic responses of organisms when exposed to caffeine at low concentrations is recommended.

Keywords: Caffeine. Toxicity. Emerging contaminants. Detected concentrations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1 - Estrutura molecular da cafeína.	26
Figura 3-2 - Concentrações de cafeína em águas superficiais de diferentes localidades (Legenda conforme Anexo A), com destaque para o gradiente da presença da mesma.	28
Figura 3-3 - Modelo de carta- controle especificando os componentes principais e destacando em azul a área que representa a validação dos testes ecotoxicológicos com 95% de confiança.....	33
Figura 3-4- Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i> contemplando as fases aquática (larvas e pupa) e terrestre (adultos alados).	36
Figura 3-5 – Aparelho bucal da espécie <i>Chironomus</i> : A e B: padrão normal, C: deformidade leve e D: deformidade severa.	37
Figura 3-6 – Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Daphnia magna</i> , contendo A) Embriões já formados na câmara de incubação; B) Ovócitos maduros no ovário; C) Primeiro estágio do ovócito após ser transferido para a câmara de incubação; D) Ovócitos imaturos no ovário; E) Neonatos; F) Juvenis.	39
Figura 3-7 - Exemplar de microcústáceo <i>Daphnia magna</i> A) fêmea após reprodução assexuada e B) fêmea após a reprodução sexuada e formação do efípio.	40
Figura 4-1 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa.....	41
Figura 4-2 - Cultivo de <i>Chironomus sancticaroli</i> , expondo os recipientes de cultivo (bandejas e gaiolas de nylon) e fotoperíodo aceso (fase luz).	43
Figura 4-3 – Ração para peixe (TetraMin®) macerada a ser utilizada como alimento para <i>Chironomus sancticaroli</i>	44
Figura 4-4 - Cultivo de <i>Daphnia magna</i> , sendo observado uma visão externa da incubadora BOD e uma visão interna, mostrando os béqueres utilizados para o cultivo.	45
Figura 4-5 - Cultivo de <i>Raphidocelis subcapitata</i> com aeração contínua em Erlenmeyer de 2 L e inóculos da alga em Erlenmeyer de 250 mL.	48
Figura 4-6 – Suspensão alimentar de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	49
Figura 4-7 – Contagem de células de <i>Raphidocelis subcapitata</i> com o auxílio da câmara de Neubauer.....	49

Figura 4-8 - Esquema de montagem de teste de sensibilidade de a) <i>Chironomus sancticaroli</i> , b) <i>Daphnia magna</i> .	52
Figura 4-9 - Esquema de montagem de teste de toxicidade crônica de a) <i>Chironomus sancticaroli</i> , b) <i>Daphnia magna</i> .	55
Figura 4-10 – Ilustração de exúvias de <i>Daphnia magna</i> .	57
Figura 4-11: Fotos da observação de uma desova e do recipiente em que a desova ficava até a eclosão.	59
Figura 4-12: Teste de geração – <i>Chironomus sancticaroli</i> - a) larva no I ínstar, b) béquer de vidro com 300 mL de solução-teste, c) 50 g de sedimento d) larvas IV ínstar e) emergência de adultos f) desova g) eclosão das larvas.	59
Figura 4-13 – Exemplificação da medição do comprimento da asa da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> .	60
Figura 4-14 – Equipamentos e <i>software</i> utilizados para observação das cápsulas cefálicas de <i>Chironomus sancticaroli</i> para a análise da presença de deformidade do mento.	61
Figura 5-1 - Carta-controle gerada para <i>D. magna</i> exposta ao $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como substância de referência, no período de 2016 a 2018, contendo o valor médio de EC_{50} e os limites de 95% de confiança (± 2 desvios padrão).	65
Figura 5-2 – Índice de sobrevivência (%) para o organismo <i>Chironomus sancticaroli</i> durante o teste ecotoxicológico de curta duração (96 h), mantendo a temperatura em $25^\circ\text{C} \pm 2$ e o fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro.	66
Figura 5-3 – Índice de mobilidade (%) para o organismo <i>Daphnia magna</i> durante o teste ecotoxicológico de curta duração (48 h), mantendo a temperatura em $20^\circ\text{C} \pm 2$ e o fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro.	67
Figura 5-4 – Similaridade dos efeitos das concentrações de cafeína para <i>Chironomus sancticaroli</i> , com coeficiente de correlação cofenética de 0,8755.	68
Figura 5-5 - Taxa de sobrevivência da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> quando exposta à cafeína em teste de ecotoxicidade crônica (10 dias), mantendo a temperatura em $25^\circ\text{C} \pm 2$ e o fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, com seus respectivos desvio-padrão.	71

Figura 5-6 – Dissimilaridade dos efeitos das concentrações de cafeína para <i>C. sancticaroli</i> , com coeficiente de correlação cofenética de 0,8618.	72
Figura 5-7 – Ilustração do procedimento para realização das medidas de comprimento de larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> por meio do programa ImageJ e geração da tabela de dado.	73
Figura 5-8 – Comprimento médio das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> após teste de ecotoxicidade crônica (10 dias) com seus respectivos desvios padrão.	73
Figura 5-9 – Longevidade dos organismos <i>Daphnia magna</i> apresentado em número de organismos vivos por concentração de cafeína após 21 dias, destacando-se os dias em que foi observada a imobilidade.	75
Figura 5-10 – Dia referente a primeira ninhada de neonatos a partir do início do teste de ecotoxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i> , descrito por concentração de cafeína e contendo seus respectivos desvios padrão.	77
Figura 5-11 – Número de ninhadas produzidas por concentração de cafeína durante os 21 dias do teste para <i>Daphnia magna</i> , com seus respectivos desvios padrão.	78
Figura 5-12 – Número médio de neonatos produzidos por fêmea durante o teste de ecotoxicidade crônica de 21 dias, com seus respectivos desvios padrão.	79
Figura 5-13 – Número médio de exúvias produzidos por concentração de cafeína durante o teste de ecotoxicidade crônica de 21 dias, com seus respectivos desvios padrão.	81
Figura 5-14 – Porcentagem de emergência de adultos por concentração de cafeína durante o teste de geração para as gerações P, F1 e F2; para as concentrações sem nenhum dado expresso não foram observadas emergência.	84
Figura 5-15 – Porcentagem de emergência de adultos (machos ou fêmeas) por concentração de cafeína para a geração P.	85
Figura 5-16 – Porcentagem de emergência de adultos (machos ou fêmeas) por concentração de cafeína para a geração F1.	86
Figura 5-17 – Emergência total de adultos por concentração e ao longo do tempo para a geração P.	87
Figura 5-18 – Emergência total de adultos por concentração e ao longo do tempo para a geração F1.	88

Figura 5-19 – Preparação das larvas de <i>C. sancticaroli</i> para a medição do comprimento para as três gerações (P, F1 e F2, respectivamente).....	88
Figura 5-20 –Comprimento das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> , em mm, para as gerações P, F1 e F2 expostas a diferentes concentrações de cafeína, com seus respectivos desvios padrão.....	90
Figura 5-21 –Tamanho das asas das fêmeas emergidas durante o teste de gerações de <i>Chironomus sancticaroli</i> para as gerações P, F1 e F2 e seus respectivos desvios padrão.	93
Figura 5-22 –Fecundidade potencial das fêmeas emergidas durante o teste de gerações de <i>Chironomus sancticaroli</i> para as gerações P, F1 e F2 e seus respectivos desvios padrão.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 4-1 – Características químicas (% no produto comercial, peso molecular, solubilidade em água à 16°C e ponto de fusão) da cafeína.....	42
Tabela 4-2 – Soluções utilizadas para preparo do meio L.C.Oligo, no qual as algas <i>Raphidocelis subcapitata</i> foram inoculadas.	47
Tabela 4-3 - Testes de ecotoxicidade aplicados para os organismos <i>Chironomus sancticaroli</i> e <i>Daphnia magna</i> , contemplando as respostas analisadas em cada teste e sua respectiva forma de avaliação.	50
Tabela 4-4 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de sensibilidade para os organismos- teste.....	51
Tabela 4-5 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de curta duração.	53
Tabela 4-6 - Parâmetros utilizados para a realização do teste de ecotoxicidade crônica.	54
Tabela 4-7 - Parâmetros utilizados para a realização do teste ecotoxicológico de gerações – <i>Chironomus sancticaroli</i>	58
Tabela 5-1 - Resultados de sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> ao sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O), expressos em valores EC ₅₀ , com seu respectivo erro associado e os seus limites de 95% de confiança gerados no <i>software R</i> , para organismos cultivados e mantidos a 20°C e 16h luz e 8h escuro.	64
Tabela 5-2 – Teste de comparação múltipla, Post Hoc de Dunn's, avaliando as concentrações de cafeína utilizadas no teste agudo, destacando-se em vermelhos os resultados de p-valor $\leq 0,05$	69
Tabela 5-3 - Índice de indução e inibição para a produção média de neonatos em relação ao controle (%I _N), aplicado ao final do teste de ecotoxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	80
Tabela 5-4 - Índice de retardo ou aceleração para a geração de exúvias (%I _E), aplicado ao final do teste de ecotoxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	82
Tabela 5-5 – Resultados de p valor para o teste de Kruskal-Wallis para as três gerações de <i>Chironomus sancticaroli</i> comparando cada concentração ao controle	90
Tabela 5-6 - Avaliação do mento das larvas de <i>C. sancticaroli</i> por meio de fotografias realizadas para as três gerações (P, F1 e F2) e para cada concentração de cafeína utilizada.....	92

Tabela 5-7 – Resultados de p valor para o teste de Kruskal-Wallis para as três gerações de <i>Chironomus sancticaroli</i> comparando cada concentração ao controle.....	94
Tabela 3-1 – Concentrações mínimas e máximas de cafeína detectadas em águas superficiais e costeiras no Brasil e no mundo.	111

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	21
2.	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivos específicos	23
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1	Contaminação de ambientes aquáticos e contaminantes emergentes	25
3.2	Cafeína	26
3.2.1	Efeitos da cafeína.....	29
3.3	Ensaio Ecotoxicológico	31
3.4	Teste de sensibilidade	33
3.5	Organismos-teste	34
3.5.1	<i>Chironomus sancticaroli</i> , Strixino e Strixino, 1981	34
3.5.2	<i>Daphnia magna</i> , Straus, 1820	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Cafeína	41
4.2	Cultivo e manutenção dos organismos-teste.....	42
4.2.1	<i>Chironomus sancticaroli</i>	42
4.2.2	<i>Daphnia magna</i>	44
4.3	Testes de Ecotoxicidade.....	50
4.3.1	Teste de sensibilidade	51
4.3.2	Teste ecotoxicológico de curta duração	52
4.3.3	Teste de ecotoxicidade crônica	54
4.3.4	Teste de geração – <i>Chironomus sancticaroli</i>	57
4.4	Análise estatística	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63

5.1	Teste de sensibilidade.....	63
5.2	Teste ecotoxicológico de curta duração	65
5.3	Teste de ecotoxicidade crônica.....	70
5.3.1	<i>Chironomus sancticaroli</i>	70
5.3.2	<i>Daphnia magna</i>	75
5.4	Teste de geração - <i>C. sancticaroli</i>	83
6.	Considerações finais	97
7.	Conclusões	99
REFERÊNCIAS		101
ANEXO A		111

1. INTRODUÇÃO

A poluição dos recursos hídricos no Brasil é consequência do crescimento populacional, do uso desordenado do solo e da exploração demasiada dos recursos naturais, além da entrada contínua de substâncias tóxicas no ambiente (TUCCI, 2010). A relação entre qualidade de água, saúde ambiental, saúde pública e qualidade de vida humana é estreita e, portanto, estudos relacionando esses temas vêm ganhando visibilidade e relevância (ALMEIDA, 2003).

Contaminantes emergentes são substâncias naturais, sintéticas ou microrganismos que não foram inseridos em programas de monitoramento oficiais e apresentam suspeitas de serem potencialmente tóxicos ao ambiente e/ou aos seres vivos (INCTAA-INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS ANALÍTICAS AVANÇADAS, 2014). Entre os contaminantes emergentes, a cafeína (1,3,7 – trimetilxantina), está presente no cotidiano brasileiro e mundial, desde o tradicional café até como constituinte de medicamentos, moderadores de apetite e estimulantes de metabolismo. Os estudos realizados pelo Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) observaram diferentes concentrações de cafeína nos corpos hídricos brasileiros, que variaram de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$, entretanto, os efeitos tóxicos da cafeína para a biota aquática em baixas concentrações foram pouco explorados (INCTAA, 2014).

Os índices e indicadores que utilizam a biota aquática vêm sendo utilizados como complemento das análises físicas e químicas para a avaliação da qualidade da água. Desse modo, o estudo das comunidades de macroinvertebrados aquáticos tem auxiliado tanto na classificação de qualidade, quanto na avaliação de efeitos tóxicos de contaminantes na biologia desses organismos (CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015). Outra ferramenta empregada para avaliar a toxicidade potencial de substâncias e auxiliar na gestão dos recursos hídricos é a aplicação de testes ecotoxicológicos. Esses testes são realizados utilizando organismos de diferentes espécies, que são selecionados de acordo com a facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, além de sua capacidade de respostas biológicas quando expostos a diferentes contaminantes (COSTA, 2007).

Os testes ecotoxicológicos convencionais visam avaliar a toxicidade potencial na taxa de sobrevivência dos organismos-teste quando expostos de maneira aguda, em que os organismos são expostos em curta duração de tempo e, crônica, no qual o teste possui duração próxima ao do ciclo de vida completo do organismo e é possível observar efeitos subletais (COSTA et al., 2008;

KAISER, 1984). Para observar os efeitos de mortalidade em organismos aquáticos, Moore et al. (2008) em sua pesquisa, precisaram utilizar concentrações de cafeína na ordem de mg.L^{-1} , as quais são significativamente superiores às concentrações encontradas na natureza. Portanto, para as concentrações de cafeína até agora reportadas em ambientes aquáticos contaminados, não é esperado que as respostas ecotoxicológica clássicas, como a taxa de sobrevivência e mobilidade, sejam capazes de avaliar os efeitos tóxicos dessa substância.

Tendo como escopo verificar se a cafeína em concentrações comumente encontradas no meio ambiente (ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$) apresenta caráter tóxico no ambiente aquático, a presente pesquisa analisou os efeitos da cafeína sobre o ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino (Chironomidae, Diptera) e *Daphnia magna* Straus (Daphnidae, Cladocera) por meio das respostas biológicas dos organismos aos testes ecotoxicológicos aplicados.

2. OBJETIVOS

Determinar os efeitos tóxicos da cafeína, por meio das respostas biológicas analisadas durante o ciclo de vida do inseto aquático *Chironomus sancticaroli* e do microcrustáceo planctônico *Daphnia magna*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos tóxicos da cafeína, em concentrações usualmente detectadas no meio ambiente, por meio de testes de toxicidade de curta duração e crônica em *D. magna* e *C. sancticaroli*;
- Avaliar os efeitos tóxicos da cafeína a partir de exposição crônica entre gerações de *C. sancticaroli*, utilizando-se concentrações de cafeína frequentemente detectadas no meio ambiente;
- Analisar a presença de deformidade bucal e mudanças no padrão de emergência de adultos dos indivíduos de *C. sancticaroli* expostos a diferentes concentrações de cafeína durante o teste de gerações;
- Avaliar alterações no tamanho das asas das fêmeas adultas, obtidas no teste de gerações;
- Analisar a fecundidade potencial da espécie *C. sancticaroli* no teste de gerações;
- Calcular o índice de inibição ou indução (%I_N), referente à produção de neonatos para o cladóceros *D. magna* em testes de ecotoxicidade crônica;
- Calcular o índice de retardo ou aceleração (%I_E), referente à ocorrência de ecdises para *D. magna* em testes de ecotoxicidade crônica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação de ambientes aquáticos e contaminantes emergentes

A urbanização no Brasil ocorreu de acordo com o dinamismo econômico, gerando polos urbanos concentrados, com distribuição de renda desigual e sem a aplicação de uma gestão urbana adequada (CAIADO, 1998). A relação entre a ocupação antrópica, aéreas industriais e qualidade da água vem sendo estudada ao longo do tempo, sendo reportadas dificuldades em identificar as fontes poluidoras e monitorar seus lançamentos para a melhoria da gestão desse recurso (BARBER et al., 1996; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO; DOS SANTOS, 2008; NAIK et al., 2008).

No Brasil, apesar dos investimentos em saneamento básico, o cenário apresenta índices insatisfatórios de universalização do esgotamento sanitário. Segundo resultados apresentados no Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008), 99,4% dos municípios brasileiros possuíam serviço de abastecimento de água em pelo menos um distrito, enquanto apenas 55,1% apresentavam sistema de coleta de esgoto (IBGE, 2011). De acordo com o mesmo documento, 56,7% dos municípios utilizam fontes de captação superficiais para abastecimento público. Como consequência do déficit na coleta e tratamento de esgoto, têm-se observado o aumento na degradação da qualidade dos mananciais incluindo os mananciais de abastecimento. Uma das principais fontes de contaminantes emergentes são os esgotos domésticos e industriais, sendo sua presença em corpos d'água cada vez mais comum (ALMEIDA, 2003; HEBERER, 2002; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014; PIVELI, 2012).

A água, além de ser vital à sobrevivência dos organismos vivos, é utilizada para múltiplos usos. Proteger a integridade dos recursos hídricos deveria ser uma das prioridades do século XXI (KOLPIN; MEYER, 2002). Contudo, contaminantes emergentes, naturais, sintéticos ou microorganismos, como fármacos, surfactantes e esteroides estão cada vez mais presente nos corpos d'água. Ao serem ingeridos, parte desses compostos podem ser parcialmente absorvidos pelo metabolismo do organismo humano e seus resíduos são excretados junto à urina e às fezes (COMEAU et al., 2008). Portanto, os compostos emergentes são amplamente encontrados em esgotos domésticos brutos e efluentes de estações de tratamento de esgoto que não são eficientes na remoção deles (CLARA; STRENN; KREUZINGER, 2004; COMEAU et al., 2008; FOCAZIO

et al., 2008; LAWRENCE et al., 2005). Apesar de reconhecidos como contaminantes, esses compostos requerem técnicas avançadas de detecção em ambientes naturais uma vez que se apresentam em baixas concentrações, dificultando o seu monitoramento e gestão (FOCAZIO et al., 2008; SNYDER et al., 2007; WANG et al., 2011).

