

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

**Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em  
exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado**

Mayara Caroline Felipe

São Carlos - SP

2019



MAYARA CAROLINE FELIPE

**Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em  
exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de  
São Carlos, da Universidade de São Paulo,  
como parte dos requisitos necessários para a  
obtenção de título de Doutor em Ciências:  
Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Associado 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).

F466b Felipe, Mayara Caroline  
Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado / Mayara Caroline Felipe; orientador Juliano José Corbi. São Carlos, 2019.

Tese (Doutorado) - 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. ecotoxicologia. 2. LAS. 3. Chironomus sancticaroli. 4. Allonais inaequalis. 5. Daphnia magna.  
I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **MAYARA CAROLINE FELIPE**.

Título da tese: "Análise do impacto ambiental do Alquilbenzeno Linear Sulfonado por meio de bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em exposição ao LAS padrão e amostras de reator".

Data da defesa: 26/03/2019.

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

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

APROVADO

Prof. Dr. **Nemésio Neves Batista Salvador**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

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

APROVADA

Dra. **Mônica Luisa Kuhlmann**  
(CETESB)

APROVADA

Profa. Associada **Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiando**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



*Dedico aos meus pais, Gilberto e Vera Júlia, com amor e eterna gratidão.*



## AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, o Grande Arquiteto do Universo, sempre presente, por todas as oportunidades que me proporcionara, e por sempre ter me oferecido saúde, disposição e força para vencer obstáculos.

Aos meus pais, Gilberto Felipe e Vera Júlia Brugnoli Felipe, por todo amor dispensado, por todo apoio e gesto de carinho durante meus anos de doutorado. Obrigado por me ensinarem tudo que sei em minha existência e obrigado por nunca terem desistido de mim.

Ao meu irmão Danilo Rafael Felipe, à minha cunhada Flávia Gásparo Felipe e ao meu sobrinho Felipe Gásparo Felipe, por todo gesto de carinho proporcionado, aos almoços de domingo reunidos na casa do pai, isso sempre fez toda a diferença na minha vida.

À minha família de São Carlos, Sanca Badalada, por terem dividido comigo quatro anos de amor, partilha, companheirismo e festinhas, afinal não é só de trabalho que se vive uma doutoranda.

Ao meu orientador Professor Juliano José Corbi, possuidor de inigualável saber, pela oportunidade, presteza, atenção e orientação durante meu período de doutorado. Obrigado por cada “puxão de orelha” que me impulsionaram a dar o máximo de mim. Obrigada também pelo companheirismo nesses anos de trabalho, foi muito bom trabalhar com você.

À professora Maria Bernadete Varesche pela possibilidade de trabalho com os reatores e por todo ensinamento.

Aos professores Guilherme Gorni e Maria Bernadete Varesche, pelas sugestões e contribuições na banca de qualificação.

Aos amigos LEAAenses com os quais pude compartilhar risadas, bons momentos e muito aprendizado: Mara Rúbia, Camila Geromel, Aline Bernegossi, Bruna Cardoso, Carina Issa, Lidia Moura, Barbara Nadai, Daniel Abrahão, Hugo de Araújo, José Leonardo, Marcelo Dell'Acqua, Érica Higashi, Guilherme Gorni, Pedro Carvalho.

Aos amigos Mara Rúbia, Aline Bernegossi, Mirian Niz, Guilherme Soares, Alejandra Villa, Raíssa Mazzareli, Inaê Alvez, Wesley Saltarelli e Juliana Argente, pela amizade, carinho e cuidado durante todos esses anos em São Carlos. Cada risada, cada piada e cada conversa aleatória ou acadêmica foram fundamentais para que eu fosse mais feliz em São Carlos. Amo vocês.

À amiga Larissa Romano, não somente pela amizade, mas por ter sido irmã, mãe, amiga, pesquisadora conselheira e por ter transformado minha vida. Obrigado por me fazer construir uma família em São Carlos e por ter me mostrado que a vida não é apenas construída de livros, artigos e *Daphnia*.

Aos amigos queridos e funcionários da EESC: Rose, Tchê, Sá e Priscila, por serem sempre tão prestativos e amigos para comigo.

À USP, EESC, SHS e LEAA.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, bolsa concedida através do processo 140055/2016- 9.

*...A imaginação foi a companheira de toda a minha existência, viva, rápida, inquieta,  
alguma vez tímida e amiga de empacar...*