O monitoramento de todas as substâncias potencialmente tóxicas presentes na água com as tecnologias atuais é inviável, porém, o número de parâmetros analisados vem aumentando desde 1946, quando a primeira norma sobre padrões de potabilidade (Decreto Estadual nº15.642) foi homologada. Em 2012, o Grupo Técnico Químico da Câmara Técnica de Saúde Pública da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) do Estado de São Paulo elaborou o Guia de Potabilidade para Substâncias Químicas (UMBUZEIRO, 2012). Apesar de aparecer como substância presente em mananciais, a cafeína não entrou na lista de 47 substâncias a serem monitoradas propostas no relatório. Por outro lado, no Relatório de Qualidade das Águas Superficiais, a mesma aparece como indicador químico de qualidade, utilizado como traçador da presença de excretos de origem humana e de algumas substâncias do grupo dos contaminantes emergentes, como os disruptores endócrinos (CETESB, 2015).

3.2 Cafeína

A cafeína é um composto orgânico, identificada como 1,3,7-trimetilxantina, com fórmula molecular de $C_8H_{10}N_4O_2$ e peso molecular de $194,19 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figura 3-1).

Figura 3-1 - Estrutura molecular da cafeína.

Fonte: Sigma-Aldrich®.

Além do café, a cafeína está presente em medicamentos, tabacos, condimentos, estimulantes, refrigerantes, chás e produtos alimentícios, como o chocolate. Assim como outros

poluentes emergentes, ela não é totalmente metabolizada e pode ser eliminada através de urina e de fezes, alcançando o meio ambiente por meio das águas residuárias (GONÇALVES, 2008; WANG et al., 2011). Com isso, essa substância tem sido utilizada como traçador para apurar e verificar o potencial de contaminação de corpos hídricos por esgoto doméstico (BUERGE et al., 2003, 2006; KOLPIN; MEYER, 2002). Por exemplo, Bradley et al. (2007) observaram que a concentração de cafeína nas águas dos rios estudados foi decrescendo de acordo com a distância da descarga do efluente das ETEs.

A cafeína é vista como um composto facilmente degradável, porém, algumas evidências já sugerem que a mesma possui potencial recalcitrante e que é lentamente metabolizada quando presente em solos (PADMANABHAN et al., 2003). A remoção da cafeína em estação de tratamento de água por técnicas convencionais não tem se mostrado eficiente, e portanto, sua presença em água de abastecimento público vem sendo detectada (INCTAA, 2014).

Alguns pesquisadores avaliaram a remoção da cafeína em diferentes concepções de tratamento. Aplicando-se cloração e cloroaminação, por exemplo, verifica-se remoção da substância abaixo de 20%. A baixa eficiência de remoção também foi observada para técnicas de coagulação, floculação com aditivo químico, sedimentação e filtração. Por outro lado, utilizando o policloreto de alumínio (PAC) como coagulante e posterior absorção por carvão ativado, a eficiência de remoção aumentou para 50 - 80% (COMEAU et al., 2008; SNYDER et al., 2007; WANG et al., 2011). Outra tecnologia de tratamento que obteve boa remoção de compostos emergentes, incluindo a cafeína em concentrações de $\mu\text{g.L}^{-1}$, é baseado no uso de microalgas, porém, esse sistema não apresentou boa remoção de agrotóxicos (AHMED et al., 2017).

Os autores Benotti e Brownawell (2009) observaram que o tempo de meia vida da cafeína variou de 3,5 a mais de 100 dias dependendo das características físicas e químicas das fontes de água em que foram reportadas. Além disso, Bradley et al. (2007) por meio da análise da biotransformação da cafeína em diferentes ambientes aquáticos que recebem esgoto tratado, perceberam que a biotransformação variou dependendo das características do corpo receptor, variando de 5 a 23 horas. Assim, a entrada contínua de cafeína provinda de fontes antrópicas e a variação da degradação do composto faz com que sua presença em corpos hídricos seja comumente observada, podendo ocasionar sua presença na água potável (DANESHVAR et al., 2012; MACHADO et al., 2016).

Devido a sua propriedade de dissolução e facilidade de detecção, a presença da cafeína nos corpos d'água vem sendo documentada mundialmente como indicador da contaminação, uma vez que ela é claramente de origem antrópica (CETESB, 2015; MOORE et al., 2008). A Tabela 3-1 apresenta as concentrações de cafeína encontradas em diferentes localidades.

A Figura 3-2, gerada a partir dos dados da tabela apresentada no Anexo A, apresenta uma representação gráfica da distribuição da cafeína em diferentes localidades, sendo o eixo das abcissas composto pelos valores de concentração encontrados em $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o eixo das ordenadas composto pelo número correspondente ao local referenciado na tabela.

Figura 3-2 - Concentrações de cafeína em águas superficiais de diferentes localidades (Legenda conforme Anexo A), com destaque para o gradiente da presença da mesma.

Fonte: Elabora pela autora (2019).

De acordo com o levantamento na literatura sobre as concentrações de cafeína encontradas nos corpos hídricos, cerca de 70% dos locais avaliados apresentaram concentrações abaixo de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$; 10% apresentaram concentração até $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 15% apresentaram concentração de 15 a $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Concentrações acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, foram observadas dentro do município de Campinas, localizado no Estado de São Paulo, Brasil.

Além da presença na água, Bradley et al. (2007), observaram que a cafeína sofre biotransformação nos sedimentos dos corpos hídricos (indo de sua fórmula pura [8-C] para CO₂ e CH₄) tanto em ambientes anóxicos quanto aeróbios. Os autores ainda observaram que a biotransformação da cafeína é influenciada pelo potencial redox do meio e que, em condições aeróbias, essa transformação ocorre em maior proporção.

3.2.1 Efeitos da cafeína

Entre outras classificações, a cafeína pode ser rotulada como um composto psicoativo (SNYDER et al., 2007) e estimulante (KOLPIN; MEYER, 2002). Em razão da utilização da cafeína em humanos, para alterar funções do metabolismo, iniciou-se os estudos sobre a influência dessa substância em outros organismos. Em mamíferos, a cafeína é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída de acordo com a proporção de água corporal, podendo ser transferida da mãe para o feto (GOLDSTEIN; GOSSETT, 1962).

Os efeitos mutagênicos da cafeína foram descobertos em 1948. A partir de então foram realizados ensaios em plantas e animais para confirmar esses efeitos, sendo observados: aberrações cromossomais quando a cafeína foi induzida a radiação UV; aumento da morte celular (inativação da regeneração do DNA) e; interferência nas reações enzimáticas e nos mecanismos de replicação celular no fungo *Ophiostoma multiannulatum* (KILHMAN, 1974). Kilhman, em seus estudos, concluiu que a concentração de cafeína que resultou efeitos tóxicos mutagênicos potenciais é em torno de 60 mgL⁻¹, seis vezes a concentração média encontrada no corpo humano (10 mgL⁻¹), o que o autor considera uma margem de segurança aceitável para continuar consumindo a cafeína em suas diversas formas. Outros efeitos da cafeína no metabolismo celular foram observados em células HeLa, células meristemáticas da raiz de *Allium cepa*, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Vibrio fischeri*, células do ovário de hamster chins, vírus Epstein-Barr, *Schizosaccharomyces pombe* e células de mamíferos (BLASINA et al., 1999; CARBALLO; PINCHEIRA; DE LA TORRE, 2006; FERNANDES et al., 2017; ISHIDA; KOZAKI; TAKAHASHI, 1985; MARCELAIN et al., 2005; OSMAN; MCCREADY, 1998; TSABAR et al., 2015; ZHOU et al., 2000). Além disso, também foram observados efeitos de danos no DNA por mutação pontual ou cromossomo rompido, sendo apresentado a influência da cafeína no reparo do DNA danificado (FERNANDES et al., 2017; ISHIDA; KOZAKI; TAKAHASHI, 1985).

Quando administrada isoladamente, a cafeína provoca efeitos bifásicos, ocorrendo a depressão locomotora em doses menores e estimulação em doses mais altas (SNYDER et al., 1981). O efeito estimulante refere-se à capacidade da cafeína de bloquear os receptores de adenosina (TAVARES; SAKATA, 2012). Pollack; Balazs e Ogunseitan (2009) estudando os efeitos da cafeína em quatro espécies de alga (*Symbiodinium microadriaticum*, *Zoanthus sociatus*, *Pseudoterogorgia bipinnata* e *Symbiodinium goreau*) verificaram alterações metabólicas nos organismos, concluindo que a cafeína pode causar efeitos de estresse nessas espécies e que esses efeitos podem ser intensificados por fatores ambientais como mudança da temperatura e pH.

Padmanabhan et al. (2003) observaram que nem todas as bactérias do solo foram capazes de metabolizar a cafeína e diferente do que o esperado pelos autores, que ela apresentaria fácil dispersão, a cafeína se mostrou mais persistente no meio. A comunidade microbiana do solo mineraliza prontamente glicose, fenol e naftaleno dentro de 24 horas, mas não a cafeína. Lawrence et al. (2005) observaram o aumento da presença de placas heterotróficas, o que indica um aumento da quantidade de bactérias e actinomicetes em resposta à cafeína em concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já em plantas, o acúmulo de cafeína está ecologicamente associado à defesa química contra predadores e para inibir o crescimento de outras plantas (HARBORNE, 1993).

Por outro lado, devido ao seu potencial de alterar taxas metabólicas, a cafeína também é estudada para fins medicinais, como por exemplo, para tratamento ou prevenção do Alzheimer. Em sua pesquisa com ratos transgênicos que ingeriam cafeína por meio do consumo de água, Arendash e Cao (2010) observaram que, se ingerida em doses crônicas (aproximadamente 5 xícaras de café por dia), a cafeína se mostrou aliada na proteção contra o comprometimento da memória e menores níveis cerebrais de proteínas anormais, que competem pelo polo. Kerzendorfer e O'Driscoll (2009) sugerem que o potencial da cafeína em inibir o caminho visado pelo DNA danoso, em câncer de pele não melanoma, é elevado e pode ser uma fonte terapêutica. Além disso, a cafeína pode desacoplar a progressão do ciclo celular a partir da replicação e reparo do DNA e por isso vem sendo utilizada como composto adjunto em terapias de radiação e quimioterapia (BLASINA et al., 1999; TSABAR et al., 2015).

3.3 Ensaios Ecotoxicológicos

A ecotoxicologia é uma ciência que visa avaliar a toxicidade potencial de substâncias químicas, sintéticas ou naturais, no ecossistema por meio de bioensaios em organismos vivos aquáticos e terrestres, sendo eles animais ou vegetais (DI GIULIO; NEWMAN, 2010; HODGSON, 2004; RAND, 1995; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Nesse âmbito, os bioensaios são uma ferramenta importante para avaliação da qualidade da água e do sedimento, para avaliar os efeitos de contaminantes na biota aquática e para auxiliar na seleção de substâncias usadas na indústria farmacêutica e de aditivos agrícolas, auxiliando, desse modo, na tomada de decisão. A ecotoxicologia engloba conceitos de ecologia (diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas) e da toxicologia (efeitos adversos de uma substância sobre a comunidade biológica) (COSTA et al., 2008; HODGSON, 2004).

Os testes ecotoxicológicos, aplicados para o monitoramento ambiental e para a avaliação dos efeitos de compostos específicos, são ensaios laboratoriais realizados em condições específicas e controladas. Neles, são comparados os efeitos nos organismos-teste presentes nas amostras contendo os contaminantes (orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos) com aqueles apresentados nas amostras de controle negativo, sem a presença do contaminante (USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1992). Com o intuito de garantir a reprodutibilidade, existem protocolos nacionais e internacionais que padronizam os testes ecotoxicológicos por organismo-teste (ABNT, 2016b, 2018, OECD, 2004, 2011, 2012). Para a realização dos mesmos são utilizados organismos de diferentes espécies, que são selecionados de acordo com sua capacidade de respostas biológicas quando expostos a diferentes contaminantes, além da facilidade de cultivo e manutenção em laboratório (COSTA, 2007).

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser divididos em dois grupos, dependendo do tempo de exposição do organismo a uma substância ou uma mistura de substâncias, sendo eles: agudo e crônico. O teste de toxicidade agudo considera a frequência das respostas dos organismos de uma mesma população, quando expostos a uma concentração definida de uma substância que causa efeito de letalidade ou inibição de crescimento por um curto período de tempo. Nesse teste, geralmente considera-se a distribuição normal e espera-se uma curva de distribuição sigmoide. O teste de toxicidade crônica, realizado abrangendo parcialmente ou totalmente o ciclo de vida do organismo, tem como objetivo definir entre as concentrações analisadas, aquelas que não causam

impacto de importância biológica sobre as respostas dos organismos (sobrevivência, reprodução, crescimento, dentre outros). Neste teste, os resultados são analisados por meio de testes de hipóteses, objetivando observar as respostas significativamente diferentes da observada no controle. A exposição crônica dos organismos-teste aos contaminantes em concentrações subletais pode ocasionar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais (COSTA et al., 2008; SZYNKOWSKA; PAWLACZYK, 2014; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Na ecotoxicologia convencional, os resultados dos testes ecotoxicológicos são tratados geralmente a partir da relação de dose e resposta, sendo desenvolvido uma curva gráfica que apresenta os efeitos de um contaminante com relação ao aumento da dose do contaminante (HODGSON, 2004). Com o auxílio da curva e aplicação de cálculo estatísticos é possível determinar a concentração que leva a morte de 50% dos indivíduos (CL_{50}); causa efeito observado, tal como a imobilidade, em 50% dos indivíduos (CE_{50}) ou que causa inibição em 50% dos indivíduos (CI_{50}).

Por se tratar de ensaios realizados com organismos vivos e, em condições laboratoriais, pode ocorrer variabilidade nos resultados obtidos em cada teste ecotoxicológico. Essa oscilação pode ser consequência de variações na qualidade da água utilizada, temperatura, pH, fotoperíodo, concentração de oxigênio dissolvido, frequência e qualidade da alimentação, estabilidade genética, idade dos organismos utilizados, entre outros (USEPA, 2002a, 2002b; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Portanto, para minimizar essa variabilidade são realizados, frequentemente, testes ecotoxicológicos com substâncias de referência, denominados testes de sensibilidade.

Para que os resultados dos testes ecotoxicológicos sejam uma ferramenta para a manutenção da qualidade dos corpos hídricos, sem que haja perdas à biota aquática, é interessante a utilização de mais de um organismo-teste para verificar os efeitos em diferentes representantes. Nesse sentido, neste estudo, optou-se por trabalhar com *Chironomus sancticaroli*, um macroinvertebrado aquático bentônico amplamente utilizado por possuir tolerância à poluição (ALMEIDA, 2007) e *Daphnia magna*, um microcústáceo filtrador, que vem sendo utilizado por ser sensível a pequenas mudanças de qualidade (SOLBÉ et al., 1998). Por fim, a aplicabilidade dos ensaios ecotoxicológicos depende da seleção adequada das respostas biológicas a serem analisadas. Visto o levantamento bibliográfico para a presença de cafeínas nos corpos hídricos e as concentrações em que foram consideradas com toxicidade potencial, percebe-se a necessidade de avaliar respostas além da mortalidade ou imobilidade dos organismos.

3.4 Teste de sensibilidade

Para que os resultados obtidos nos testes de ecotoxicidade sejam considerados representativos e confiáveis, é necessário garantir que os organismos estejam saudáveis ao longo do tempo quando sujeitos a condições laboratoriais, como, por exemplo, avaliar a qualidade da água de cultivo. Os testes de sensibilidade são recomendados pelas normas ABNT (2016a), OECD (2011) e seus resultados expressos graficamente em forma de uma carta-controle, a qual compreende no eixo da abcissa as datas de realização do teste e no eixo da ordenada os valores encontrados para concentração de efeito - EC_{50} e/ou LC_{50} (ASTM, 2016). A partir das respostas obtidas, como taxa de mortalidade e/ou imobilidade, é possível avaliar se o lote de organismos está saudável e propício para ser utilizado nos testes ecotoxicológicos (DI GIULIO; NEWMAN, 2010; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A carta-controle contém em forma de gráfico o valor da média dos EC_{50} e/ou LC_{50} dos testes realizados, juntamente com os valores correspondente a dois desvios padrão (superior e inferior à média), que permite avaliar os resultados com 95% de confiança (Figura 3.3).

Figura 3-3 - Modelo de carta- controle especificando os componentes principais e destacando em azul a área que representa a validação dos testes ecotoxicológicos com 95% de confiança.

Fonte: Adaptado de Zagatto; Bertoletti (2008).

O resultado de um teste ecotoxicológico é considerado válido quando a sensibilidade do organismo-teste estiver dentro dos limites, inferior e superior, estabelecido na carta-controle (Figura 3-3). Sempre que houver dois resultados consecutivos além dos limites, ou sete resultados consecutivos de um mesmo lado da linha de tendência central, todos os procedimentos relacionados ao ensaio devem ser reavaliados (ABNT, 2016a).

3.5 Organismos-teste

As espécies indicadas para serem utilizadas como organismo-teste, devem apresentar características como sensibilidade constante a uma diversidade de agentes químicos, garantindo repetitividade e reprodutibilidade dos resultados; facilidade de cultivo e manutenção em laboratório e ciclos de vida curtos; disponibilidade nos ambientes aquáticos; representatividade de seu nível trófico e estabilidade genética, o que possibilita a obtenção de lotes uniformes de organismos. Entre os organismos-teste para água doce recomenda-se o uso das espécies de alga *Scenedesmus subscapicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*; de microcrustáceos *Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, de insetos *Chironomus* sp. e de peixes *Danio rerio*, *Poecilia reticulata* (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

O macroinvertebrado aquático bentônico *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) é amplamente utilizado em testes ecotoxicológicos por possuir tolerância a diferentes meios, desde os mais impactados até os mais preservados e por ser de fácil obtenção e manutenção (ALMEIDA, 2007; BONANI, 2010; COLOMBO-CORBI et al., 2017; COSTA, 2007; DELL'ACQUA, 2017; FONSECA, 1997; SANTOS, 2008). O microcústáceo filtrador *Daphnia magna* (Cladocera: Daphnidae), representativo do zooplâncton, é recomendado em ensaios ecotoxicológicos e para a avaliação da qualidade da água por apresentar sensibilidade a pequenas mudanças de qualidade e ser um organismo partenogenético, ou seja, com estabilidade genética (GROSSELI, 2016; MIGUEL, 2016; NOVELLI, 2010; SANTOS, 2008).

3.5.1 *Chironomus sancticaroli*, Strixino e Strixino, 1981

Os Chironomidae, pertencentes à classe Insecta e ordem Diptera, são uma família constituída por mosquitos alados, que possuem alta distribuição pelo mundo e em ambientes

aquáticos, com boa adaptação às diferentes condições de temperatura, profundidade e concentração de oxigênio dissolvido (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995). Baseado no período larval, a família Chironomidae pode se enquadrar em seis modelos de alimentação, sendo eles: coletores, coletores-filtradores, raspadores, trituradores, engolidores e sugadores. Ressalta-se que a maioria dos organismos dessa família não possuem apenas um modo alimentício e que seus hábitos são majoritariamente bentônicos na fase larval (BERG, 1995).

A família Chironomidae é comum em ambientes aquáticos, tanto em regiões preservadas, quanto em áreas com pouca vegetação ripária e cercadas por cultivos e pastos. Desse modo, essa família pode ser indicadora de impacto ambiental provindo de fontes antrópicas (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008). Essa abundância numérica de Chironomidae, geralmente é atribuída à capacidade desse organismo de se adaptar fisiologicamente às diferentes condições ambientais (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995).

A espécie *Chironomus sancticaroli*, é um macroinvertebrado aquático pertencente à família Chironomidae, considerado como sinonímia júnior de *Chironomus xanthus* Rempel (1939) (SPIES; REISS, 1994). Entretanto, segundo os pesquisadores Trivinho-Strixino & Strixino, que descreveram a espécie a partir de exemplares do município de São Carlos (São Paulo, Brasil), a ausência da comparação pormenorizada entre os tipos de *Chironomus xanthus* (não há holótipo ou parátipos preservados), torna a sinonímia sugerida inválida (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Chironomus sancticaroli possui desenvolvimento holometábolo, ou seja, com metamorfose completa e sua larva é do tipo vermiforme, que se locomove por projeções, não possuem tubérculos ou processos carnosos e possuem cabeça prognata (com peças bucais voltados para a frente) (MUGNAI; NESSIMIAN; BAPTISTA, 2010).

A espécie possui ciclo de vida curto, sendo os quatro estágios do organismo (ovo; instares larvais - I instar, II instar, III instar e IV instar; pupa e adulto) desenvolvido em cerca de 13 dias (Figura 3-4). O período larval é predominante no ciclo de vida, seguido pelo período de pupa e adulto (FONSECA, 1997). Apesar de curto, o período de pupa é a fase que envolve as grandes mudanças na morfometria do inseto. O adulto caracteriza-se por possuir duas asas, e a antena com diformetria sexual. Na distribuição ecológica, as larvas de Chironomidae podem ocupar os diferentes tipos de ambiente aquático devido ao seu mecanismo de respiração, que possui hemoglobina na hemolinfa o que garante a sobrevivência ao ocupar ambientes com baixa concentração de oxigênio dissolvido.

Figura 3-4- Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* contemplando as fases aquática (larvas e pupa) e terrestre (adultos alados).

Fonte: Adaptado de Trivinho-Strixino (2014).

Nos primeiros instares, as larvas possuem comportamento planctônico, enquanto nas fases subsequentes, esta passa a ter hábitos bentônicos. Em sua fase bentônica, as larvas da espécie constroem casulos a partir de partículas do substrato e secreção salivar, ficam alojadas nas camadas superficiais do sedimento e a alimentação ocorre por meio de pequenas partículas que ficam aprisionadas no casulo, pelo movimento da larva, ou pela obtenção direta, quando as larvas impulsionam o corpo para fora do casulo (OLIVER, 1971). A espécie se alimenta de algas, detritos suspensos (matéria orgânica, bactérias) e da própria gema ovígera, no início do desenvolvimento (OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980). O aparelho bucal das larvas vem sendo objeto de estudo para a avaliação da qualidade ambiental, uma vez que pode apresentar deformidade quando o organismo se alimenta de partículas contaminadas. As deformidades podem ser leves ou severas (Figura 3-5) e estão relacionadas à redução ou adição de um ou mais dentes, presença de espaços vazios entre os dentes (GAP) e presença de dentes quebrados ou tortos (BIASI; RESTELLO, 2010; RICHARDI et al., 2013).

Figura 3-5 – Aparelho bucal da espécie *Chironomus*: A e B: padrão normal, C: deformidade leve e D: deformidade severa.

Fonte: Adaptado de Biasi e Restello (2010); Richardi et al. (2013).

O período de pupa possui curta duração. Quando o organismo está maduro ele se desloca até a superfície, onde ocorre a eclosão do adulto alado, que espera suas asas secarem para voar. Alguns fatores ambientais como temperatura, tempo de exposição à luz e disponibilidade de alimento podem influenciar no desenvolvimento dessa espécie ao longo de seu ciclo de vida (BERG, 1995; OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Após a emergência dos adultos é possível diferenciar o gênero dos mosquitos, sendo os machos de coloração amarelo-esverdeada com abdômen afinado e antena plumosa, enquanto a fêmea apresenta coloração acastanhada, com abdômen mais encorpado (TRIVINHO-STRIXINO, 1980). A peça bucal dos adultos da espécie é reduzida, sendo assim, os adultos não se alimentam e possuem apenas função reprodutiva. Após a copulação, os ovos (média de 550 por fêmea) são depositados como uma massa ovígera gelatinosa, com formato espiral e demoram entre 44 e 48 horas para eclodirem em larvas (FONSECA; ROCHA, 2004).

Chironomus sancticaroli foi selecionado como organismo-teste por ser uma espécie bentônica nativa, de fácil obtenção e manutenção e que já foi utilizado em outros estudos

ecotoxicológicos (ALMEIDA, 2007; COLOMBO-CORBI et al., 2017; DELL'ACQUA, 2017; FONSECA, 1997).

3.5.2 *Daphnia magna*, Straus, 1820

Os microcrustáceos da ordem Cladocera, pertencentes à classe Crustacea e à família Daphnidae são organismos geralmente transparentes, que possuem uma carapaça única composta por quitina (polissacarídeo) e, devido sua natação, são conhecidos com o nome de “pulga d’água”.

As espécies do gênero *Daphnia* são organismos de ampla distribuição geográfica, que se adaptam melhor em ambientes com temperaturas de 18 a 22°C e dureza elevada (ABNT, 2016b). O microcrustáceo filtrador *Daphnia magna* (Cladocera: Daphnidae), representativo do zooplâncton, é recomendado em ensaios ecotoxicológicos e avaliação da qualidade da água por apresentar sensibilidade a pequenas mudanças de qualidade ambiental e estabilidade genética (GROSSELI, 2016; MIGUEL, 2016; NOVELLI, 2010; SANTOS, 2008). Além disso, características como: serem pequenos e necessitarem de pequena infraestrutura, serem fáceis de cultivar em laboratório, possuírem baixos custos de manutenção fazem das *Daphnia* um bom organismo-teste (TERRA; FEIDEN, 2003).

Além disso, *D. magna* vem sendo utilizado como indicador em testes ecotoxicológicos desde a década 40, quando Anderson (1944), propôs como organismo-teste pelas vantagens de serem organismos pequenos (< 5 mm) e possuírem ciclo de vida curto, de no máximo 2 meses (BIESINGER; CHRISTENSEN, 1972; MÜLLER, 1980). Esses animais possuem uma função importante na cadeia trófica, pois são organismos intermediários entre os produtores e os consumidores, ao mesmo tempo que se alimentam de algas e bactérias (e auxiliam em seus controles), servem de alimento para predadores invertebrados e vertebrados, como peixes (ANDERSON, 1944; DODSON; CÁCERES; ROGERS, 2010).

Conforme observado na Figura 3-6, o gênero *Daphnia* possui quatro estágios de vida: ovo, neonato (*Daphnia* recém nascida com máximo de 24 horas de vida), juvenil (fase que contempla até o desenvolvimento dos ovos) e adulto (quando realiza a primeira postura) (MIGUEL, 2016). Geralmente, esses organismos realizam a partenogênese, produzindo ovos diploides com baixa variabilidade genética.

Figura 3-6 – Esquema representativo do ciclo de vida de *Daphnia magna*, contendo A) Embriões já formados na câmara de incubação; B) Ovócitos maduros no ovário; C) Primeiro estágio do ovócito após ser transferido para a câmara de incubação; D) Ovócitos imaturos no ovário; E) Neonatos; F) Juvenis.

Fonte: Adaptado de Dodson; Cáceres; Rogers, 2010.

Dáfnias são organismos tipicamente diploides e produzem ovócitos diploides por partenogênese, processo assexuado que desenvolve embrião sem que ocorra a fecundação e cujo neonatos originados são geneticamente idênticos a progenitora. Porém, como resposta aos sinais ambientais de estresse ou situações com muita competição e falta de alimento, sua estratégia de reprodução pode passar de assexuada (apenas neonatos fêmeas) para sexual (produção de machos e fêmeas haploides), possibilitando a variabilidade genética à espécie (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2012). Na reprodução assexuada, os organismos alocam elevada proporção de sua energia a produção e incubação dos ovócitos (DODSON; CÁCERES; ROGERS, 2010). Já na reprodução sexuada, as fêmeas são fecundadas por machos internamente e dão origem aos efípios (diploide), conhecidos como ovos de resistência (Figura 3-7). Esses ovócitos são ricos em nutrientes e envoltos por uma camada protetora rígida, que permanece em estado de dormência até que as condições ambientais voltem a se tornar favoráveis.

Figura 3-7 - Exemplar de microcústéceo *Daphnia magna* A) fêmea após reprodução assexuada e B) fêmea após a reprodução sexuada e formação do efipio.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

O processo de ecdise é controlado pelos hormônios ecdisteroides e pode sofrer influências de compostos emergentes como hormônios e substâncias endócrinas (GIRAUDO et al., 2017; MARTIN-CREUZBURG; WESTERLUND; HOFFMANN, 2007; SUMIYA et al., 2014).

Daphnia magna foi selecionado como organismo-teste por ser uma espécie amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos, habitar a coluna d'água e ser de fácil manutenção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos e metodologias utilizados para o desenvolvimento dessa pesquisa são ilustrados no fluxograma apresentado na Figura 4-1.

Figura 4-1 - Fluxograma das etapas de desenvolvimento da pesquisa.

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

4.1 Cafeína

A cafeína (produto comercial em pó), foi adquirida por meio da empresa Sigma-Aldrich® em frasco de 250 mg (Lote #SLBR1863V) e armazenada em local seco e limpo, na temperatura variando de 25 ± 2 °C e ao abrigo de luz. Na Tabela 4-1 são apresentadas as características químicas da cafeína.

Tabela 4-1 – Características químicas (% no produto comercial, peso molecular, solubilidade em água à 16°C e ponto de fusão) da cafeína.

Fórmula empírica	C₈H₁₀N₄O₂
Porcentagem de cafeína no produto comercial	99%
Peso molecular	194,19
Solubilidade em água a 16°C	18,7 g.L ⁻¹
Ponto de fusão	234 – 236,5 °C

Fonte: Sigma-Aldrich® (site).

Como critério para escolher as concentrações utilizadas como solução-teste foram consideradas as faixas de concentrações que mais foram detectadas nos corpos d'água (5, 15, 30 µ.L⁻¹), a maior concentração reportada em rios brasileiros (127 µ.L⁻¹) e uma concentração superior (200 µ.L⁻¹).

A solução-estoque (na concentração de 100 mg.L⁻¹), utilizada para a realização das diluições, foi preparada por meio da diluição de 25 mg do produto comercial em pó em 250 mL de água deionizada e armazenada em frasco âmbar coberto por papel alumínio por no máximo 24 h antes de sua utilização para evitar a degradação do produto. A solução-estoque foi preparada com o intuito de possibilitar a diluição da cafeína em baixas concentrações para utilização nos testes ecotoxicológicos.

4.2 Cultivo e manutenção dos organismos-teste

As espécies *C. sancticaroli* e *D. magna*, utilizadas como organismos-teste foram criadas no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), localizado na cidade de São Carlos, Estado de São Paulo.

4.2.1 *Chironomus sancticaroli*

O cultivo da espécie *C. sancticaroli*, foi realizado por meio de adaptações nas metodologias propostas por FONSECA (1997); FONSECA; ROCHA (2004); TRIVINHO-STRIXINO (1980), sendo os primeiros organismos obtidos diretamente do campo, em lagoas de estabilização do matadouro de Frango (BR-Aves), localizado em São Carlos, São Paulo, Brasil.

O cultivo é realizado em bandejas de plástico (com dimensões de 38 cm de comprimento x 33 cm de largura x 6 cm de altura) com aeração constante, contendo água deionizada e sedimento fino previamente tratado, cobertas por gaiolas de nylon (com dimensões de 42 cm de comprimento x 36 cm de largura x 38 cm de altura), para evitar a evasão dos organismos adultos (Figura 4-2).

Figura 4-2 - Cultivo de *Chironomus sancticaroli*, expondo os recipientes de cultivo (bandejas e gaiolas de nylon) e fotoperíodo aceso (fase luz).

Fonte: Acervo pessoal da autora (2017).

A temperatura da sala de cultivo foi controlada e mantida entre 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Os organismos foram alimentados uma vez por semana com $22,6 \pm 1$ mg de ração para peixe (TetraMin®) macerada (Figura 4-3). A água de cultivo (água + alimento) possui pH próximo à neutralidade (6,5 a 7,5) e condutividade elétrica entre 25 e 55 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$.

Figura 4-3 – Ração para peixe (TetraMin®) macerada a ser utilizada como alimento para *Chironomus sancticaroli*.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2017).

4.2.2 Daphnia magna

O cultivo da espécie *D. magna* foi realizado por meio de adaptações na metodologia proposta pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016a), sendo os primeiros organismos cedidos pelo Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia Aquática, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos, SP.

O cultivo foi realizado em béqueres de 2 L, inoculados com 40 indivíduos e mantidos em incubadora BOD (Incubadora BOD com fotoperíodo modelo SL-224, do fabricante SOLAB), com temperatura controlada entre $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro. Com intuito de minimizar a evaporação do meio de cultivo, os béqueres foram cobertos por plástico filme (Figura 4-4).

Figura 4-4 - Cultivo de *Daphnia magna*, sendo observado uma visão externa da incubadora BOD e uma visão interna, mostrando os béqueres utilizados para o cultivo.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2017).

O cultivo da espécie deve oferecer condições mínimas que se aproximem do hábitat do animal, portanto, as dáfias foram mantidas em uma água rica em sais. A água reconstituída foi preparada de acordo com a norma técnica NBR 12.713 (ABNT, 2016b), sendo o pH controlado na faixa entre 7,6 e 8,0 e dureza total entre 175 e 225 mg.CaCO₃.L⁻¹. A cultura foi mantida por meio de três trocas semanais do meio de cultivo, sendo uma das trocas realizada parcialmente, ou seja, 1 L do meio de cultivo novo e 1 L do meio de cultivo existente. A fim de evitar danos, os organismos foram transferidos para o novo meio por meio de pipeta de Pasteur de boca larga. Para auxiliar na suplementação dos organismos, foram adicionadas o condicionador para aquário Prime® do laboratório Seachem, que auxilia no controle de cloramina, amônia e outros compostos nitrogenados, e o complemento multivitamínico Fishtamin® da marca Sera, ambos na proporção de 1 gota de cada para cada 2 litros de água reconstituída.

A alimentação das dáfias no cultivo foi realizada com suspensão algácea de *Raphidocelis subcapitata*, sinonímia *Pseudokirchneriella subcapitata*, na proporção de 3×10^5 células.mL⁻¹, as quais foram cultivadas de acordo com o Anexo A (meio L.C. Oligo) da norma técnica NBR 12648 (ABNT, 2018) e acrescido de aditivo alimentar constituído de 50 mL de solução fermentada (0,25 g de fermento biológico a cada 50 mL de água deionizada) e 5g de ração para peixe (Tetramin®) diluídos em um litro de água destilada. Após a mistura, as dáfias foram alimentadas com 1 mL.L⁻¹.

4.2.2.1 Modo de preparo da água reconstituída de elevada dureza

O preparo da água de diluição (água reconstituída) utilizada como meio de cultura de *D. magna* é de dureza total elevada, com valores entre 175 e 225 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e, de moderada basicidade, com pH entre 7,6 e 8,0. Caso o pH final esteja fora da faixa aceita, é necessário seu ajuste com solução de ácido clorídrico (HCl) para a diminuição do pH ou com solução de hidróxido de sódio (NaOH) para o aumento do pH.

Para o preparo de 1L de água reconstituída foram utilizadas quatro diferentes soluções, as quais foram preparadas conforme descrito abaixo, além de água deionizada.

- Solução 1: 73,5g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em água deionizada até completar 1000 mL;
- Solução 2: 123,3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dissolvidos em água deionizada até completar 1000 mL;
- Solução 3: 5,8g de KCl dissolvidos em água deionizada até completar 1000 mL;
- Solução 4: 64,8g de NaHCO_3 dissolvidos em água deionizada até completar 1000 mL.

Desse modo, para o preparo de 1 L de água reconstituída foram utilizados 3,2 mL da Solução 1, 0,8 mL da Solução 2, 0,8 mL da Solução 3 e 0,8 mL da Solução 4 e 994,4 mL de água deionizada. A água constituída permaneceu com aeração por, pelo menos, 12h antes de seu uso para garantir a solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH.

4.2.2.2 Cultivo da alga

O cultivo da alga *Raphidocelis subcapitata* é feito utilizando o meio L.C. Oligo (ABNT, 2018), preparado a partir de 7 soluções de acordo com a Tabela 4-2. As soluções foram armazenadas sob refrigeração em frascos de vidro na cor âmbar.