*(Dom Casmurro, Machado de Assis)*



## RESUMO

FELIPE, M. C. **Bioensaios de toxicidade utilizando invertebrados aquáticos em exposição ao Alquilbenzeno Linear Sulfonado**. 2019. 213p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) é o surfactante aniônico mais utilizado no mundo e é encontrado constantemente em esgoto doméstico e águas residuárias de lavanderia. A remoção de LAS em reatores foi comprovada em estudos anteriores, mas pouco se sabe sobre a toxicidade desse composto em amostras mais complexas para a biota aquática. Neste trabalho, objetivou-se avaliar duas Hipóteses; A: O LAS padrão causa efeitos negativos na biota aquática, e B: O tratamento em reator de leito fluidificado de amostra complexa contendo LAS (água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico bruto) diminui os efeitos negativos na biota aquática. Ambas as hipóteses foram avaliadas por meio de bioensaios de toxicidade com: *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* e *Daphnia magna*, analisados a partir da mortalidade dos organismos e análises estatísticas, para determinar os efeitos tóxicos dos LAS padrão e das amostras do reator, comparados ao controle. Para avaliar a Hipótese A foram realizados testes de toxicidade aguda, crônica e crônica de gerações com o LAS padrão. No teste de toxicidade crônica de gerações, com a espécie *C. sancticaroli*, foram analisados a deformidade bucal, comprimento das larvas, tamanho das asas das fêmeas e fecundidade potencial com o LAS padrão em 3 gerações. Para responder a Hipótese B, foram realizados bioensaios de toxicidade aguda e crônica com os afluentes, efluentes e diluições dos efluentes nas seis fases de operação do reator. *C. sancticaroli* foi a espécie mais tolerante tanto em teste de toxicidade aguda como crônica com LAS padrão ( $CL_{50-96h}$  25,25 mg.L<sup>-1</sup> e  $CL_{50-10dias}$  18,11 mg.L<sup>-1</sup>), seguido de *A. inaequalis* ( $CL_{50-96h}$  8,13 mg.L<sup>-1</sup> e  $CL_{50-10dias}$  8,56 mg.L<sup>-1</sup>). A espécie mais sensível ao LAS foi *D. magna* ( $CE_{50-48h}$  6,11mg.L<sup>-1</sup> e  $CE_{50-21dias}$  3,21 mg.L<sup>-1</sup>). No teste de toxicidade crônica de longa duração, não existiu diferença estatística entre as gerações para o desenvolvimento das larvas do inseto *C. sancticaroli*, entretanto evidenciaram diferença estatística entre as gerações quanto ao tamanho das asas das fêmeas, indicando que esses organismos podem sofrer alterações fisiológicas quando a exposição ao contaminante é contínua, confirmando a Hipótese A. Os resultados ecotoxicológicos com

o reator evidenciaram toxicidade de 100% de todos afluentes e efluentes para *A. inaequalis* e *D. magna*. Já *C. sancticaroli* apresentou menor toxicidade nas primeiras fases de operação (de 20 a 100% de mortalidade). Em geral, foi identificado diferença de toxicidade das fases do reator por meio das diluições. Nas fases menos tóxicas, a diminuição da mortalidade era observada a partir de diluição de 50%; nas fases mais tóxicas, a partir de 20%. É possível concluir que a Fase VI<sub>b</sub> de operação do reator apresentou diminuição da toxicidade. Entretanto, ao se analisar testes de toxicidade crônica nessa fase, conclui-se que o efluente mesmo depois do tratamento em reator causa efeito negativo nos organismos-teste avaliados, dessa forma é possível refutar a Hipótese B. A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que o LAS causa impacto ambiental, principalmente em exposição contínua, e que mesmo com remoção em sistema biológico de efluentes reais (água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico) existe impacto, possivelmente com a interação entre os diversos compostos tóxicos e o LAS.

**Palavras-chave:** ecotoxicologia; LAS; *Chironomus sancticaroli*; *Allonais inaequalis*; *Daphnia magna*.

## ABSTRACT

FELIPE, M. C. **Toxicity bioassays using aquatic invertebrates in exposure to the Linear Alkylbenzene Sulfonate.** 2019. 213p. Thesis (PhD in Hydraulic Engineering and Sanitation) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2019.

Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) is the most commonly utilized anionic surfactant in the world and it is present in domestic sewage and laundry wastewater. Removal of LAS in reactors has been proven in previous studies, but little is known about the toxicity to the aquatic biota. The objectives of this study were tested into two Hypotheses, A: The standard surfactant LAS causes negative effects on aquatic biota, and B: Treatment in complex sample fluidized bed reactor containing LAS (commercial laundry wastewater combined with raw domestic sewage) diminishes the negative effects on aquatic biota. Both Hypotheses were evaluated toxicity bioassays using three test organisms: *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* and *Daphnia magna*. To evaluate the Hypothesis A, acute, chronic and long-term chronic toxicity tests were performed with standard LAS. In the long-term chronic tests with *C. sancticaroli* organisms, we analyzed the oral deformity, larval length, female wing size and potential fecundity in contact with the standard LAS in 3 generations. Acute and chronic bioassays with effluents, effluents and effluent dilutions in the VI operating phases of the fluidized bed reactor were proceeded to evaluate the Hypothesis B. The results were analyzed from the mortality of the organisms, and statistical analysis were performed to determine the similarity of the toxic effects of the LAS and reactor samples, compared to the control. The species *C. sancticaroli* was the most tolerant species in both acute and chronic trials with standard LAS ( $LC_{50-96h}$  25.25 mg.L<sup>-1</sup> and  $LC_{50-10\text{ days}}$  18.11 mg.L<sup>-1</sup>), followed by species of *A. inaequalis* ( $LC_{50-96h}$  8.13 mg.L<sup>-1</sup> and  $LC_{50-10\text{ days}}$  8.56 mg.L<sup>-1</sup>). The species most sensitive to LAS was *D. magna* ( $CE_{50-48h}$  6.11mg.L<sup>-1</sup> and  $CE_{50-21\text{ dias}}$  3.21mg.L<sup>-1</sup>). In the long-term chronic test, there is no statistical difference between the generations for the development of *C. sancticaroli* insect larvae. However, they showed a statistical difference between the generations regarding the size of the female wings, indicating that these organisms may undergo physiological changes when exposure to the contaminant is continuous. From these results it is possible to confirm Hypothesis A. The ecotoxicological results with the reactor showed toxicity of 100% of all

tributaries and effluents for *A. inaequalis* and *D. magna*. The *C. sancticaroli* species had low toxicity in the first stages of operation (from 20 to 100% mortality). In general, toxicity difference of the reactor phases was identified by half of the dilution analysis. In the less toxic phases, the decrease in mortality was observed from 50% dilution; in the most toxic phases, from 20%. It is also possible to conclude that Phase VI<sub>b</sub> showed a decrease in the mortality of the test organisms where a chronic test was performed. However, when analyzing the chronic tests, it can be concluded that the effluent even after the treatment in the reactor causes a negative effect on the test organisms evaluated, so it is possible to refute the Hypothesis B. From the results presented, it is possible to conclude that the LAS causes environmental impact, mainly in continuous exposure, and that even with treatment of actual effluents (commercial laundry wastewater combined with domestic sewage) there is an impact, possibly with the interaction between the various toxic compounds and the LAS.