Tabela 4-2 – Soluções utilizadas para preparo do meio L.C.Oligo, no qual as algas *Raphidocelis subcapitata* foram inoculadas.

	Descrição	Peso (mg)	Modo de preparo	Volume para preparo de 1000 mL do meio L.C. Oligo (mL)
Solução 1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4000	Dissolver em 100 mL de água deionizada	1,0
Solução 2	KNO_3	10000		1,0
Solução 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3000		1,0
Solução 4	K_2HPO_4	4000		1,0
Solução 5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	Dissolver em 1000 mL de água deionizada	0,5
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60		
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60		
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60		
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60		
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60		
	H_3BO_3	60		
Solução 6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1625		0,5
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	625		
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	625		
Solução 7	NaHCO_3	15000		1,0

Fonte: ABNT, 2018.

Para o preparo do meio L.C. Oligo foram acrescentados 500 mL de água deionizada em um balão volumétrico de 1000 mL, juntamente com as soluções nos volumes pré-determinados e, por último, novamente água deionizada até atingir o menisco. A solução foi agitada por 1 hora antes de ser autoclavada.

A inoculação da alga foi realizada colocando aproximadamente 700 mL do meio de cultivo em um Erlenmeyer (com capacidade para de 2 L), e 100 mL em dois Erlenmeyer de 250 mL, os quais foram devidamente tampados utilizando-se tampões de gaze e algodão. Para garantir a esterilização, os frascos foram envolvidos por papel alumínio e dispostos em autoclave por 15 minutos a 120°C e pressão de 1,0 atm. Uma pipeta graduada de 10 mL também foi autoclavada para ser utilizada como entrada de oxigênio.

O local utilizado para inoculação foi esterilizado com álcool 70% e a manipulação da vidraria foi realizada próximo ao bico de Bunsen. A alga foi inoculada adicionando 150 mL do inóculo no Erlenmeyer de 2 L e 75 mL do inóculo no Erlenmeyer de 250 mL. Os Erlenmeyer menores foram utilizados como novos inóculos. Após a inoculação, a pipeta já esterilizada foi introduzida no meio do tampão do frasco maior e conectada ao aerador e o cultivo permaneceu sob

aeração contínua, com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro durante 7 dias, que representa a fase exponencial de crescimento. Os frascos menores são mantidos sem aeração sob as mesmas condições do frasco maior, sendo agitados manualmente (Figura 4-5). O processo de inoculação da alga foi realizado a cada 15 dias.

Figura 4-5 - Cultivo de *Raphidocelis subcapitata* com aeração contínua em Erlenmeyer de 2 L e inóculos da alga em Erlenmeyer de 250 mL.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2019).

4.2.2.1 Preparo da suspensão alimentar

Para o preparo do alimento da espécie *D. magna*, decorrido os 7 dias de crescimento da alga, foi realizada a centrifugação do cultivo sob aeração para seu adensamento (Centrífuga modelo 206 BL Excelsa® II, marca FANEM) com rotação de 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante é descartado e as algas sedimentadas ressuspendidas em um frasco plástico com tampa (Figura 4-6).

Figura 4-6 – Suspensão alimentar de *Raphidocelis subcapitata*.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

A contagem das células foi realizada em uma câmara de Neubauer, com o auxílio de um contador (Figura 4-7), sendo necessária a homogeneização da solução algal, por meio da agitação do frasco antes da contagem e sempre que for utilizada para alimentação dos organismos.

Figura 4-7 – Contagem de células de *Raphidocelis subcapitata* com o auxílio da câmara de Neubauer.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

4.3 Testes de Ecotoxicidade

Os testes de ecotoxicidade foram realizados no LEAA, em salas climatizadas para cada organismo. Para realização dos testes, foi utilizada solução-estoque de cafeína, cujo preparo foi citado acima. As diluições foram realizadas em água deionizada para a espécie *C. sancticaroli* e em água reconstituída para a espécie *D. magna*. Medições de pH e condutividade elétrica foram realizadas no início e ao final de cada teste.

A Tabela 4-3, expõe de maneira concisa os testes que foram aplicados para cada organismo com suas respectivas respostas analisadas, que serão detalhados nos itens a seguir.

Tabela 4-3 - Testes de ecotoxicidade aplicados para os organismos *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna*, contemplando as respostas analisadas em cada teste e sua respectiva forma de avaliação.

Teste de ecotoxicidade	Resposta analisada		Forma de avaliação
	<i>C. sancticaroli</i>	<i>D. magna</i>	
Sensibilidade	Mortalidade	Imobilidade	Visual, com a contagem dos organismos mortos e/ou moveis
Aguda	Sobrevivência	Mobilidade	Visual, com a contagem dos organismos vivos e/ou móveis
Crônica	Sobrevivência	Mobilidade	Visual, com a contagem dos organismos vivos e/ou móveis
	Crescimento das larvas	Desenvolvimento	Medição do tamanho da larva de <i>C. sancticaroli</i> no Programa ImageJ; observação do surgimento de organismos machos de <i>D. magna</i> e contagem de exúvias
	-	Reprodução	Contagem de neonatos
	Crescimento das larvas	-	Medição do tamanho da larva no Programa ImageJ
De Gerações	Deformidade do mento	-	Visual, com auxílio de microscópio óptico e Programa TSView
	Emergência	-	Visual: observação e contagem dos adultos emergidos fazendo a diferenciação entre macho e fêmea
	Fecundidade potencial	-	Visual com auxílio de microscópio óptico para medição do tamanho da asa da fêmea

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.1 Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com as substâncias de referência sugeridas pela literatura para cada organismo, sendo elas, o cloreto de potássio (KCl) para *C. sancticaroli* e o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para *D. magna* (Tabela 4-4). Foi mantida uma solução estoque para cada uma das substâncias de referência, que foram armazenadas em frascos da cor âmbar e refrigeradas a 5°C. A frequência dos testes de sensibilidade respeitou a disponibilidade dos macroinvertebrados *C. sancticaroli*. Para o cládocera *D. magna*, uma espécie que tipicamente habita ambientes temperados, os testes de sensibilidade foram realizados com maior frequência visando garantir que esse organismo-teste estava apto a ser utilizado para a realização dos testes ecotoxicológicos.

Tabela 4-4 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de sensibilidade para os organismos-teste.

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>D. magna</i>
Substância de referência	KCl	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Tipo de teste	Estático	Estático
Volume	250 mL	100 mL
Sedimento	50 g	Sem substrato
Quantidade de organismos	6 larvas III ou IV instar*	10 neonatos com menos de 24h de vida
Exposição	96 h	24 - 48 h
Número de réplicas	3	3
Aeração	Sem aeração	Sem aeração
Temperatura	$25 \pm 2^\circ\text{C}$	$20 \pm 2^\circ\text{C}$
Fotoperíodo	12h L: 12h E	16h L: 8h E
Alimentação	2 mg apenas no início	Sem alimentação
Resposta	Mortalidade	Imobilidade
Metodologia	OECD 235:2011; Fonseca, 1997	ABNT NBR 12713:2016; OECD 202:2004; OECD 211:2012

* as larvas de III e IV instar são facilmente identificadas ao final do teste devido seu tamanho e coloração e apresentam resposta próximas daquelas observadas para as larvas de I e II instar (FONSECA, 1997).

Fonte: Organizado pela autora.

Durante o teste, as larvas de III ou IV instar de *C. sancticaroli* foram expostas à solução-teste de cloreto de potássio (KCL) nas concentrações 0 (controle - apenas água deionizada e alimento), 2, 4, 6, 8 e 10 g.L⁻¹. Para realização do teste foi preparada uma solução-estoque na concentração de 100 g KCl.L⁻¹, a partir da qual foram feitas as diluições necessárias (Figura 4-8a).

Os neonatos com menos de 24h de *D. magna* foram expostos ao sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações 0 (controle), 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para realização do teste foi preparada uma solução-estoque na concentração de 10 $\text{mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$, com a qual foram feitas as diluições requeridas (Figura 4-8b). As concentrações utilizadas para cada substância de referência foram determinadas com base nas faixas de sensibilidade encontradas na literatura e na carta-controle do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA).

Figura 4-8 - Esquema de montagem de teste de sensibilidade de a) *Chironomus sancticaroli*, b) *Daphnia magna*.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Ao final de cada teste, foi contabilizado o número de organismos vivos ou móveis. A partir da porcentagem de mortalidade e/ou imobilidade observada para cada concentração da substância de referência foi determinada a concentração que causou efeito em pelo menos 50% da população (EC_{50} ou LC_{50}) com o auxílio de um algoritmo programado no *software R version 3.5.0* utilizando as extensões MASS e DRC. Os resultados dos testes foram armazenados no programa Microsoft Office Excel e exposto graficamente em uma carta-controle utilizando-se do *software Origin® 9.0*.

A carta controle foi gerada a partir dos testes realizados pelo grupo do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos no período de 2016 a 2018 e contempla os valores médios de EC_{50} ou LC_{50} e seus limites inferiores e superiores.

4.3.2 Teste ecotoxicológico de curta duração

O teste de curta duração representa um teste preliminar da ecotoxicidade aguda da cafeína que avaliou apenas os efeitos tóxicos observados para as concentrações consideradas ambientalmente relevantes. Para tanto foram observadas as taxas de sobrevivência de

C. sancticaroli pela contagem dos organismos vivos e a taxa de imobilidade de *D. magna* pela observação de organismos móveis. Os parâmetros utilizados para realização dos testes de curta duração nos organismos estão descritos na Tabela 4-5.

Tabela 4-5 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de curta duração.

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>D. magna</i>
Solução-teste (concentração da cafeína)	0, 5, 15, 30, 127 e 200 µg L ⁻¹	
Tipo de teste	Estático	
Volume	250 mL	100 mL
Sedimento	50 g	Sem substrato
Quantidade de organismos	6 larvas III ou IV instar	10 neonatos com menos de 24h de vida
Exposição	96 h	48 h
Número de réplicas	3	3
Aeração	Sem aeração	Sem aeração-
Temperatura	25 ± 2 °C	20 ± 2 °C
Fotoperíodo	12h L: 12h E	16h L: 8h E
Alimentação	2 mg apenas no Início	Sem alimentação
Resposta analisada	Sobrevivência	Imobilidade

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Os testes de curta duração que analisou a toxicidade aguda da cafeína em concentrações até agora detectadas em corpos hídricos com a espécie *C. sancticaroli* foram realizados a fim de observar a taxa de sobrevivência dos organismos de acordo com as recomendações de FONSECA (1997) e NOVELLI (2010). As larvas de III ou IV instar foram expostas, por 96 h, a 250 mL da solução-teste, dispostas em béqueres de vidro de 1000 mL contendo 50 g de areia previamente tratada. Os testes foram realizados em triplicata e de maneira estática, ou seja, sem renovação da solução-teste e sem aeração. Os béqueres foram cobertos por tule transparente a fim de evitar a evasão dos mosquitos alados e a montagem do teste seguiu o esquema apresentado na Figura 4-8a.

Já para a realização do teste de curta duração com a espécie *D. magna* utilizou-se o protocolo proposto pela OECD (2004) e ABNT (2016). Os neonatos (com menos de 24 horas de idade) foram expostos por 48 h à 100 mL da solução-teste, contidos em béqueres de vidro com capacidade de 100 mL como apresentado na Figura 4-8b. Os testes foram realizados em duplicata

e de maneira estática, ou seja, sem substituição da solução-teste. Os béqueres foram cobertos por filme plástico transparente a fim de evitar a evaporação do meio e mantidos em incubadora BOD, com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro.

4.3.3 Teste de ecotoxicidade crônica

Os testes de ecotoxicidade crônica foram realizados a fim de analisar os possíveis efeitos da cafeína nos organismos quando expostos por um período de tempo prolongado às concentrações detectadas em corpos hídricos e em um cenário estimado (condição controle, 5, 15, 30, 127 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Os testes de ecotoxicidade crônica foram realizados de acordo com as características apresentadas na Tabela 4-6.

Tabela 4-6 - Parâmetros utilizados para a realização do teste de ecotoxicidade crônica.

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>D. magna</i>
Solução-teste (concentração da cafeína)	0, 5, 15, 30, 127 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$	
Tipo de teste	Estático	Semi-estático
Volume	250 mL	100 mL
Sedimento	50 g	Sem substrato
Quantidade de organismos	6 larvas do I instar	1 neonato com menos de 24 h de vida
Exposição	10 d	21 d
Número de réplicas	3	10
Aeração	Constante	Sem aeração
Temperatura	25 ± 2 °C	20 ± 2 °C
Fotoperíodo	12h L: 12h E	16h L: 8h E
Alimentação	2 mg no início e no meio do teste	a cada 48 h*
Resposta analisada	Sobrevivência, Crescimento	Imobilidade, Desenvolvimento

* seguindo a rotina de troca do cultivo

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

As respostas observadas para o teste de toxicidade crônica foram:

- porcentagem de sobreviventes de *C. sancticaroli* e porcentagem de organismos móveis para *D. magna*;

- crescimento da larva de *C. sancticaroli*: os organismos foram fixados em álcool isopropílico (99,8% puro) e dispostos em lâminas sobre folha milimetrada. O comprimento das larvas foi estimado com o auxílio do programa ImageJ 1.52a (RASBAND, 2018);
- desenvolvimento de *D. magna*: ocorreu por meio da observação da quantidade de organismos que se desenvolveram como fêmeas ou machos; da avaliação diária da troca de instar e, da contagem diária de neonatos por réplica.

Os testes de toxicidade crônica com *C. sancticaroli* foram realizados de acordo com as recomendações de DORNFELD (2006) e FONSECA (1997). As larvas de I instar foram expostas por 10 dias à 250 mL da solução-teste e dispostas em béqueres de vidro de 1000 mL contendo 50 g de areia previamente tratada (Figura 4-9.a). Os béqueres foram cobertos por tule para evitar a evasão de adultos. Os testes foram realizados em triplicata, com aeração constante e alimentação a cada cinco dias.

Para a *D. magna*, foi utilizado o protocolo da OECD (2012). Os neonatos (com menos de 24 horas de idade) foram expostos à 100 mL da solução-teste contida em béqueres de vidro por 21 dias (Figura 4-9.b). Os testes foram realizados em 10 réplicas para cada concentração, de maneira semi-estática, havendo renovação do meio nos mesmos dias da troca do meio de cultura do cultivo. Os béqueres foram cobertos por filme plástico transparente a fim de minimizar a evaporação do meio. Foi adicionado 1 neonato em cada réplica, alimentado com 3×10^5 células.mL⁻¹ e aditivo alimentar (ração Tetramin® e fermento biológico) na proporção de 1 mL para cada litro de meio.

Figura 4-9 - Esquema de montagem de teste de toxicidade crônica de a) *Chironomus sancticaroli*, b) *Daphnia magna*.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Para avaliar mudanças no ciclo de vida de *D. magna* foram aplicados dois índices: Índice de Inibição ou Indução de Produção de Neonatos (%I_N) e Índice de Retardo ou Aceleração de Ecdise (%I_E). O %I_N apresenta informações sobre os efeitos na reprodução dos organismos, enquanto o %I_E apresenta informações sobre o desenvolvimento dos indivíduos, uma vez que a ecdise está relacionada à troca de instar.

Ambos os índices levam em consideração as condições observadas no controle (sem adição de cafeína) em comparação com àquelas observadas na presença de cafeína. Os índices foram calculados a partir de uma adaptação de Sierra-Alvarez; Lettinga (1991), conforme a Equação 1:

$$\% I_{M/N} = ((A2_{\text{cafeína}} - A2_{\text{controle}}) / A2_{\text{controle}}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo, “A2_{cafeína}” = número máximo de exúvia ou valor máximo de produção de neonatos para cada concentração de cafeína; “A2_{controle}” = número máximo de exúvia ou valor máximo de produção de neonatos para condição controle.

Para o índice de reprodução, o resultado foi analisado da seguinte maneira: quando %I_N for maior que 0, houve indução na produção de neonatos; caso contrário, ocorreu inibição na produção de neonatos. Já para o índice de desenvolvimento, quando %I_E for maior que 0, houve aceleração no desenvolvimento dos organismos (atingiu um instar mais alto durante o mesmo período de tempo); caso contrário, ocorreu um retardo no desenvolvimento dos organismos.

A comparação entre os índices permite observar se o desenvolvimento e a reprodução dos indivíduos expostos à cafeína seguiram um mesmo padrão ou se o organismo priorizou a realização de um ou outro durante a realização do teste de ecotoxicidade crônica.

A contagem das exúvias foi feita sempre que o organismo ficava totalmente fora da carapaça (Figura 4-10).

Figura 4-10 – Ilustração de exúvias de *Daphnia magna*.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

4.3.4 Teste de geração – *Chironomus sancticaroli*

O teste de geração (toxicidade crônica de longa duração) foi realizado a fim de observar se ocorre alguma mudança no padrão de desenvolvimento dos organismos quando exposto à cafeína durante três gerações consecutivas (geração P – parental, geração F1 e geração F2), abrangendo, portanto, todo o ciclo de vida do organismo e suas gerações subsequentes. Nesse teste analisou-se mudanças nos padrões de crescimento, fecundidade potencial, presença de deformidade no mento e proporções de emergência de adultos dos organismos. As respostas analisadas nesse teste ecotoxicológico foram:

- crescimento: análise do comprimento do corpo com auxílio do Programa ImageJ 1.52a (RASBAND, 2018);
- fecundidade potencial: analisada por meio da medida da asa da fêmea em microscópio óptico da marca Quimis® segundo recomendações de Trivinho-Strixino (1980);
- deformidade do mento em larvas de *C. sancticaroli*: análise visual por meio de fotografias tiradas com o auxílio do *software* PSView;
- emergência: observação diária da emergência de adultos, analisando além do tempo decorrido para a emergência, a proporção entre machos e fêmeas.

As características gerais do teste de geração estão descritas na Tabela 4-7.

Tabela 4-7 - Parâmetros utilizados para a realização do teste ecotoxicológico de gerações – *Chironomus sancticaroli*.

<i>C. sancticaroli</i>	
Solução-teste (concentração da cafeína $\mu\text{g L}^{-1}$)	0, 5, 15, 30, 127 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$
Tipo de teste	Semi-estático*
Volume	300 mL
Sedimento	50 g
Quantidade de organismos	15 larvas do I instar (geração P) 45 larvas do I instar (geração F1 e F2)
Exposição	Indeterminado
Número de réplicas	3
Aeração	Constante
Temperatura	$25 \pm 2^\circ\text{C}$
Fotoperíodo	12h L: 12h E
Alimentação	2 mg duas vezes na semana
Resposta analisada	Crescimento, fecundidade potencial, deformidade do mento, emergência

* havendo reposição do meio caso percebido evaporação

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

O teste foi desenvolvido seguindo adaptações de BERNEGOSI et al. (2019). A partir de aproximadamente 15 larvas, que se encontravam no I instar (geração P), foram montadas triplicatas para cada concentração. As larvas foram dispostas em béqueres de vidro, com capacidade de 1000 mL, contendo 50 g de sedimento (areia previamente tratada), e 300 mL de solução-teste. Os béqueres foram cobertos com um pedaço de tecido tule preso por elástico para evitar que os organismos alados não escapassem e possibilitar o acasalamento. Os testes com a segunda e terceira geração (F1 e F2), foram montados com as desovas produzidas para cada concentração na geração P e F1, respectivamente. Após o surgimento de uma desova, a mesma foi separada e mantida sob baixa aeração (bolhas de ar não contínuas) em uma placa de Petri contendo uma mistura de solução-teste e água deionizada até a sua eclosão e posterior montagem do teste (Figura 4-11).

Figura 4-11: Fotos da observação de uma desova e do recipiente em que a desova ficava até a eclosão.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

A amostragem de larvas para análise do comprimento corporal foi realizada após 11 dias do início de teste para cada geração e concentração de cafeína. O teste foi considerado finalizado quando não havia mais larvas vivas em nenhuma das réplicas. Um esquema representativo das etapas do teste de gerações está apresentado na Figura 4-12.

Figura 4-12: Teste de geração – *Chironomus sancticaroli* - a) larva no I ínstar, b) béquer de vidro com 300 mL de solução-teste e c) 50 g de sedimento d) larvas IV ínstar e) emergência de adultos f) desova g) eclosão das larvas.

Fonte: Adaptado de Bernegossi et al. (2019).

Para facilitar a medição do comprimento, as asas (direita e esquerda) das fêmeas de cada condição testada foram desanexadas com o auxílio de uma pinça, posteriormente foram coradas utilizando como corante a fucsina ácida (Marca Synth, adquirido pela empresa Sigma-Aldrich®, C.I. 42685 – utilizada para coloração de seções histológicas), fixadas em lâminas com Bálsamo do

Canadá (Laboratório Vetec Química Fina, adquirido pela empresa Sigma-Aldrich®) e, finalmente cobertas por lamínula. A estimativa da fecundidade potencial da fêmea adulta foi realizada conforme metodologia recomendada por Trivinho-Strixino (1980) para a espécie *C. sancticaroli*. Assim, o número de ovos da primeira desova presente no ovário das fêmeas foi estimado por meio da Equação 2:

$$F = (k * L) - m \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo, “F” fecundidade potencial, “k” uma constante (471,64), “L” o comprimento da asa (medido com o auxílio de uma lente graduada acoplada a um microscópio óptico da marca Quimis® com aumento de 200 X e considerando a distância entre a alula e a ápice – Figura 4-13) e “m” uma constante (707,41).

Figura 4-13 – Exemplificação da medição do comprimento da asa da fêmea de *Chironomus sancticaroli*.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

Para a análise da presença de deformidade do mento, a cápsula cefálica dos organismos previamente fixados no álcool isopropílico foram dispostos dorso-ventralmente em lâminas semi-permanentes contendo Bálsamo do Canadá. As cápsulas cefálicas foram cobertas com lamínulas e mantidas em estufa a temperatura de 55°C por 72h para secagem do meio. A análise foi feita por meio de imagens capturadas com o *software* TSVIEW em microscópio óptico da marca Nikon Eclipse E200, com aumento de 10 e 40 x (Figura 4.14). Foram consideradas deformidade do mento: a presença de “gap”, a adição de dentes ou dentes tortos.

Figura 4-14 – Equipamentos e *software* utilizados para observação das cápsulas cefálicas de *Chironomus sancticaroli* para a análise da presença de deformidade do mento.

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos foram analisados no software Past® (*Paleontological Statistics*) versão 3.21 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Para avaliar seu enquadramento em uma distribuição normal foi aplicado o Teste de Levene para comparação das médias e homogeneidade da amostra. Quando os resultados seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste de análise de variância das médias (ANOVA) e o Teste de Tukey.

Quando a distribuição dos resultados não seguia a normalidade, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Sendo observada diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis, o teste Post-hoc de Dunn's foi aplicado para verificar em quais concentrações essas diferenças estavam presentes.

Além disso, os resultados dos testes agudos, crônicos e teste de geração registrados em planilha gerada no *software* Microsoft Office® Excel, foram analisados em gráfico de barras com desvio-padrão, originados pelo *software* Origin 2018. Quando possível, foi aplicado o Índice de Similaridade de Bray-Curtis a partir da análise de agrupamentos de Cluster como uma análise descritiva para verificação da similaridade entre as concentrações de cafeína utilizadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de sensibilidade

A avaliação da sensibilidade permite garantir que a resposta de sensibilidade do organismo às substâncias a serem testadas, esteja de acordo com o nível de tolerância dos mesmos, sem que fatores externos, como a temperatura, influenciem nessas respostas.

Desse modo, a porcentagem de mortalidade e/ou imobilidade foi calculada ao final de cada teste de sensibilidade para cada concentração da substância de referência. A partir desse valor, foi realizado o teste estatístico para determinação da concentração que causou efeito em pelo menos 50% da população (EC₅₀ para *D. magna* ou LC₅₀ para *C. sancticaroli*). Sabendo os valores de LC₅₀ ou EC₅₀, as médias e os desvios padrão do teste, foram determinados os limites inferiores e superiores da faixa de sensibilidade. Os resultados dos testes foram expostos graficamente em cartas-controle. As cartas controle, foram geradas a partir dos testes realizados pelo grupo do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) no período de 2016 a 2018, e contemplam os valores médios de EC₅₀ ou LC₅₀ e seus limites inferiores e superiores.

O inseto *C. sancticaroli* apresentou variação de sensibilidade à substância KCl dentro de um intervalo de 3,20 a 7,49 g.L⁻¹, com média de 5,35 g.L⁻¹. Os resultados de sensibilidade encontrados pelo grupo LEAA estão próximos daqueles descritos na literatura para os organismos da espécie *C. sancticaroli* expostos ao KCl. Da Costa et al. (2014) e Moraes et al. (2014) obtiveram resultados de LC₅₀ variando entre 3,2 a 5,2 g.L⁻¹ e 2,38 a 5,41 g.L⁻¹, respectivamente. Sueti et al. (2015) por sua vez encontraram faixa de sensibilidade variando entre 3,1 a 6,4 g.L⁻¹, valores próximos ao observado por Dell'Acqua (2017) em seu estudo (LC₅₀ variando entre 4,02 a 6,04 g.L⁻¹). Portanto, a faixa de sensibilidade encontrada nesse estudo para *C. sancticaroli* corrobora com os resultados apresentados na literatura, tornando viável a utilização dos organismos criados no laboratório, para uso em ensaios ecotoxicológicos, desde que apresentem sensibilidade nesta faixa.

Os resultados de EC₅₀ encontrados para cada teste de sensibilidade realizado com a espécie *D. magna* são apresentados na Tabela 5-1.

Tabela 5-1 - Resultados de sensibilidade de *Daphnia magna* ao sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), expressos em valores EC_{50} , com seu respectivo erro associado e os seus limites de 95% de confiança gerados no *software R*, para organismos cultivados e mantidos a 20°C e 16h luz e 8h escuro.

Núm. do teste	Data	EC_{50}	Erro	Limite inferior	Limite superior
1	jun/16	0,104	0,001	0,102	0,105
2	set/16	0,051	0,000	0,051	0,051
3	out/16	0,059	0,000	0,058	0,059
4	dez/16	0,075	0,000	0,074	0,076
5	fev/17	0,097	0,000	0,097	0,098
6	jun/17	0,043	0,000	0,042	0,044
7	ago/17	0,043	0,000	0,042	0,044
8	ago/17	0,056	0,000	0,056	0,057
9	set/17	0,049	0,000	0,049	0,049
10	out/17	0,078	0,000	0,078	0,079
11	dez/17	0,045	0,000	0,044	0,045
12	fev/18	0,039	0,000	0,038	0,040
13	abr/18	0,018	0,000	0,018	0,018
14	abr/18	0,036	0,000	0,035	0,037
15	mai/18	0,057	0,000	0,056	0,057
16	mai/18	0,043	0,000	0,043	0,044
17	jul/18	0,029	0,000	0,028	0,030
18	ago/18	0,045	0,000	0,045	0,046
19	ago/18	0,047	0,000	0,046	0,048
20	set/18	0,030	0,000	0,030	0,030
21	set/18	0,035	0,000	0,034	0,036
22	set/18	0,063	0,000	0,062	0,063
23	out/18	0,028	0,000	0,028	0,028

Fonte: LEAA (Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos) (2018).

No período de junho de 2016 a outubro de 2018, a EC_{50} variou de 0,018 a 0,104 $\text{mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$, com valor médio de 0,05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 5-1). Os valores de EC_{50} relatados pela literatura para a espécie *D. magna* utilizando o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, como substância de referência, são: 0,045 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (ARAUCO; CRUZ; MACHADO NETO, 2005); 0,034 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (BASTOS, 2013) e 0,0546 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (STRUEWING et al., 2015). Portanto, a resposta média de EC_{50} obtida encontra-se próxima aos valores descritos na literatura, sendo considerados válidos os testes ecotoxicológicos realizados no período de 2016 a 2018.

Figura 5-1 - Carta-controlé gerada para *D. magna* exposta ao $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como substância de referência, no período de 2016 a 2018, contendo o valor médio de EC_{50} e os limites de 95% de confiança (± 2 desvios padrão).

Fonte: LEAA (Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos) (2018).

Conforme observado na Figura 5-1, na maioria do período estudado (2016 a 2018), a espécie *D. magna* apresentou sensibilidade dentro dos limites determinados. Porém, em dois testes (julho de 2016 e fevereiro de 2017) os organismos se apresentaram menos sensíveis, sendo assim, os testes ecotoxicológicos desenvolvidos nesses dois meses foram desconsiderados.

5.2 Teste ecotoxicológico de curta duração

Os testes ecotoxicológicos de curta duração foram realizados para verificar se a cafeína, em concentrações já reportadas no meio ambiente, tinha como consequência algum efeito de toxicidade aguda sobre os organismos-teste. A porcentagem de sobrevivência e o desvio-padrão para cada concentração de cafeína está expressa em forma de gráfico de barras.

De acordo com os ensaios realizados, pode-se observar que a taxa de sobrevivência de *C. sancticaroli* quando exposto à cafeína por intervalo de tempo considerado curto (96h), é alta e variou de 80% a 100% (Figura 5-2). A menor sobrevivência (80%), foi observada para a concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$. Durante os testes realizados *C. sancticaroli* o pH encontrava-se na

faixa de neutralidade (6,5 – 7,5) e a condutividade elétrica variando de 6 a 16 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ (água deionizada com alimento), sendo esses valores próximos aos monitorados no cultivo.

Figura 5-2 – Índice de sobrevivência (%) para o organismo *Chironomus sancticaroli* durante o teste ecotoxicológico de curta duração (96 h), mantendo a temperatura em $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e o fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Para a espécie *D. magna*, a cafeína não apresentou toxicidade aguda, havendo 100% de sobrevivência para todas as réplicas e em todas concentrações testadas (Figura 5-3). O pH e a condutividade elétrica apresentaram baixas variações entre o início e o final dos testes. Assim, durante a realização dos testes, o pH variou de 7,8 a 8,0 e a condutividade elétrica, entre 417 a 476 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$. Estes valores encontram-se dentro da faixa recomendada para a sobrevivência dos organismos (OECD, 2004).

Figura 5-3 – Índice de mobilidade (%) para o organismo *Daphnia magna* durante o teste ecotoxicológico de curta duração (48 h), mantendo a temperatura em $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ e o fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

As taxas elevadas de sobrevivência e mobilidade, encontrados nessa pesquisa, estão dentro do esperado, uma vez que na literatura, os efeitos de letalidade da cafeína começam a ser observados para concentrações na ordem de mg.L^{-1} . Em estudo desenvolvido por Aguirre-Martínez et al. (2015), foram observados efeitos de inibição no crescimento da microalga marinha *Isochrysis galbana* apenas nas concentrações de 100 e 500 mg.L^{-1} (Concentração de Inibição - IC_{50} de 405,7 mg.L^{-1}) e para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de 500 mg.L^{-1} ($\text{IC}_{50} > 500 \text{ mg.L}^{-1}$). Ainda com relação ao encontrado por Aguirre-Martínez et al. (2015), a espécie que mostrou maior sensibilidade à cafeína foi o ouriço *Paracentrotus lividus*, cujo EC_{50} referente ao desenvolvimento larval foi de 0,0002 mg.L^{-1} . Em outro estudo, realizado com o peixe *Carassius auratus*, não foi observado efeito de mortalidade, porém, notou-se uma diminuição na atividade da enzima acetilcolinesterase responsável por auxiliar o animais em situações de fuga e obtenção de alimento quando exposto a concentrações de 0,0032 a 10 mg.L^{-1} (LI et al., 2012).

Bang et al. (2015), estudaram o efeito agudo da cafeína em concentrações letais (na ordem de mg.L^{-1}) e observaram EC_{50} de 445,3 mg.L^{-1} para *D. magna*. Além disso os autores constataram que cinco genes apresentaram diferentes padrões de resposta quando expostos à cafeína. Em estudo realizado por Chevalier et al., 2015, foi verificado que o cladócer *D. magna* é relativamente

resistente à cafeína, apresentando EC_{50} de $177,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Não foi encontrado nenhum trabalho que avaliou o efeito da ecotoxicidade aguda da cafeína na espécie *C. sancticaroli*. Entretanto, Moore et al. (2008), obtiveram LC_{50} igual a 1230 mg.L^{-1} para a espécie *Chironomus dilutus* como resultado de testes ecotoxicológicos e concluiu que a cafeína pode apresentar risco para a maioria dos invertebrados e vertebrados aquáticos.

A partir dos efeitos de sobrevivência, para o intervalo de concentrações testadas, foi realizado a análise de agrupamento hierárquico Cluster para *C. sancticaroli* aplicando-se o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis com coeficiente de correlação cofenética de 0,8755 (Figura 5-4). Para o organismo *D. magna* não foi possível aplicar testes estatísticos devido à similaridade dos resultados, contendo 100% de sobrevivência em todas as concentrações testadas.

Figura 5-4 – Similaridade dos efeitos das concentrações de cafeína para *Chironomus sancticaroli*, com coeficiente de correlação cofenética de 0,8755.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Conforme observado, o controle e a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentam 100% de similaridade, a concentração de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou 83% de similaridade com o controle e com a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já as concentrações mais altas (30, 127 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$) apresentaram 73%

de similaridade com as demais, sendo o índice de similaridade da concentração $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ com as concentrações 30 e $127 \mu\text{g.L}^{-1}$ de 87%. Então, é possível observar que a taxa de similaridade entre as concentrações estudadas é elevada e, portanto, não foram observadas respostas de sobrevivência muito distintas. Segundo constatações do estudo desenvolvido por Hann (1991), alterações na densidade populacional da família Chironomidae causa impacto direto na população de algas, sendo observada menor densidade algal, quando a densidade de Chironomidae se eleva. Portanto, uma diminuição de 20% na população da espécie pode causar alterações na comunidade local, aumentando, por exemplo, as populações de algas.

Além disso, como os resultados de sobrevivência de *C. sancticaroli* por concentração, não seguem uma distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando coeficiente de confiança de 95%. Como resultado, foi obtido p-valor igual a 0,01435, o que indica diferença significativa entre as médias. Como a hipótese nula foi rejeitada, aplicou-se o teste Post Hoc de Dunn's, para verificar detalhadamente onde estava ocorrendo a diferença, resultando em diferença significativa entre a concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ com o controle e com a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ (p igual a 0,0008 e 0,0533, respectivamente) (Tabela 5-2).

Tabela 5-2 – Teste de comparação múltipla, Post Hoc de Dunn's, avaliando as concentrações de cafeína utilizadas no teste agudo, destacando-se em vermelhos os resultados de p-valor $\leq 0,05$.

	0	5	15	30	127	200
0		0,6991	0,3026	0,1221	0,2209	0,0030
5	0,6991		0,1564	0,0533	0,1073	0,0008
15	0,3026	0,1564		0,6063	0,8467	0,0533
30	0,1221	0,0533	0,6063		0,7474	0,1564
127	0,2209	0,1073	0,8467	0,7474		0,0819
200	0,0030	0,0008	0,0533	0,1564	0,0819	

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Esse resultado corrobora com as demais análises, uma vez que as respostas de sobrevivência dos organismos na concentração de 0 (controle) e $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram similares e a concentração que teve o maior efeito foi a de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$.

5.3 Teste de ecotoxicidade crônica

Foi realizado teste de ecotoxicidade crônica para verificar mudanças nos padrões de ciclo de vida dos organismos.

5.3.1 *Chironomus sancticaroli*

Analisando-se a sobrevivência de *C. sancticaroli*, observam-se menores porcentagens para as concentrações de 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (83 e 78%, respectivamente), sendo a menor sobrevivência resultante da condição de exposição a 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína (Figura 5-5). O fato de haver maior sobrevivência na concentração mais alta (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$), pode indicar que a mortalidade ocorrida em menores concentrações seja devido a fatores como estresse físico e outros que não a toxicidade do composto (DELL'ACQUA, 2017; VIVEIROS, 2012). Ao comparar as respostas nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica, infere-se que a sobrevivência das larvas de I instar do organismo, se mostrou próxima à observada no teste de ecotoxicidade aguda (larvas de III e IV instar). Apesar de constatar uma queda na sobrevivência nas concentrações de 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$, o teste de Kruskal-Wallis apresentou p-valor igual a 0,09458 e, portanto, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre a condição com e sem cafeína (DORNFELD, 2006).