**Keywords:** ecotoxicology; LAS; *Chironomus sancticaroli*; *Allonais inaequalis*; *Daphnia magna*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do LAS.....	37
Figura 2 – Ciclo de vida do organismo <i>C. sancticaroli</i> - 1) Desova; 2) Eclosão das larvas; 3) Larvas de I instar; 4) Larvas IV instar; 5) Pupa; 6) Insetos Adultos a) Fêmea e b) Macho .....	51
Figura 3 – Cápsula cefálica de <i>C. sancticaroli</i> na posição ventral, evidenciando as seis estruturas selecionadas para análise.....	55
Figura 4 – Estruturas utilizadas para determinar os instares das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> : a) Antenas, b) Mandíbula, c) Pré-mandíbula, d) Pente epifaríngeo, e) Placas ventromentais, f) Mento.....	55
Figura 5 – Oligochaeta <i>A. inaequalis</i> : a) Região do prostômio, b) Vista geral.....	57
Figura 6 – <i>Daphnia magna</i> ; a) Reprodução por partenogênese; b) Ovo efípio produzido a partir da reprodução sexuada .....	60
Figura 7 – As principais diferenças entre a fêmea (A e B) e o macho (C e D) do microcrustáceo <i>D. magna</i> .....	61
Figura 8 – Fluxograma das etapas experimentais.....	64
Figura 9 – Reator de leito fluidificado em escala aumentada (a) e esquema de funcionamento do reator (b).....	67
Figura 10 – Cultivo de <i>C. sancticaroli</i> .....	69
Figura 11 – Cultivo de <i>A. inaequalis</i> .....	70
Figura 12 – Cultivo de <i>D. magna</i> a) cultivo dentro da BOD b) BOD utilizada para a manutenção do cultivo dessa espécie.....	72
Figura 13 – Sala climatizada para realização de testes de toxicidade com as espécies <i>C. sancticaroli</i> e <i>A. inaequalis</i> .....	73
Figura 14 – Câmara incubadora (BOD) utilizada para realização de testes de toxicidade com a espécie <i>D. magna</i> a) vista geral da incubadora (marca Solab) b) testes realizados dentro da BOD.....	74
Figura 15 – Esquema de montagem de teste de toxicidade aguda e carta-controle em laboratório a) larva do inseto <i>C. sancticaroli</i> no IV instar, b) béquer de vidro com 250 mL de solução-teste/controle, c) 50g de areia tratada.....	76
Figura 16 – Esquema de montagem de teste de toxicidade aguda e carta-controle em laboratório a) Oligochaeta <i>A. inaequalis</i> , b) béquer de vidro com 100 mL de solução-teste/controle.....	77

Figura 17 – Esquema de montagem de teste de toxicidade aguda e carta-controle, em laboratório a) Neonatas com menos de 24h de vida da espécie <i>D. magna</i> , b) béquer de vidro com 100 mL de solução- teste/controle .....	78
Figura 18 – Esquema de montagem de teste de toxicidade crônica em laboratório a) larva do inseto <i>C. sancticaroli</i> no I instar, b) béquer de vidro com 250 mL de solução- teste/controle, c) 50g de areia tratada .....	83
Figura 19 – Lâminas das larvas de <i>C. sancticaroli</i> sobre papel milimetrado .....	84
Figura 20 – Esquema de montagem de teste de toxicidade crônica em laboratório a) Oligochaeta <i>A. inaequalis</i> , b) béquer de vidro com 100 mL de solução- teste/controle ....	85
Figura 21 – Montagem de teste de toxicidade crônica em laboratório a) Neonatos com menos de 24h de vida da espécie <i>D. magna</i> , b) béquer de vidro com 100 mL de solução- teste/controle, c) suspensão algácea como complementação alimentar .....	86
Figura 22 – Teste de toxicidade de gerações <b>a)</b> larva do inseto <i>C. sancticaroli</i> no I instar, <b>b)</b> béquer de vidro com 500 mL de solução- teste/controle, <b>c)</b> 50g de areia tratada, <b>d)</b> larvas IV instar, <b>e)</b> emergência de adultos (macho e fêmea), <b>f)</b> desova, <b>g)</b> eclosão das larvas....	88
Figura 23 – Recipiente-teste utilizado na realização dos testes de gerações .....	89
Figura 24 – Cápsula cefálica de <i>C. sancticaroli</i> disposta em lâmina observada no <i>software</i> TSVView para análise de deformidade do mento .....	90
Figura 25 – Asa da fêmea de <i>C. sancticaroli</i> .....	91
Figura 26 – Asa da fêmea do inseto <i>C. sancticaroli</i> medida com auxílio de lente graduada .....	91
Figura 27 – Carta-controle para a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	95
Figura 28 – Carta-controle para o organismo-teste <i>Allonais inaequalis</i> .....	96
Figura 29 – Carta-controle para o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .....	97
Figura 30 – Boxplot representando a mortalidade das larvas de IV instar de <i>C. sancticaroli</i> expostas a diferentes concentrações de LAS padrão por 96 horas .....	99
Figura 31 – Análise de Cluster com similaridade do efeito tóxico das concentrações de LAS padrão as larvas de IV instar de <i>C. sancticaroli</i> .....	100
Figura 32 – Boxplot representando a mortalidade dos oligoquetos <i>A. inaequalis</i> expostos a diferentes concentrações de LAS padrão por 96 horas .....	103
Figura 33 – Análise Cluster de similaridade das concentrações em relação a toxicidade do LAS padrão para a espécie <i>A. inaequalis</i> .....	104
Figura 34 – Boxplot representando a mortalidade do cladóceros <i>D. magna</i> expostos a diferentes concentrações de LAS padrão por 48 horas .....	106
Figura 35 – Análise de Cluster com similaridade do efeito tóxico das concentrações de LAS padrão para a espécie <i>D. magna</i> .....	107

Figura 36 – Distribuição de Sensibilidade de Espécies - Efeito da Toxicidade Aguda ao LAS.....	110
Figura 37 – Boxplot representando a mortalidade das larvas de <i>C. sancticaroli</i> expostas a diferentes concentrações de LAS padrão por 10 dias .....	114
Figura 38 – Análise de Cluster com similaridade do efeito tóxico das concentrações de LAS padrão as larvas de <i>C. sancticaroli</i> .....	115
Figura 39 – Boxplot representando o tamanho das larvas (mm) do inseto <i>C. sancticaroli</i> em contato com o LAS padrão.....	118
Figura 40 – Análise de Cluster com similaridade entre o tamanho das larvas de <i>C. sancticaroli</i> e as concentrações de LAS padrão.....	119
Figura 41 – Boxplot representando a mortalidade dos oligoquetos <i>A. inaequalis</i> expostos a diferentes concentrações de LAS padrão por 10 dias .....	120
Figura 42 – Análise de Cluster com similaridade de Bray-Curtis das concentrações de LAS em seu efeito tóxico ao organismo-teste <i>A. inaequalis</i> .....	121
Figura 43 – Boxplot representando a reprodução do organismo-teste <i>A. inaequalis</i> em exposição ao LAS padrão por 10 dias.....	123
Figura 44 – Análise de Cluster com similaridade entre as concentrações LAS padrão e a reprodução da espécie <i>A. inaequalis</i> .....	124
Figura 45 – Efeitos do LAS ( $C_{12}$ ) em concentrações sub-letais na mortalidade e na reprodução do organismo-teste <i>D. magna</i> .....	126
Figura 46 – Efeitos do LAS ( $C_{12}$ ) em concentrações letais na mortalidade e na reprodução do organismo-teste <i>D. magna</i> .....	127
Figura 47 - Análise do mento das larvas dos <i>C. sancticaroli</i> ; a) I geração b) II geração c) III geração .....	135
Figura 48 – Comprimentos das larvas em diferentes gerações da espécie <i>C. sancticaroli</i> quando expostas ao LAS padrão.....	137
Figura 49 – Boxplot representando o tamanho das asas de <i>C. sancticaroli</i> na I geração .....	138
Figura 50 – Tamanho das asas entre a I e a II geração .....	139
Figura 51 – Boxplot representando a fecundidade potencial para I geração de <i>C. sancticaroli</i> .....	140
Figura 52 – Fecundidade potencial entre a I e a II geração .....	141
Figura 53 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>C. sancticaroli</i> nas fases de operação do reator para os afluentes e efluentes.....	145
Figura 54 – Boxplot representando a mortalidade do inseto <i>C. sancticaroli</i> nas fases de operação do reator com efluentes e suas diluições .....	146

Figura 55 – Análise de Cluster com similaridade de Bray-Curtis para <i>C. sancticaroli</i> nas fases de operação do reator .....	147
Figura 56 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>A. inaequalis</i> nas seis fases de operação do reator para os afluentes e efluentes.....	149
Figura 57 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>A. inaequalis</i> nas seis fases de operação do reator para os efluentes e suas diluições.....	150
Figura 58 – Análise de Cluster com similaridade entre as VI Fases de operação do reator e seu efeito tóxico à espécie <i>A. inaequalis</i> .....	151
Figura 59 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>D. magna</i> nas seis fases de operação do reator para os afluentes e efluentes.....	153
Figura 60 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>D. magna</i> nas seis fases de operação do reator para os Efluente e suas diluições.....	154
Figura 62 – Análise de Cluster para as seis fases de operação do reator com <i>D. magna</i>	155
Figura 62 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>C. sancticaroli</i> na fase VI <sub>b</sub> da operação do reator.....	160
Figura 63 – Análise de Cluster de similaridade entre os efeitos tóxicos do afluente, efluente e diluições da fase VI <sub>b</sub> de operação do reator para as larvas de <i>C. sancticaroli</i> .....	161
Figura 64 – Boxplot representando o crescimento em tamanho das larvas do inseto <i>C. sancticaroli</i> na fase VI <sub>b</sub> da operação do reator .....	163
Figura 65 – Análise de Cluster para o tamanho das larvas do <i>C. sancticaroli</i> na fase VI <sub>b</sub> de operação do reator.....	164
Figura 66 – Boxplot representando a mortalidade da espécie <i>A. inaequalis</i> na fase VI <sub>b</sub> da operação do reator.....	166
Figura 67 – Análise de Cluster para a fase VI <sub>b</sub> de operação do reator com <i>A. inaequalis</i> .....	167
Figura 68 – Boxplot representando a reprodução da espécie <i>A. inaequalis</i> na fase VI <sub>b</sub> da operação do reator.....	168
Figura 69 – Análise de Cluster com similaridade entre a fase VI <sub>b</sub> de operação do reator na reprodução da espécie <i>A. inaequalis</i> .....	169
Figura 70 – CL <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> dos testes de toxicidade aguda e crônica utilizando o LAS padrão. ....	172
Figura 71 – Alimento Tetramin® macerado em gral com pistilo de porcelana .....	205
Figura 72 – Cultivo de alga <i>P. subcapitata</i> em fase exponencial de crescimento, em sala climatizada a 22 ± 2°C, aeração constante e fotoperíodo 16h claro:8h escuro.....	210
Figura 73 – Coletor das fêmeas adultas da espécie <i>C. sancticaroli</i> ; <b>a)</b> Entrada do inseto por sucção exercida pelo lado b; <b>b)</b> Pressão exercida para a sucção dos organismos; <b>c)</b> Recipiente plástico para armazenar as fêmeas adultas. ....	211