Figura 5-5 - Taxa de sobrevivência da espécie *Chironomus sancticaroli* quando exposta à cafeína em teste de ecotoxicidade crônica (10 dias), mantendo a temperatura em $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e o fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro, com seus respectivos desvio-padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Com o intuito de avaliar a dissimilaridade entre as concentrações de cafeína e seus efeitos na sobrevivência dos organismos foi realizada a análise de agrupamento hierárquico de Cluster, aplicando-se o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis com coeficiente de correlação cofenética de 0,8618 (Figura 5-6).

Figura 5-6 – Dissimilaridade dos efeitos das concentrações de cafeína para *C. sancticaroli*, com coeficiente de correlação cofenética de 0,8618.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Segundo a Figura 5-6, o índice de dissimilaridade entre o controle e a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ é nulo, a concentração de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou 17% de dissimilaridade quando comparado com o controle e a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Foram observados dois grandes grupos, e conforme já verificado na análise descritiva pelo gráfico, as concentrações 30 e $127 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram dissimilaridade de 30% com relação as demais. De qualquer modo, como as taxas de sobrevivência não foram muito distintas, o índice de similaridade foi de aproximadamente 70% para todas as concentrações e o controle, sendo inferida uma diferença das respostas para as concentrações de 30 e $127 \mu\text{g.L}^{-1}$, que podem estar relacionadas à erros de manuseio no desenvolvimento do teste ou à influência da cafeína de maneira mais efetiva nessas concentrações para esses organismos.

Ao final do teste, os organismos foram fixados em álcool isopropílico e, após, foram fotografados e medidos com o auxílio do programa ImageJ (Figura 5-7).

Figura 5-7 – Ilustração do procedimento para realização das medidas de comprimento de larva de *Chironomus sancticaroli* por meio do programa ImageJ e geração da tabela de dado.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

O resultado obtido para os diferentes comprimentos, foi exposto em um gráfico de barras com desvio-padrão para avaliar de maneira descritiva as diferenças no padrão do tamanho das larvas quando expostos às diferentes concentrações de cafeína (Figura 5-8).

Figura 5-8 – Comprimento médio das larvas de *Chironomus sancticaroli* após teste de ecotoxicidade crônica (10 dias) com seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Conforme observado, o tamanho médio das larvas variou de aproximadamente 8 mm a cerca de 11 mm. As larvas do controle ficaram dentro dos limites esperados para a espécie, de 9,91 a 13,64 mm (TRIVINHO-STRIXINO, 1980). Foram observados maiores comprimentos nas concentrações de 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com variabilidade maior que a da faixa do controle. As concentrações de 5,15 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram comprimento do corpo menor do que o do controle, porém, dentro da faixa do desvio-padrão. Para verificar a presença de diferença estatística entre as concentrações, foi aplicado o teste estatístico Tukey's uma vez que os resultados seguem uma distribuição normal ($p = 0,0007578$) no teste One-Way ANOVA.

O resultado do teste Tukey's para o comprimento do corpo da larva apontou para diferença estatisticamente significativa entre a concentração 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o controle ($p = 0,02395$) e entre a concentração 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e as concentrações 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0,003058$ e $0,009515$, respectivamente).

Apesar do que foi apontado na análise estatística, é interessante observar que as concentrações que apresentaram menor taxa de sobrevivência (30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$), também apresentaram maior comprimento da larva. A relação entre tamanho da larva e sobrevivência, pode estar associada à atuação da cafeína como agente metabólico estimulante (KOLPIN; MEYER, 2002) ou à maior disponibilidade de alimento, visto que sobraram menos larvas para comer. Além disso, as concentrações de agentes tóxicos podem afetar o crescimento ótimo dos organismos, a assimilação de alimento e a distribuição de energia para as atividades de crescimento, emergência e reprodução (PÉRY et al., 2002). A cafeína, por exemplo, em concentrações de 3 a 18 $\mu\text{g.L}^{-1}$ aumentou a atividade metabólica de moluscos bivalves (*Ruditapes philippinarum*), reduzindo suas reservas de energia, induzindo ao estresse e aumentando seus mecanismos de defesa (CRUZ et al., 2016). Nessa mesma faixa de concentração, Pires et al. (2016), observaram impacto negativo da substância na capacidade regenerativa dos anelídeos pertencentes à espécie *Diopatra neapolitana*. Mudanças fisiológicas também foram observadas por Pollack; Balazs; Ogunseitan, (2009), ao analisarem as repostas biológicas de quatro espécies de alga, sendo constatada maior alteração em proteínas de choque térmico e no controle de atividade regulatória de proteínas.

Portanto, as respostas de *C. sancticaroli*, quando exposto à cafeína por um período prolongado, compreendendo boa parte de seu desenvolvimento no ambiente aquático, sugerem que essa substância apresenta efeito tóxico para as larvas, sendo que a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ é diferente estatisticamente do controle no que se diz respeito ao tamanho das larvas.

5.3.2 *Daphnia magna*

A longevidade dos organismos no teste de ecotoxicidade crônica foi avaliada considerando a quantidade de organismos vivos ao final dos 21 dias. Ao total foram realizados três testes crônicos, sendo o primeiro realizado em dezembro de 2017 de caráter exploratório e contendo apenas as concentrações de cafeína de 5, 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Foi observada imobilidade acima de 20% no controle, no teste realizado em maio de 2018 (30%), valor considerado acima do intervalo de confiança recomendado pela OECD (OECD, 2012). Segundo o protocolo, a porcentagem de imobilidade de 20% corresponde a uma variação que pode ser considerada normal, como efeito do estresse de manuseio durante o teste. Optou-se por considerar o teste para critério de análise dos efeitos da cafeína, uma vez que a terceira imobilidade ocorreu apenas no último dia de teste (Figura 5-9).

Figura 5-9 – Longevidade dos organismos *Daphnia magna* apresentada em número de organismos vivos por concentração de cafeína após 21 dias, destacando-se os dias em que foi observada a imobilidade.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A partir do exposto na Figura 5-9, verifica-se menor sobrevivência para a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, apontando 30% de imobilidade da espécie em ambos testes. Também foram observadas

taxas de sobrevivência de 70% nas concentrações de 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As imobilidades que ocorreram nos últimos dias de teste, podem estar associadas às causas naturais e não à atuação do contaminante.

De acordo com o estimado por Rodriguez-Gil et al (2018) os efeitos de toxicidade aguda da cafeína em dáfias corresponde a uma concentração de efeito em 50% dos organismos (CE_{50}) de 11.992 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, Aguirre-Martínez; Del Valls e Martín-Díaz, (2013), observaram que a cafeína em concentrações subletais causa stress no ciclo de vida do crustáceo *Carcinus maenas*, sendo verificadas alterações metabólicas dos organismos. Dentre elas, a atividade de etoxisorufina o-detilase – EROD, que é um marcador da atividade enzimática, aumentou significativamente nas atividades da glândula digestiva do fígado. Além disso, ocorreu um aumento da atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase - GPX em concentrações de 15 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína. Além disso, os autores afirmam haver indicação de danos ao DNA nos organismos-teste na concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Para os testes de ecotoxicidade crônica realizados, foram observados o surgimento de machos nas seguintes situações: em concentração de 5 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no teste realizado em dezembro de 2017, todas as condições com exceção de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no teste realizado em abril de 2018 e na concentração de 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no teste realizado em maio de 2018. O surgimento de machos pode estar associado ao estresse e condições ambientais não favoráveis, sendo possível verificar o dimorfismo sexual pelo tamanho do corpo (machos muito inferiores às fêmeas) e as primeiras pernas dos machos que são utilizadas para se fixarem (DODSON; CÁCERES e ROGERS, 2010). A partir disso, não é possível associar a mudança do gênero do organismo à presença de cafeína.

Com relação aos parâmetros associados ao ciclo de vida de *D. magna*, na solução-controle, foi observada a primeira ninhada de neonatos entre os dias 8 e 10 (Figura 5-10), dentro do esperado para a espécie, que possui amadurecimento sexual entre o quinto e o décimo dia de vida (EBERT, 2005). Foi observada alteração no tempo para a primeira ninhada na concentração de 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ninhada entre os dias 8 e 12) e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ninhada entre os dias 10 e 14). Além disso, em abril de 2018 na concentração de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ o dia da primeira ninhada ocorreu entre os dias 10 a 15.

De acordo com a análise estatística realizada, apenas para o teste de dezembro de 2017 foi verificada diferença estatística significativa no Teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,04183$). Aplicando-se o Dunn's Test, observou-se que a diferença ocorreu entre o controle e as concentrações de 5 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (p valor de 0,04205 e 0,01109, respectivamente), sendo nessas concentrações observado

que a postura de neonatos ocorreu em um período de tempo menor que o do controle, porém dentro da faixa esperada para a espécie (5 a 10 dias).

Figura 5-10 – Dia referente a primeira ninhada de neonatos a partir do início do teste de ecotoxicidade crônica com *Daphnia magna*, descrito por concentração de cafeína e contendo seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Outra característica dessa espécie é realizar, durante seu período de vida, de três a cinco ninhadas (RAND, 1995). Foi realizada a contagem de ninhadas de neonatos durante os 21 dias de testes, e o resultado está expresso na Figura 5-11. Foi considerado para o cálculo, o número de ninhada de todos os organismos que realizaram pelo menos uma ninhada durante sua vida. De forma geral, em todos os testes e para todas as concentrações o número de ninhada esperado foi encontrado (entre 3 e 5 ninhadas).

Aplicando-se o Dunn's test comparando o dia da primeira ninhada para todas as condições de teste, têm-se que as concentrações de 5 e 127 µg.L⁻¹ são estatisticamente diferente do controle no teste realizado em dezembro de 2017 (p-valor de 0,04205 e 0,01109, respectivamente). Para os demais meses nenhuma concentração de cafeína apresentou diferença estatística com relação ao controle para essa resposta.

Figura 5-11 – Número de ninhadas produzidas por concentração de cafeína durante os 21 dias do teste para *Daphnia magna*, com seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Ao aplicar o teste de normalidade, nenhum dos testes se enquadraram em uma distribuição normal e, portanto, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a presença de diferenças estatísticas. Corroborando com o observado na aplicação do mesmo teste para o dia da primeira ninhada, o único teste de ecotoxicidade crônica que apresentou diferença estatística, entre as concentrações de cafeína e o controle foi o realizado em dezembro de 2017 ($p = 0,04758$). No Dunn's Test, foi verificado que a diferença estatística ocorreu entre as concentrações 5 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ quando comparadas ao controle (p valor de 0,04672 e 0,009836, respectivamente).

O número médio de filhotes foi calculado a partir do total de neonatos produzidos para cada *Daphnia* dividido pelo número de ninhadas que a mesma fez durante seu tempo de vida (Figura 5- 12). Do ponto de vista da ecologia, a presença de substâncias químicas pode afetar a quantidade e a qualidade dos neonatos produzidos (CAMPOS et al., 2016). A qualidade dos neonatos não foi avaliada, e com relação à quantidade, foi verificado um aumento do número de neonatos na presença de cafeína nos testes realizados em dezembro de 2017 e em maio de 2018, enquanto que, para o teste realizado no mês de abril de 2018 foi verificado um decréscimo. Quando comparado aos valores de sensibilidade do organismo, percebe-se que *D. magna* responde à cafeína de duas maneiras distintas dependendo da sensibilidade dos organismos. Em abril, quando a

sensibilidade estava alta e o EC_{50} próximo ao limite inferior da faixa de sensibilidade, foi observada diminuição na produção de neonatos e pelo teste Two-Way ANOVA foi verificado diferença estatística entre os resultados obtidos nesse mês em comparação com os demais ($p \leq 0,05$). Tal alteração no ciclo de vida poderia gerar uma diminuição na população local em um corpo d'água que contenha cafeína, enquanto que nos meses em que a sensibilidade estava mais baixa, seria observado um aumento na população de dáfnias.

Figura 5-12 – Número médio de neonatos produzidos por fêmea durante o teste de ecotoxicidade crônica de 21 dias, com seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Em nenhum dos testes realizados, os resultados para o número de neonatos produzidos seguiram uma distribuição normal. Ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis foi verificado que não houve diferença estatística entre as concentrações de cafeína e o controle em nenhum dos testes realizados ($p > 0,05$).

Para complementar a análise, foi aplicado o Índice de Inibição e/ou Indução para a quantidade média de neonatos produzidos por concentração (Tabela 5-3). Verifica-se uma indução de 4 a 11% para o teste realizado em dezembro de 2017, sendo maior conforme o aumento da concentração. Para o teste de abril, predominou a inibição na produção de neonatos, com taxas de indução para as concentrações de 15 e 30 µg.L⁻¹ (+21 e +13%), sendo interessante observar que, a

maior inibição se deu na concentração mais alta. Apesar de em maio de 2018, também ser observada taxa de indução para todas as concentrações, diferente do observado em dezembro de 2017, a indução foi diminuindo a partir da concentração de 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Esses resultados corroboram e completam os resultados observados de forma descritiva na Figura 5-12.

Tabela 5-3 - Índice de indução e inibição para a produção média de neonatos em relação ao controle (%I_N), aplicado ao final do teste de ecotoxicidade crônica com *Daphnia magna*.

Conc.($\mu\text{g.L}^{-1}$)		Controle	5	15	30	127	200
Data							
Dez/17	A2*	16,98	17,65		17,75	18,93	-
	%I _N		+3,92%		+4,62%	+11,44%	-
Abril/18	A2*	12,04	11,52	14,60	13,62	11,36	10,18
	%I _N		-4,28%	+ 21%	+13,16%	-5,57%	-15,43%
Maio/18	A2*	15,30	18,02	18,26	16,65	16,44	16,34
	%I _N		+17,78%	+19%	+8,86%	+7,45%	+6,86%

*A2: representa o número máximo observado de neonato por fêmea

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Para analisar outro aspecto do ciclo de vida do organismo, foi realizada a contagem acumulada do número de ecdises de cada organismo durante o teste. Os resultados obtidos para a produção média de exúvias ao longo do teste, estão apresentados na Figura 5-13. Para o teste realizado em dezembro, as concentrações de 5 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cafeína, apresentam uma distribuição dentro dos limites daquela apresentada no controle, enquanto na concentração de 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi observado um número maior de produção de exúvias, sendo realizado 10 ecdises. Para os demais testes, o oposto foi observado, apesar do elevado desvio para a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, houve uma queda na produção de exúvias por parte de dáfias nas concentrações de 127 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O total de troca de exúvias em abril foi menor quando comparado a maio do mesmo ano, provavelmente reflexo da maior sensibilidade dos organismos no mês de abril.

Figura 5-13 – Número médio de exúvias produzidos por concentração de cafeína durante o teste de ecotoxicidade crônica de 21 dias, com seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Assim como o índice de inibição ou indução foi aplicado para a geração de neonatos, o índice de retardo ou aceleração foi utilizado para verificar as tendências do organismo com relação ao processo de ecdise durante o seu ciclo de vida. Conforme observado na Tabela 5-4, apenas o teste de dezembro de 2017 apresentou índice de aceleração, assim como apresentado para a geração de exúvias. Para o teste de abril de 2017 apesar da presença de retardo em todas as concentrações, a porcentagem de obtida no %I_E foi superior àquela apresentada para a geração de neonatos. O mesmo é observado para o teste realizado em maio de 2018, que apresentou índice de retardo variando de - 9 a - 5, enquanto havia apresentado indução para o parâmetro de geração de neonatos.

Tabela 5-4 - Índice de retardo ou aceleração para a geração de exúvias (%I_E), aplicado ao final do teste de ecotoxicidade crônica com *Daphnia magna*.

Data	Conc.(µg.L ⁻¹)	Controle	5	15	30	127	200
Dez/17	A2	7	7	-	7,3	8,1	-
	%I _E	-	+0,00%	-	+4,29%	+15,71%	-
Abril/18	A2	7,8	6,9	7,3	6,6	5,6	6,1
	%I _E	-	-11,54%	-6,41%	-15,38%	-28,21%	-21,79%
Maio/18	A2	8,1	7,7	8,5	7,3	7,7	7,4
	%I _E	-	-4,94%	4,94%	-9,88%	-4,94%	-8,64%

*A2: representa a quantidade máxima observada de exúvias

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Durante o ciclo de vida natural do organismo, os neonatos são liberados durante a ecdise, sendo observado que, após a liberação da exúvia, outro conjunto de ovócitos começa a se deslocar para a fase de maturação na câmara incubadora e, portanto, seria esperado que a aceleração no processo de ecdise estivesse acompanhada da indução de produção de neonatos (DODSON; CÁCERES e ROGERS, 2010). Entretanto, percebe-se a partir da relação entre a taxa de produção de neonatos e processo de ecdise, que o organismo aloca energia prioritariamente para a perpetuação da espécie, tendência que é verificada ao comparar o %I_N para a produção de neonatos e o %I_E para a produção de exúvias.

Para verificar se a diferença na produção de exúvias foi significativamente diferente, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que, para nenhum grupo, os resultados seguiam uma distribuição normal. Com exceção da comparação entre os resultados para a produção de exúvias, observado no controle e nas concentrações 127 e 200 µg.L⁻¹ (p = 0,02354 no Kruskal-Wallis e p valor de 0,002253 e 0,01818 para o Dunn's teste, respectivamente) para o teste de abril de 2018, nenhum outro teste apresentou diferença estatística.

Algumas considerações devem ser feitas (observações pessoais), apesar da não verificação de diferença estatística nas amostras com presença de cafeína: foi observada nas concentrações mais elevadas (127 e 200 µg.L⁻¹) agitação dos organismos, que circulavam ininterruptamente; foi percebido que nessas mesmas concentrações, ou próximo ao término do teste, os organismos alocavam energia prioritariamente para a reprodução e, posteriormente, para o processo de ecdise; mesmo quando os organismos estavam visualmente próximos à imobilidade (com pouco movimento e coloração esbranquiçada) havia a postura de neonatos em baixa quantidade.