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos referente a remoção do LAS.....	39
Tabela 2 – Toxicidade média aquática medida em mg.L <sup>-1</sup> para diferentes homólogos de LAS.....	45
Tabela 3 – Diferentes níveis de transferência de energia .....	48
Tabela 4 – Características químicas do LAS Padrão .....	66
Tabela 5 – Fases da operação do reator de leito fluidificado em escala aumentada operado pela doutoranda Thais Z. Macedo.....	67
Tabela 6 – Características do teste de sensibilidade para os organismos-teste.....	75
Tabela 7 – Características padrão de testes de toxicidade aguda para os 3 organismos-teste utilizados .....	79
Tabela 8 – Características padrão de testes de toxicidade crônica para os 3 organismos-teste utilizados .....	82
Tabela 9 – Concentração de LAS padrão que causa letalidade a 50% dos organismos- teste <i>C. sancticaroli</i> .....	101
Tabela 10 – Concentração de LAS padrão que causa letalidade a 50% dos organismos- teste <i>A. inaequalis</i> . .....	104
Tabela 11 – Concentração de LAS padrão que causa imobilidade a 50% dos organismos- teste <i>D. magna</i> .....	108
Tabela 12 – Concentrações CENO, CEO e CL <sub>50</sub> de LAS padrão para a espécie <i>C. sancticaroli</i> .....	116
Tabela 13 – Concentrações CENO, CEO e CL <sub>50</sub> de LAS padrão para o organismo-teste <i>A. inaequalis</i> . .....	122
Tabela 14 – Concentrações CENO, CEO e CE <sub>50</sub> de LAS padrão para os organismos- teste <i>D. magna</i> .....	128

Tabela 15 – Concentrações de LAS que não causam efeito observado (CENO) em diferentes espécies da biota aquática .....	133
Tabela 16 – Diluições CENO, CEO e CL <sub>50</sub> para a espécie <i>C. sancticaroli</i> na fase VI de operação do reator.....	148
Tabela 17 – Diluição CENO, CEO e CE <sub>50</sub> do reator na fase VI de operação para a espécie <i>D. magna</i> .....	156
Tabela 18 – Composição química do Fishtamin®.....	206
Tabela 19 - CL <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> de LAS para espécies aquáticas disponíveis na literatura.....	212

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BOD	-	Incubadora <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CE	-	Concentração Efetiva
CENO	-	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	-	Concentração de Efeito Observado
CETESB	-	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CL	-	Concentração Letal
CNPq	-	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	-	Sulfato de Cobre Penta Hidratado
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	-	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	-	Demanda Química de Oxigênio
EESC	-	Escola de Engenharia de São Carlos
EGSB	-	<i>Expanded Granular Sludge Bed</i>
HC	-	<i>Hazardous Concentration</i>
HERA	-	<i>Human and Environmental Risk Assessment</i>
KCl	-	Cloreto de Potássio
LAS	-	Alquilbenzeno Linear Sulfonado
LEAA	-	Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos
LPB	-	Laboratório de Processos Biológicos
OECD	-	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PNEC	-	Concentrações Previstas Sem Efeito
RALF	-	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
SSD	-	Distribuição de Sensibilidade de Espécie
UASB	-	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
USEPA	-	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USP	-	Universidade de São Paulo

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\text{mg.L}^{-1}$	-	miligramas por litro
$\text{g.L}^{-1}$	-	grama por litro
$^{\circ}\text{C}$	-	Graus Celsius
cm	-	centímetro
g	-	grama
L	-	litro
$\mu\text{S.cm}^{-1}$	-	microsiemens por centímetro
mL	-	mililitro
h	-	hora

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	30
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
4.1	Ações Antrópicas e o Meio Ambiente Aquático.....	32
4.2	Surfactantes.....	34
4.2.1	Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS).....	37
4.2.2	Tratamento e Remoção do LAS.....	39
4.3	Bioensaios de Monitoramento.....	41
4.3.1	Histórico da Ecotoxicologia.....	41
4.3.2	Testes Ecotoxicológicos.....	42
4.3.2.1	Testes Ecotoxicológicos em Ambientes Aquáticos.....	43
4.3.3	Organismos-teste.....	46
4.3.3.1	<i>Chironomus sancticaroli</i> , Strixino e Strixino, 1981.....	49
4.3.3.2	<i>Allonais inaequalis</i> , Stephenson, 1911.....	56
4.3.3.3	<i>Daphnia magna</i> , Straus, 1820.....	58
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
5.1	Cultivo e Manutenção das Espécies Estudadas.....	68
5.1.1	Cultivo e manutenção de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	68
5.1.2	Cultivo e manutenção de <i>Allonais inaequalis</i> .....	69
5.1.3	Cultivo e manutenção de <i>Daphnia magna</i> .....	70
5.2	Bioensaios de Toxicidade.....	72
5.2.1	Testes de Sensibilidade (Carta-controle).....	75
5.2.2	Bioensaios de Toxicidade Aguda.....	79
5.2.3	Bioensaios de Toxicidade Crônica.....	82
5.2.3.1	Teste de Toxicidade Crônica de Longa Duração – Teste de Gerações..	87
5.2.3.1.1	Deformidade Bucal.....	89
5.2.3.1.2	Avaliação da Fecundidade Potencial.....	90
5.3	Análises estatísticas.....	92
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
6.1	Carta-controle.....	94

6.2	Hipótese A .....	98
6.2.1	Teste de Toxicidade Aguda com LAS padrão .....	98
6.2.1.1	<i>Chironomus sancticaroli</i> .....	98
6.2.1.2	<i>Allonais inaequalis</i> .....	102
6.2.1.3	<i>Daphnia magna</i> .....	105
6.2.1.4	Impacto à biota aquática .....	108
6.2.2	Teste de Toxicidade Crônica com LAS padrão .....	113
6.2.2.1	<i>Chironomus sancticaroli</i> .....	113
6.2.2.2	<i>Allonais inaequalis</i> .....	119
6.2.2.3	<i>Daphnia magna</i> .....	125
6.2.2.4	Impacto à biota aquática .....	130
6.2.3	Teste de Toxicidade Crônica de Longa Duração – Teste de Gerações.....	134
6.2.3.1	Impacto à biota aquática .....	142
6.3	Hipótese B.....	143
6.3.1	Teste de Toxicidade Aguda com Reator .....	143
6.3.1.1	<i>Chironomus sancticaroli</i> .....	143
6.3.1.2	<i>Allonais inaequalis</i> .....	148
6.3.1.3	<i>Daphnia magna</i> .....	152
6.3.1.4	Impacto à biota aquática .....	157
6.3.2	Teste de Toxicidade Crônica com Reator .....	159
6.3.2.1	<i>Chironomus sancticaroli</i> .....	159
6.3.2.2	<i>Allonais inaequalis</i> .....	166
6.3.2.3	Impacto ambiental.....	170
6.4	Considerações Finais .....	172
7	CONCLUSÕES .....	175
8	SUGESTÕES .....	177
	REFERÊNCIAS.....	178
	APÊNDICE A – Composição Química de Vitaminas e Alimento .....	205
	APÊNDICE B – Composição e Modo de preparação da Água reconstituída de Elevada Dureza.....	207
	APÊNDICE C – Meio Oligo – Cultivo de alga .....	208
	APÊNDICE D – Procedimento de Inoculação da alga.....	209
	APÊNDICE E – Sugador (Teste de Gerações).....	211

APÊNDICE F – Concentrações de LAS que causam efeito de toxicidade aguda às espécies aquáticas.....	212
--	-----



## 1 INTRODUÇÃO

Conforme observado nos últimos séculos, a população mundial vem aumentando exponencialmente e, com seu crescimento, há o aumento de substâncias tóxicas presentes no meio ambiente. Em geral, muitas dessas substâncias apresentam efeitos pouco conhecidos para os seres humanos e para o meio ambiente. Algumas dessas substâncias denominadas poluentes emergentes, vem sendo aportadas em mananciais hídricos e estações de tratamento de esgoto, diariamente.

Entre essas substâncias, ressalta-se os surfactantes por serem os principais componentes dos detergentes e demais produtos de limpeza, pela sua ação como agentes tensoativos. Os surfactantes aniônicos são historicamente, os mais antigos e os mais comuns, devido às suas excelentes propriedades de limpeza, formação de espuma e pelo seu baixo custo. Entre eles, o que mais se destaca é o Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS), por ser o tensoativo mais consumido e de maior produção mundial (BERGÉ et al., 2018). No Brasil, o LAS apresenta alta comercialização, chegando a serem comercializadas no mercado interno cerca de 80 mil t/ano, e por isso, é o detergente sintético encontrado com maior frequência nos ambientes aquáticos.

O elevado consumo de LAS, tanto no setor industrial quanto no doméstico, vem acarretando o aumento de suas concentrações no esgoto (1 a 18 mg.L<sup>-1</sup>), que, conseqüentemente, chega às estações de tratamento de efluentes ou nos corpos d'água, podendo ocasionar impactos no meio ambiente (GRANATTO et al., 2019; MUNGRAY; KUMAR, 2009).

Quando esse produto é lançado em um curso d'água ou em estações de tratamento de esgoto, pode causar prejuízos tanto no tratamento das águas residuárias com o custo adicional de tratamento quanto para o meio ambiente aquático. As elevadas concentrações de surfactantes podem causar danos ao funcionamento e integridade da membrana plasmática de células vivas, provocados pela redução na absorção de nutrientes essenciais, no consumo de oxigênio e na liberação de produtos metabólicos tóxicos, causados pela adsorção do surfactante na superfície celular (LEE, 1970; SHCHERBAKOVA; LAURINAVICHIOUS; AKIMENKO, 1999). Conseqüentemente, o LAS causa danos na diminuição da concentração de elementos necessários para a vida aquática, tais como, oxigênio dissolvido devido à diminuição da tensão superficial água/ar, diminuição penetração da luz, mantendo as partículas em suspensão, aumento da concentração de

compostos xenobióticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, inibindo sua degradação. Esses efeitos podem gerar a inibição dos microrganismos decompositores de matéria orgânica nas estações de tratamento de esgoto, podendo assim comprometer sua eficiência na remoção de substâncias tóxicas (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006).