5.4 Teste de geração - *C. sancticaroli*

O teste de gerações permite a análise de respostas adicionais quando comparado aos testes ecotoxicológicos convencionais, uma vez que avalia mais de um ciclo da vida do organismo. Sendo assim, observaram-se diferenças nos padrões do ciclo de vida entre três gerações, sendo ela a geração parental (P), geração F1 e geração F2. Com relação à emergência de adultos (Figura 5-14), observou-se taxa de emergência superior para a geração P, com valores variando de 63 a 84%, quando comparados a geração F1, com emergência variando de 2 a 38%, seguido da geração F2, que teve emergência de 12 e 6% para o controle e concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

A queda na emergência de adultos também foi observada no controle, então não é possível associar essa diminuição à presença da cafeína, mas sim à alta mortalidade de larvas, que pode ter sido ocasionada pelas condições ambientais de temperatura da sala, diferença na taxa de aeração ou suprimento de alimento inadequado (ARMITAGE; CRANSTON e PINDER, 1995). Por razões desconhecidas, na concentração de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ houve uma elevada taxa de mortalidade de larvas e pupas e, portanto, não há muitos resultados a serem discutidos. O teste foi feito três vezes com essa concentração e em todos os casos foi observado esse mesmo padrão, indicando a necessidade de estudos aprofundados como biomoleculares ou de estresse oxidativo para verificar se a cafeína nessa faixa de concentração específica causa alguma alteração mais expressiva no metabolismo do organismo.

Figura 5-14 – Porcentagem de emergência de adultos por concentração de cafeína durante o teste de geração para as gerações P, F1 e F2; para as concentrações sem nenhum dado expresso não foram observadas emergência.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Analisando-se a porcentagem de emergência de machos e fêmeas, quando comparado ao total de organismos que emergiram adultos, infere-se que a proporção de machos é superior à das fêmeas nas gerações P (Figura 5-15) e F1 (Figura 5-16). Optou-se por não fazer a representação gráfica da geração F2 pois só foi observada emergência de adultos no controle (100% macho) e concentração de 5 µg.L⁻¹ (100% fêmea). Para a geração P, o controle apresentou uma proporção de 62% de machos (M) e 38% de fêmeas (F), nas concentrações de 5, 15 e 127 µg.L⁻¹ essa diferença foi maior (80%M:21%F; 88%M:13%F; 75%M:25%F, respectivamente).

Figura 5-15 – Porcentagem de emergência de adultos (machos ou fêmeas) por concentração de cafeína para a geração P.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Essa diferença entre a razão sexual também foi constatada na geração F1, sendo observado para o controle a razão sexual de 57%M:43%F e para as concentrações 5, 15 e 200 µg.L⁻¹ as razões 83%M:17%F; 64%M:36%F e 62%M:38%F, respectivamente. Os autores Maloney et al. (2018), constataram que a proporção de machos emergidos é geralmente superior a de fêmeas, para a espécie *Chironomus dilutus*, sendo assim, a maior taxa de machos pode estar relacionada à uma tendência da família Chironomidae e, portanto, não foi possível concluir que a presença de cafeína causou uma razão sexual que pudesse ser considerado anormal para a espécie.

Figura 5-16 – Porcentagem de emergência de adultos (machos ou fêmeas) por concentração de cafeína para a geração F1.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Para complementar a análise dos dados, foi realizada uma avaliação gráfica para verificar as tendências de emergência dos organismos ao longo do tempo para a geração P (Figura 5-17) e para a geração F1 (Figura 5-18).

Conforme observado na Figura 5-17, na geração P, a emergência de adultos se iniciou primeiramente na concentração de 127 µg.L⁻¹ seguida pelo controle. As concentrações de 30 e 200 µg.L⁻¹ apresentaram menor quantidade de adultos emergidos e não foi possível prosseguir para a geração F1 de 30 µg.L⁻¹ pela falta de copulação e desova.

Figura 5-17 – Emergência total de adultos por concentração e ao longo do tempo para a geração P.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Já para a geração F1 (Figura 5-18), apesar dos adultos iniciarem a emergência em datas próximas, as larvas da concentração de $127 \mu\text{g.L}^{-1}$ não sobreviveram, e apenas 2 fêmeas emergiram. A concentração com maior número de adultos foi a de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, que desconsiderando a concentração $127 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi a primeira na qual os adultos pararam de emergir. O controle e a concentração de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram um padrão de emergência próximos.

Figura 5-18 – Emergência total de adultos por concentração e ao longo do tempo para a geração F1.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Outra resposta obtida com o teste de gerações, é a possível mudança no tamanho das larvas do organismo. Para tanto, ao final do décimo primeiro dia de cada início do teste, para cada geração, foram amostradas larvas e medidos seus comprimentos corporais (Figura 5-19).

Figura 5-19 – Preparação das larvas de *C. sancticaroli* para a medição do comprimento para as três gerações (P, F1 e F2, respectivamente)

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

Para a geração P, não é possível afirmar pela análise descritiva a ocorrência de diferença significativa entre os comprimentos de larvas amostradas para as concentrações de cafeína e o controle (Figura 5-20), sendo que os tamanhos das larvas variaram de 6 a 10 mm, apresentando média de 8 mm. Além disso, na geração P, foi observada maior homogeneidade dos resultados. Para as demais gerações, houve maior variação no comprimento do corpo da larva. Para a geração F1, foi verificado um aumento no tamanho da larva com a presença de cafeína, sendo o maior valor médio observado na concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, de 9 mm. Entretanto, na geração F2, foi observado que o tamanho da larva, apesar de apresentar tamanhos próximos aquele observado na situação controle, foram inferiores na presença de cafeína. As concentrações para as quais não foram apresentados os valores de comprimento de larva correspondem às aquelas em que não foi possível realizar a amostragem pela falta de organismo para prosseguir com o teste de gerações. A diminuição no tamanho do corpo da larva pode estar relacionada à ação de um contaminante no organismo. Richardi et al. (2018), por exemplo, verificaram a diminuição do comprimento larval de *C. sancticaroli* em teste de ecotoxicidade crônica na presença do hidrocarboneto fenantreno ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$). Costa (2018) também observou alterações no tamanho da larva em seu estudo utilizando cromo hexavalente, sendo constatado o aumento do comprimento larval em soluções contendo a quitosana (utilizada para adsorver o cromo). Por outro lado, Dell'Acqua (2017) não constatou diferença estatisticamente significativa entre as gerações de *C. sancticaroli* quando expostos a concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ do hormônio 17α -etinilestradiol.

Figura 5-20 –Comprimento das larvas de *Chironomus sancticaroli*, em mm, para as gerações P, F1 e F2 expostas a diferentes concentrações de cafeína, com seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A aplicação do teste estatístico foi realizada comparando cada concentração ao teste controle. Para todos os casos, devido a não normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (Tabela 5-5).

Tabela 5-5 – Resultados de p valor para o teste de Kruskal-Wallis para as três gerações de *Chironomus sancticaroli* comparando cada concentração ao controle

Concentração (µg L ⁻¹)	Tamanho da larva (mm)		
	P	F1	F2
5	0.563	0.000	0.801
15	0.773	0.000	0.116
30	1.000	-	-
127	0.534	0.001	-
200	0.488	0.000	-

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Diferentemente das demais gerações, na geração F1, todas as concentrações foram consideradas estatisticamente diferentes do controle, com $p < 0,05$. Corroborando com o observado na Figura 5-20, a geração F1 apresentou respostas estatisticamente diferentes do controle para todas

as concentrações de cafeína, indicando, portanto, uma maior influência da substância no animal nessa geração.

A última análise desenvolvida com as larvas amostradas, foi a verificação da presença de deformidade do mento para cada geração (Tabela 5-6). Em nenhuma condição avaliada, de concentração de cafeína e de geração, foi observada deformidade aparente nos dentes das larvas de *C. sancticaroli*. A deformidade do mento em larvas da família Chironomidae é resultado da exposição ao estresse ou poluição (BIASI e RESTELLO, 2010). Para as concentrações analisadas, a cafeína não causou modificação na dentição das larvas do inseto.

Tabela 5-6 - Avaliação do mento das larvas de *C. sancticaroli* por meio de fotografias realizadas para as três gerações (P, F1 e F2) e para cada concentração de cafeína utilizada

	Geração P	Geração F1	Geração F2
Controle
5 $\mu\text{g.L}^{-1}$
15 $\mu\text{g.L}^{-1}$
30 $\mu\text{g.L}^{-1}$		Não foi obtida amostra	Não foi obtida amostra
127 $\mu\text{g.L}^{-1}$			Não foi obtida amostra
200 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

Como resultado para a medição do tamanho das asas da fêmea (Figura 5-21), temos que o comprimento da asa em todas as gerações na presença de cafeína foram inferiores aos valores obtidos para o controle, exceto para as concentrações de 5 e 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que apresentaram tamanho médio das asas de 2,43 e 2,49 mm em comparação com 2,37 mm no controle. Em geral, o tamanho da asa da fêmea variou de 2,33 a 2,49 mm na geração P, de 2,00 a 2,64 mm na geração F1 e foi de 2,19 mm para a concentração 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na geração F2. Para todas as gerações e concentrações, os tamanhos de asas encontrados estão dentro do comumente observado para a espécie, valores que variam de 2,34 a 3,51 mm com média de 2,98 mm (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Figura 5-21 –Tamanho das asas das fêmeas emergidas durante o teste de gerações de *Chironomus sancticaroli* para as gerações P, F1 e F2 e seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis (Tabela 5-7), todas as concentrações de cafeína na geração P não se mostraram estatisticamente diferentes do controle. Na geração F1, a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ se apresentou estatisticamente diferente do controle. Não foi possível realizar os testes estatísticos para a geração F2, pois não havia adultos para o controle nessa geração para a comparação.

Tabela 5-7 – Resultados de p valor para o teste de Kruskal-Wallis para as três gerações de *Chironomus sancticaroli* comparando cada concentração ao controle

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tamanho da asa (mm)		
	P	F1	F2
5	0.629	0.121	-
15	1.000	0.098	-
30	-	-	-
127	0.517	0.121	-
200	0.748	0.053	-

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Assim como observado para o tamanho das asas da fêmea, os resultados obtidos para a fecundidade potencial (Figura 5-22), calculada em número de ovos prováveis, ficaram de forma geral dentro dos limites observados para o controle. Na geração P, a fecundidade potencial média variou de 447 ovos para o controle a 394 ovos para a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Na geração F1, foi obtida variação no número de ovos de 353 ovos para o controle, a 507 ovos para a concentração de 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Houve diferença significativa entre a produção de ovos no controle e na concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com 234 ovos (p valor de 0,053). Na geração F2, foram amostradas apenas fêmeas na concentração de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nas demais concentrações não houve emergência de fêmeas.

Figura 5-22 –Fecundidade potencial das fêmeas emergidas durante o teste de gerações de *Chironomus sancticaroli* para as gerações P, F1 e F2 e seus respectivos desvios padrão.

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

Conforme obtido para o tamanho das asas, ao aplicar o teste de Kruskal-Wallis, a única concentração que apresentou fecundidade potencial diferente do controle foi a concentração de 200 µg.L⁻¹ na geração F1. Assim, foi observado mudanças no aspecto reprodutivo da espécie para a maior concentração analisada na geração F1.

Portanto, no teste de gerações foi verificado que a cafeína em baixas concentrações pode influenciar alguns aspectos do ciclo de vida da espécie *C. sancticaroli* no decorrer das gerações do inseto. Por exemplo, ao comparar a geração F1 com a geração P foram observadas diferenças estatísticas entre os comprimentos do corpo da larva, tamanho da asa da fêmea e fecundidade potencial.

6. Considerações finais

Analisando os resultados obtidos, foi possível reafirmar a importância da adaptação dos testes ecotoxicológicos à realidade ambiental, trazendo as análises para contextos de concentrações ambientalmente reportadas na literatura. A aplicação de testes ecotoxicológicos convencionais e a análise de respostas complementares, são ferramentas importantes para complementar as avaliações de qualidade dos corpos hídricos, além de auxiliar na identificação dos efeitos de substâncias isoladas, no ciclo de vida dos organismos aquáticos.

A aplicação de teste de sensibilidade e a utilização da carta controle, se mostraram importantes para a discussão dos resultados. Por exemplo, as repostas de reprodução no teste de ecotoxicidade crônica para a espécie *D. magna* variaram de acordo com a sensibilidade do organismo. Em abril, mês no qual o organismo exibiu maior sensibilidade, foi observada maior influência da cafeína na produção de neonatos, o que sugere que a atuação da cafeína na biologia dos organismos pode variar de acordo com a sensibilidade do mesmo. Além disso, foi observado para todos os testes de ecotoxicidade crônica, que as *dáfnias* alocaram energia para reprodução ao invés de fazê-la para crescimento individual. Desse modo, sugere-se que no ambiente natural, o efeito da cafeína pode ser potencializado de acordo com as condições da espécie.

Apesar de *D. magna* ser geralmente utilizada em testes ecotoxicológicos, por ser um organismo muito sensível ao estresse ambiental, ela se apresentou mais resistente à cafeína quando comparada a *C. sancticaroli*, apresentando maiores taxas de sobrevivência nos testes agudos e crônicos.

Sugere-se que a cafeína, mesmo em baixas concentrações, tem a capacidade de interferir no ciclo de vida dos organismos analisados. Pelos resultados obtidos, indica-se a realização de estudos aprofundados, utilizando técnicas biomoleculares, tais como observação de estresse oxidativo, biomarcadores e alteração na presença de lipídios e proteínas.

7. Conclusões

- A cafeína, nas concentrações até agora reportadas em corpos hídricos, não causa efeito agudo ou crônico de mortalidade e/ou imobilidade aos organismos;
- A concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, cenário estimado nessa pesquisa, apresentou influência no comprimento do corpo da larva do inseto *C. sancticaroli* no teste de ecotoxicidade crônica, sendo observado uma queda no tamanho da larva quando comparado ao controle;
- No teste crônico com *D. magna*, as concentrações de 127 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentaram aumento na taxa de reprodução ($I\%_N > 0$) e retardo no desenvolvimento ($I\%_E < 0$);
- O teste de gerações utilizando a espécie *C. sancticaroli*, permitiu concluir que há diferença estatística com relação ao desenvolvimento larval do inseto para a geração F1;
- Não foi registrada deformidade bucal em nenhum exemplar de *C. sancticaroli* no teste de gerações;
- Foram observadas diferenças estatísticas com relação ao tamanho da asa da fêmea e fecundidade potencial do inseto para a geração F1 na concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda- Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2016a.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2016b.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 12648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.
- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V.; DEL VALLS, T. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L. Identification of biomarkers responsive to chronic exposure to pharmaceuticals in target tissues of *Carcinus maenas*. **Marine Environmental Research**, v. 87–88, p. 1–11, 2013.
- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V et al. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota ? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. **Chemosphere**, v. 120, p. 75–85, 2015.
- AHMED, M. B. et al. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 274–298, 2017.
- ALMEIDA, C. A. DE. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios**. [s.l.] 181 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.
- ALMEIDA, G. A. DE. **Identificação de poluentes orgânicos na represa Billing - São Paulo**. [s.l.] 256 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.
- ANDERSON, B. G. The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as wetermined by the use of *Daphnia magna*. **Sewage Works Journal**, v. 16, n. 6, p. 1156–1165, 1944.
- ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclofon para três espécies de *Daphnia*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 55–64, dez. 2005.
- ARENDASH, G. W.; CAO, C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. SUPPL.1, p. 117–126, 2010.
- ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges**. [s.l.] Chapman & Hall, 1995.
- ASTM INTERNACIONAL - ACTIVE STANDARD. **ASTM E2587-16 - Standard practice for use of control-charts in statistical process controle**. [s.l: s.n.].
- BANG, S. H. et al. Acute and chronic toxicity assessment and the gene expression of Dhb , Vtg ,

Arnt , CYP4 , and CYP314 in *Daphnia magna*. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 11, p. 153–160, 2015.

BARBER, C. et al. Evaluation of the relationship between land-use changes and ground water quality in a water-supply catchment, using gis technology: The gwelup wellfield, Western Australia. **Hydrogeology Journal**, v. 4, n. 1, p. 6–19, 1996.

BASTOS, D. N. **Toxicidade do herbicida glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***. [s.l.] Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2013.

BENOTTI, M. J.; BROWNAWELL, B. J. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 3, p. 994–1002, 2009.

BERG, M. B. Larval food and feeding behaviour. In: ARMITAGE, P.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. (Eds.). **The Chironomidae**. First Edit ed. London: Chaptan & Hall, 1995. p. 572.

BERNEGOSI, A. C. et al. *Chironomus sancticaroli* generation test: A new methodology with a Brazilian endemic insect. **MethodsX**, v. 6, 2019.

BIASI, C.; RESTELLO, R. M. Incidência de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomidae* (Insecta: Diptera) como ferramenta de avaliação da qualidade de água em riachos de Erechem - RS. **Revista Eletrônica de Extensão da URI, Vivências** 6 (9), p. 136–148, 2010.

BIESINGER, K. E.; CHRISTENSEN, G. M. Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 29, n. 12, p. 1691–1700, dez. 1972.

BLASINA, A. et al. Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. **Current Biology**, v. 9, n. 19, p. 1135–1138, 1999.

BONANI, F. **Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento**. [s.l.] 80 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2010.

BRADLEY, P. M. et al. Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1116, 2007.

BUERGE, I. J. et al. Caffeine , an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 4, p. 691–700, 2003.

BUERGE, I. J. et al. Combined sewer overflows to surface waters detected by the anthropogenic marker caffeine. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 13, p. 4096–4102, 2006.

BUSSE, L.; NAGODA, C. **Detection of caffeine in the streams and rivers within the San Diego region - Pilot study**. São Diego, Califórnia: Surface Water Monitoring Program, 2015.

CAIADO, M. C. S. O padrão e urbanização brasileiro e a segregação espacial da população na região de Campinas: o papel dos instrumentos de gestão urbana. **XI Encontro Nacional de Estudos Populacionais da ABEP**, p. 457–488, 1998.