Silva et al. (2017), apresentam um estudo de efeito tóxico do LAS para a biota aquática, no qual comprovam que concentrações a partir de  $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$  LAS afetam o ecossistema aquático. A toxicidade do LAS depende do comprimento de sua cadeia carbônica, sendo que, quanto menor o número de carbonos, menos tóxico ele é para os organismos aquáticos. Desse modo, para avaliação da toxicidade do LAS aos organismos aquáticos, utilizou-se neste trabalho o Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS padrão) com predominância de homólogos de 12 carbonos ( $C_{12}$ ) (dodecilbenzeno sulfonado de sódio) (HERA, 2013).

Testes ecotoxicológicos, ferramentas importantes para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, podendo, por exemplo, ser utilizados para a avaliação da toxicidade do LAS. Somente análises físicas e químicas comumente realizadas, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente, sendo insuficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Assim, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam (Costa et al., 2008).

Os testes ecotoxicológicos são realizados utilizando-se organismos aquáticos de diferentes funções tróficas da cadeia alimentar que, devido a sua característica de pouca tolerância a substâncias químicas, podem apresentar alterações, sejam fisiológicas, morfológicas ou comportamentais, quando expostos a contaminantes. As exposições são feitas em determinados períodos de tempo, podendo ser em amostras de efluentes, diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, ou até mesmo em amostras ambientais. O contato com agentes tóxicos pode ser analisado por meio de teste de toxicidade aguda, que avaliam os efeitos severos e rápidos, sofridos pelos organismos-teste em curto período de tempo, geralmente medidos em 96 horas, ou com teste de toxicidade crônica, utilizando-se concentrações subletais, em tempo de exposição mais longos, que

pode variar para cada espécie estudada. Esta exposição dos organismos-teste aos contaminantes, em níveis subletais, pode não levá-los à morte, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo.

Neste contexto, este trabalho apresenta diferentes objetivos para responder duas hipóteses, quanto aos efeitos tóxicos do LAS padrão e amostras de reator contendo LAS por meio de testes ecotoxicológicos. Para testar essas hipóteses, foram utilizados três organismos-teste (invertebrados aquáticos) de diferentes funções tróficas da cadeia alimentar para identificação dos efeitos do LAS padrão e amostras do reator de leiteo fluidificado em escala aumentada, na biota aquática.

## 2 JUSTIFICATIVA

Os efeitos dos surfactantes incluem o retardo do crescimento, a alteração do comportamento alimentar e inibição de órgãos quimiorreceptores em organismos aquáticos. Estudos prévios utilizando-se reator de leito fluidificado apontam para a remoção do Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS), mas pouco se sabe sobre a toxicidade desse composto em amostras mais complexas com pré e pós-tratamento, como exemplo: água residuária de lavanderia combinada com esgoto doméstico, para a biota aquática

## 3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Este trabalho foi dividido em duas hipóteses:

HIPÓTESE A: O surfactante LAS padrão causa efeitos negativos na biota aquática, demonstrado por meio de bioensaios de toxicidade em organismos-teste.

OBJETIVOS: Estabelecer a CL<sub>50</sub> ou CE<sub>50</sub> de LAS padrão nas larvas do inseto *C. sancticaroli*, no oligoqueto *A. inaequalis* e no crustáceo *D. magna* em bioensaios de toxicidade aguda;

Estabelecer a CL<sub>50</sub> ou CE<sub>50</sub>, CENO e CEO de LAS padrão para os organismos-teste em bioensaios de toxicidade crônica;

Avaliar a capacidade reprodutiva das espécies *A. inaequalis* e *D. magna* em teste de toxicidade crônica com LAS padrão;

Avaliar o desenvolvimento da larval de *C. sancticaroli* em exposição crônica ao LAS padrão;

Avaliar o comprimento das asas, a fecundidade potencial, a deformidade bucal das larvas em IV instar e o desenvolvimento das lavas de *C. sancticaroli* em teste de longa duração em exposição ao LAS padrão, entre gerações dessa espécie.

HIPÓTESE B: O tratamento em reator de leito fluidificado de amostra complexa como água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico bruto, contendo o surfactante LAS, diminui os efeitos negativos para a biota aquática, demonstrado por meio de bioensaios de toxicidade em organismos-teste.

OBJETIVOS: Estabelecer a  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ , CENO e CEO das diluições do efluente do reator de leito fluidificado para as larvas do inseto *C. sancticaroli* e para o oligoqueto *A. inaequalis* em bioensaios de toxicidade aguda e crônica e para o crustáceo *D. magna* em bioensaios de toxicidade aguda;

Avaliar a capacidade reprodutiva do organismo-teste *A. inaequalis* em teste de toxicidade crônica com amostras (afluente, efluente e diluições do efluente) do reator de leito fluidificado;

Avaliar o desenvolvimento da larval de *C. sancticaroli* em exposição crônica as amostras do reator;

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Ações Antrópicas e o Meio Ambiente Aquático

O incremento populacional tem ocasionado diferentes impactos ambientais, como a poluição da água, solo e atmosfera, que ocasionam, perda de biodiversidade, alterações na qualidade das águas, na produção primária e secundária, e toxicidade, que, geralmente, estão associadas à deficiência no tratamento dos efluentes e/ou práticas de descartes *in natura* sem nenhum tipo de tratamento prévio (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018a; BILAL et al., 2017a, 2017b, 2017c, 2017d; CHATHA; ASGHER; IQBAL, 2017; CORCORAN et al., 2010; DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011).