CAMPOS, B. et al. Two-generational effects of contaminants in *Daphnia magna* : Effects of

offspring quality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1470–1477, jun. 2016.

CANTWELL, M. G. et al. Caffeine in Boston Harbor past and present, assessing its utility as a tracer of wastewater contamination in an urban estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 108, n. 1–2, p. 321–324, 2016.

CARBALLO, J. A.; PINCHEIRA, J.; DE LA TORRE, C. The G2 checkpoint activated by DNA damage does not prevent genome instability in plant cells. **Biological Research**, v. 39, n. 2, p. 331–340, 2006.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014**. São Paulo: CETESB, 2015.

CHEN, Z. et al. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4830–4838, 2002.

CHEVALIER, J. et al. Exploration of *Daphnia* behavioral effect profiles induced by a broad range of toxicants with different modes of action. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1760–1769, 2015.

CLARA, M.; STRENN, B.; KREUZINGER, N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 947–954, 2004.

COLOMBO-CORBI, V. et al. Genetic diversity loss in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) exposed to pyrimethanil fungicide: an analysis using RAPD technique. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 228, n. 10, 2017.

COMEAU, F. et al. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. **Science of the Total Environment**, v. 396, n. 2–3, p. 132–146, 2008.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 769–779, 2008.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; DOS SANTOS, A. Environmental Evaluation of Metals in Sediments and Dragonflies Due to Sugar Cane Cultivation in Neotropical Streams. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 195, n. 1–4, p. 325–333, nov. 2008.

COSTA, C. G. A. G. **Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir de adsorventes à base de quitosana e celulose bacteriana e os seus efeitos na biota aquática**. [s.l.] Tese (Doutorado em Ciências) - 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, 2018.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, J. B. DA. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação**

ultravioleta. [s.l.] 180 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

CRUZ, D. et al. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. **Chemosphere**, v. 160, p. 95–103, 2016.

DA COSTA, J. B. et al. Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 9, p. 1803–1813, 2014.

DANESHVAR, A. et al. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 131–139, 2012.

DELL'ACQUA, M. M. **Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol sobre a biologia de *Chironomus sancticarloi* (Chironomidae, Diptera)**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Hidráulica e Saneamento) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2017.

DI GIULIO, R. T.; NEWMAN, M. . Ecotoxicology. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINSIII, J. B. (Eds.). . **Casarett & Doull's : Essentials of Toxicology**. 1. ed. [s.l.] Lange, 2010.

DODSON, S. L.; CÁCERES, C. E.; ROGERS, D. C. Cladocera and other Branchiopoda. In: **Ecology and classification of North American freshwater invertebrates**. Third ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2010. v. 66p. 1008–1013.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus sp* (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. [s.l.] 239 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2006.

EBERT, D. Introduction to Daphnia Biology. In: **Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia***. [s.l.] National Center for Biotechnonology Information (US), 2005. p. 1–25.

EDWARDS, Q. A.; KULIKOV, S. M.; GARNER-O'NEALE, L. D. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 57, 2015.

FERGUSON, P. J. et al. Detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in near-shore habitats of southern Lake Michigan. **Science of the Total Environment**, 2013.

FERNANDES, A. S. et al. Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, n. April, p. 30–36, 2017.

FOCAZIO, M. J. et al. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. **Science of the Total Environment**, v. 402, n. 2–3, p. 201–216, 2008.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba/SP através de**

testes de toxicidade com invertebrados. [s.l.] 220 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, 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.

GHISELLI, G. **Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** [s.l.] 181 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2006.

GIRAUDO, M. et al. Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171763, fev. 2017.

GLASSMEYER, S. T. et al. Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 909–922, 2017.

GOLDSTEIN, A.; GOSSETT, R. Passage of caffeine into human gonadal and fetal tissue. **Biochemical Pharmacology**, p. 166–168, 1962.

GONÇALVES, E. S. **Uso da cafeína como indicador de contaminação por esgoto doméstico em águas superficiais.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Geoquímica Ambiental). Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2008.

GROSSELI, G. M. **Contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto aeróbia e anaeróbia.** [s.l.] Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2016.

HAMMER; HARPER, D.; RYAN, P. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HANN, B. J. Invertebrate grazer periphyton interactions in a eutrophic marsh pond. **Freshwater Biology**, v. 26, n. 1, p. 87–96, 1991.

HARBORNE, J. . **Introduction to ecological biochemistry.** 4. ed. Londres: Academic Press, 1993.

HARRIS, K. D. M.; BARTLETT, N. J.; LLOYD, V. K. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. **Genetics Research International**, 2012.

HEBERER, T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **Journal of Hydrology**, v. 266, n. 3–4, p. 175–189, 2002.

HODGSON, E. Introduction to toxicology. In: HODGSON, E. (Ed.). . **A textbook of modern toxicology.** 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 2–11.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico.** Rio de Janeiro: 2008, 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Atlas de Saneamento 2011.** Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

INCTAA-INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS ANALÍTICAS AVANÇADAS. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil**. São Carlos: Editora Cubo, 2014.

ISHIDA, R.; KOZAKI, M.; TAKAHASHI, T. Caffeine alone causes DNA damage in Chinese Hamster ovary cells. **Cell structure and function**, v. 10, p. 405–409, 1985.

JAGODA, A.; ŻUKOWSKI, W.; DĄBROWSKA, B. Investigations of the presence of caffeine in the Rudawa River, Kraków, Poland. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 9, 2015.

KAISER, K. L. E. Organic contaminants in the environment: Research progress and needs. **Environment International**, v. 10, n. 3, p. 241–250, 1984.

KERZENDORFER, C.; O'DRISCOLL, M. UVB and caffeine: inhibiting the DNA damage response to protect against the adverse effects of UVB. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 7, p. 1611–3, 2009.

KILHMAN, B. . Effects of caffeine on the genetic material. **Mutation Research**, v. 26, p. 53–71, 1974.

KNEE, K. L. et al. Caffeine and agricultural pesticide concentrations in surface water and groundwater on the north shore of Kauai (Hawaii, USA). **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 8, p. 1376–1382, 2010.

KOLPIN, D. W.; MEYER, M. T. Pharmaceuticals , hormones , and other organic wastewater contaminants in U. S. Streams, 1999 - 2000 : a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

LAWRENCE, J. R. et al. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 655–669, 2005.

LI, Z. et al. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 353–361, 2012.

LOOS, R. et al. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1469–1478, 2007.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MALONEY, E. M. et al. Can chronic exposure to imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam mixtures exert greater than additive toxicity in *Chironomus dilutus*? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, n. October 2017, p. 354–365, 2018.

MARCELAIN, K. et al. Roles of nibrin and ATM/ATR kinases on the G2 checkpoint under endogenous or radio-induced DNA damage. **Biological Research**, v. 38, n. 2–3, p. 179–185, 2005.

MARTIN-CREUZBURG, D.; WESTERLUND, S. A.; HOFFMANN, K. H. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: Determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). **General and Comparative Endocrinology**, v.

151, n. 1, p. 66–71, 2007.

MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17 α - etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna***. [s.l.] 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2016.

MOORE, M. T. et al. Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, p. 31–35, 2008.

MORAIS, G. DOS S. et al. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.

MUGNAI, RI.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010.

MÜLLER, H. G. Experiences with test systems using *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 4, n. 1, p. 21–25, mar. 1980.

NAIK, P. K. et al. Impact of urbanization on the groundwater regime in a fast growing city in central India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 146, n. 1–3, p. 339–373, 2008.

NOVELLI, A. **Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e *in situ***. [s.l.] 184 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2010.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No 202: *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test**. [s.l.] OECD Publishing, 2004.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No 235: *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test**. [s.l.] OECD Publishing, 2011.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test**. [s.l.] OECD Publishing, 2012.

OLIVER, D. . Life history of the Chironomidae. **Annual Review of Entomology**, v. 16, n. 1, p. 211–230, 1971.

OSMAN, F.; MCCREADY, S. Differential effects of caffeine on DNA damage and replication cell cycle checkpoints in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 260, n. 4, p. 319–334, 1998.

PADMANABHAN, P. et al. Respiration of ¹³C-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ¹³C-labeled soil DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1614–1622, 2003.

PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. Anthropogenic contamination of Portuguese coastal waters during the bathing season: Assessment using caffeine as a chemical marker. **Marine Pollution Bulletin**, v. 120, n. 1–2, p. 355–363, 2017.

PÉRY, A. R. R. et al. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 2507–2513, 2002.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3–27, 2014.

PIRES, A. et al. Long-term exposure to caffeine and carbamazepine: Impacts on the regenerative capacity of the polychaete *Diopatra neapolitana*. **Chemosphere**, v. 146, p. 565–573, 2016.

PIVELI, R. P. **Qualidade das águas e poluição: Aspectos físico-químicos - Ferro, Manganês e Metais Pesados**, 2012. Disponível em:

<[http://www.leb.esalq.usp.br/disciplinas/Fernando/leb360/Fasciculo 8 - Ferro e Manganês e Metais Pesados.pdf](http://www.leb.esalq.usp.br/disciplinas/Fernando/leb360/Fasciculo%208%20-%20Ferro%20e%20Manganes%20e%20Metais%20Pesados.pdf)>

POLLACK, K.; BALAZS, K.; OGUNSEITAN, O. Proteomic assessment of caffeine effects on coral symbionts. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 2085–2091, 2009.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. [s.l.] 55 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2007.

RAND, G. . **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 2. ed. [s.l.] CRC Press, 1995.

RASBAND, W. . **ImageJ**. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>.

RICHARDI, V. S. et al. Determination of larval instar in *Chironomus sancticaroli* using novel head capsule structures. **Zoologia**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RICHARDI, V. S. et al. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Environmental Pollution**, v. 242, p. 277–287, 2018.

RODRIGUEZ-GIL, J. . et al. Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distribution and probabilistic risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1058–1071, 2018.

SANTOS, M. A. P. F. DOS. **Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos**. [s.l.] 186 p. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2008.

SIERRA-ALVAREZ, R.; LETTINGA, G. the Effect of Aromatic Structure on the Inhibition of Acetoclastic Methanogenesis in Granular Sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 544–550, 1991.

SIGMA-ALDRICH. **Características químicas da cafeína**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/c7731?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 20 jul. 2007.

SILVA, C. P. et al. Evaluation of the anthropogenic input of caffeine in surface waters of the north and center of Portugal by ELISA. **Science of the Total Environment**, v. 479–480, n. 1, 2014.

SNYDER, S. A. et al. **Removal of EDCs and pharmaceuticals in drinking and reuse treatment processes**. Denver: American Water Works Association Research Foundation Report, 2007.

- SNYDER, S. H. et al. Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 5, p. 3260–3264, 1981.
- SOLBÉ, J. et al. Analysis of the Ecetoc Aquatic Toxicity (EAT) database I — General introduction. **Chemosphere**, v. 36, n. 1, p. 99–113, jan. 1998.
- SPIES, M.; REISS, F. Catalog ad bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera). In: BAEHR, M. (Ed.). **Spixiana: Zeitschrift für Zoologie, Supplement**. München: The State Zoological Collections München, 1994. p. 61–119.
- SPOSITO, J. C. . et al. Emerging contaminants on Brazilian rivers: occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, 2018.
- STRUEWING, K. A. et al. Part 2: Sensitivity comparisons of the mayfly *Centroptilum triangulifer* to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* using standard reference toxicants; NaCl, KCl and CuSO₄. **Chemosphere**, v. 139, p. 597–603, nov. 2015.
- SUEITT, A. P. E. et al. Ecotoxicological risks of calcium nitrate exposure to freshwater tropical organisms: Laboratory and field experiments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 155–163, jul. 2015.
- SUMIYA, E. et al. Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. **Frontiers in Zoology**, v. 11, n. 1, p. 60, dez. 2014.
- SZYKOWSKA, M. I.; PAWLACZYK, A. **Environmental Toxicology**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 2
- TAVARES, C.; SAKATA, R. K. Cafeína para o tratamento de dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 62, n. 3, p. 387–401, 2012.
- TERRA, N. .; FEIDEN, I. . Reproduction and survival of *Daphnia magna* Straus , 1820 (Crustacea : Cladocera) under different hardness. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 15, n. 2, p. 51–55, 2003.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae)**. [s.l.] 182 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1980.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 676–684, 2011.
- TRIVINHO-STRIXINO, S. Ordem Diptera: Família Chironomidae - Guia de identificação de larvas. In: HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, B. (Eds.). **Insetos Aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: INPA, 2014. p. 724.
- TSABAR, M. et al. Caffeine impairs resection during DNA break repair by reducing levels of nucleases Sae2 and Dna2. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 14, p. 6889–6901, 2015.
- TUCCI, C. Urbanização e Recursos Hídricos. In: BICUDO, C. E. M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHI, M. C. . (Eds.). **Águas do Brasil - análises estratégicas**. 1. ed. São Paulo: Academia Brasileira de Ciências, Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, 2010. p. 224.
- UMBUZEIRO, G. DE A. (COORD). **Guia de potabilidade para substâncias químicas**. São Paulo: Limiar, 2012.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Technical**

support document for water quality-based toxics control. [s.l.] United States Environmental Protection Agency, 1992. v. 57

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. p. 1–350, 2002a.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. p. 1–275, 2002b.

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticarloi* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciências - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

WANG, C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, v. 45, n. 4, p. 1818–1828, 2011.

WEIGEL, S.; KUHLMANN, J.; HÜHNERFUSS, H. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. **Science of the Total Environment**, v. 295, n. 1–3, p. 131–141, 2002.

YOU, L. et al. Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 955–963, 2015.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

ZHOU, B. S. et al. Caffeine abolishes the mammalian G2 / M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10342–10348, 2000.

ANEXO A

Concentrações mínimas e máximas de cafeína detectadas em águas superficiais e costeiras no Brasil e no mundo.

Legenda	Concentração média (µg.L ⁻¹)	Local - Amostra analisada	Literatura
1	0,0019 a 0,0147	Represa Billings (sedimento)	(ALMEIDA, 2003)
2	1,0000 a 17,0000	Rio Atibaia, SP – BR	(GHISELLI, 2006)
3	35,3000 a 106,0000	Ribeirão Anhumas, SP – BR	(GHISELLI, 2006)
4	0,2000 a 16,9000	Rio Atibaia, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
5	0,6000 a 9,6000	Ribeirão Pinheiros, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
6	3,3000 a 127,0000	Ribeirão Anhumas, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
7	0,5000 a 16,9000	Rio Capivari, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
8	0,8000 a 23,1000	Rio Jundiá, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
9	0,1600 a 47,5000	Rio Paqueta, RJ – BR	(GONÇALVES, 2008)
10	0,0013 a 0,3480	São Paulo (panorama das águas superficiais), BR	(INCTAA, 2014)
11	0,0030 a 0,5990	Belo Horizonte (panorama das águas superficiais), MG – BR	(INCTAA, 2014)
12	0,0030 a 0,2670	Vitória (panorama das águas superficiais), ES – BR	(INCTAA, 2014)
13	0,0080 a 0,0350	Manaus (panorama das águas superficiais), AM – BR	(INCTAA, 2014)
14	0,0510 a 0,1330	Belém (panorama das águas superficiais), PA – BR	(INCTAA, 2014)
15	0,0018 a 0,0045	Porto Velho (panorama das águas superficiais), RO – BR	(INCTAA, 2014)
16	0,0020 e 0,0080	Recife (panorama das águas superficiais), PE – BR	(INCTAA, 2014)
17	0,0070 a 0,0340	Salvador (panorama das águas superficiais), BA – BR	(INCTAA, 2014)
18	0,1220 e 2,769	Porto Alegre (panorama das águas superficiais), RS – BR	(INCTAA, 2014)
19	0,0042 e 0,1670	Curitiba (panorama das águas superficiais), PR – BR	(INCTAA, 2014)
20	0,0080 e 0,0380	Brasília (panorama das águas superficiais), DF – BR	(INCTAA, 2014)
21	0,0040 e 0,0700	Goiânia (panorama das águas superficiais), GO – BR	(INCTAA, 2014)
22	0,0060 a 1,7930	Campo Grande (panorama das águas superficiais), MT – BR	(INCTAA, 2014)
23	0,0010 a 2,7690	Água de abastecimento (panorama Brasil)	(MACHADO et al., 2016)
24	0,0200 a 1,0400	Rio Dourados e Brilhante, MG – BR	(SPOSITO et al., 2018)
25	0,0020 a 0,0161	Escócia (panorama da costa)	(WEIGEL; KUHLMANN; HÜHNERFUSS, 2002)
26	0,0100 a 10,0000	EUA (águas superficiais)	(KOLPIN; MEYER, 2002)
27	0,1000 a 15,2000	Austrália	(CHEN et al., 2002)
28	<0,0005 a 1,0560	Lago Maggiore, Itália	(LOOS et al., 2007)
29	0,0060 a 0,0180	Canadá	(COMEAU et al., 2008)
30	0,0001 a 0,2700	EUA	(FOCAZIO et al., 2008)
31	0,0001 a 0,0880	Havai, EUA	(KNEE et al., 2010)
32	0,0012 a 0,2248	Missouri (panorama das águas superficiais), EUA	(WANG et al., 2011)
33	0,0180 a 0,1000	Lago Michigan, EUA	(FERGUSON et al., 2013)
34	0,0005 a 15,0000	Portugal (águas superficiais)	(SILVA et al., 2014)
35	0,0140 a 0,8520	Rio Rudawa, Polônia	(JAGODA; ŻUKOWSKI; DĄBROWSKA, 2015)
36	0,1000 a 6,9000	Barbados, West Indies	(EDWARDS; KULIKOV; GARNER-O'NEALE, 2015)
37	<0,0500 a 8,5000	San Diego, Califórnia	(BUSSE; NAGODA, 2015)
38	0,0339 a 2,9800	Singapura (águas superficiais)	(YOU et al., 2015)
39	0,0001 a 0,1240	Baía e Boston, EUA	(GLASSMEYER et al., 2017)
40	0,0150 a 0,1850	Baía de Boston, EUA	(CANTWELL et al., 2016)
41	0,0180 a 0,5250	Portugal (panorama da costa)	(PAÍGA; DELERUE-MATOS, 2017)

Fonte: Organizado pela autora.