A poluição ambiental, principalmente dos mananciais hídricos tornou-se assunto de interesse público e da comunidade científica em geral. Vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de se averiguar os impactos resultantes das atividades antrópicas, sendo elas, de caráter agrícola (diferentes tipos de cultura e usos do solo), das atividades de mineração e da poluição orgânica e industrial nesses ambientes (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018b; BILAL et al., 2017b; CHATHA; ASGHER; IQBAL, 2017; CLETO FILHO; WALKER, 2001; CORBI et al., 2000, 2010; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO; DOS SANTOS, 2008; DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; JARDIM, 1992; LÓPEZ-DOVAL et al., 2017; SOPILNIAK et al., 2018; VYSTAVNA et al., 2018; WEBER, 1992).

Não apenas os países desenvolvidos vêm sendo prejudicados por esses problemas ambientais, mas, também, as nações em desenvolvimento sofrem impacto da poluição. A expansão da indústria e da agricultura trouxe milhares de novos produtos, ou seja, diferentes tipos de substâncias químicas que são aportados em toneladas para os rios e oceanos diariamente (BARBER et al., 2015; CORCORAN et al., 2010; HEBERER, 2002). Entre essas substâncias químicas estão os poluentes emergentes, definidos como substâncias potencialmente tóxicas, suspeitas de afetar o meio ambiente, cujo seus efeitos ainda são pouco conhecidos (AHMED; HAFIZ; DHAMA, 2017; DAUGHTON, 2004; DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011).

Há uma vasta categoria desses contaminantes orgânicos presentes em produtos comerciais e que podem atuar como desreguladores endócrinos, como: produtos farmacêuticos e de uso veterinário; substâncias tensoativas, como os surfactantes; hormônios sintéticos e naturais; pesticidas; polímeros de baixa massa molecular; solventes,

entre outros presentes em águas residuárias (BITTENCOURT et al., 2016; FILHO; LUVIZOTTO-SANTOS; VIEIRA, 2007; HAIGH, 1996a; LOPEZ DE ALDA et al., 2003; RAGHAV et al., 2013; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

Os poluentes emergentes podem causar alterações significativas nos ecossistemas aquáticos e alguns poluentes hidrofílicos podem acarretar bioacumulação em diferentes níveis tróficos, como por exemplo, no tecido adiposo de peixes e crustáceos ou ainda em aves e outros animais terrestres, bem como no leite de bovinos (CORBI et al., 2010; DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; LOPEZ DE ALDA et al., 2003; ROCHA et al., 2018a; SIQUEIRA; BRAGA, 2000; WANG et al., 2017). Alguns exemplos de poluentes emergentes atualmente estudados e encontrados no ambiente aquático: diclofenaco, ibuprofeno, hormônio estrona, bisfenol, nonilfenol, cafeína, estradiol, parabenos, triclosan, Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS), entre outros (GAGO-FERRERO et al., 2013; HUERTA et al., 2015; MARTÍN et al., 2017; RUHÍ et al., 2016).

Alguns contaminantes emergentes hidrossolúveis possuem a capacidade de alteração endócrina, que modificam ou interagem com o sistema endócrino de vertebrados e invertebrados e são classificadas como xenobióticos (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018b). Seu potencial risco ambiental tem preocupado a comunidade científica, de modo que diversos estudos têm sido desenvolvidos com intuito de avaliar seus efeitos na biota aquática, bem como a remoção dos mesmo nesse ecossistema (BAYNE; CLARKE; GRAY, 1988; LÜCHMANN et al., 2015; MOORE et al., 1987; SAPONE et al., 2016)

O monitoramento de contaminantes orgânicos emergentes foi estudado pela agência de Pesquisas Geológicas dos Estados Unidos (*United States Geological Survey*), a qual revelou que subprodutos da degradação de surfactantes e esteroides estão no grupo de compostos que apresentam elevadas concentrações no ambiente aquático (ERICKSON, 2002). A Diretiva 2000/60 da Comunidade Europeia de Água, decisão final nº 2455/2001, aponta que tanto os surfactantes quanto os esteroides são considerados compostos disruptores endócrinos devido à sua atividade estrogênica, e que os compostos nonilfenóis, octilfenóis e surfactantes, foram listados como substâncias perigosas para o ambiente aquático (ENVIRONMENT AGENCY, 1998; EUROPEAN UNION, 2001).

A presença desses contaminantes no meio aquático tem sido acompanhada e monitorada, integrando análises químicas e biológicas, nos quais pode-se identificar que os

esteroides e os surfactantes são compostos responsáveis pela indução de efeitos estrogênicos, como feminização e hermafroditismo em organismos aquáticos (DESBROW et al., 1998; GEISSEN et al., 2015; HAQ; RAJ, 2019; RAGHAV et al., 2013).

## 4.2 Surfactantes

Os surfactantes são conhecidos pela sua característica anfifílica, ou seja, por apresentarem região hidrofílica (solúvel em meio aquoso) e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos), sendo assim, os principais componentes dos detergentes e demais produtos de limpeza, podendo ser chamados também de agentes tensoativos.

Os surfactantes possuem uma estrutura molecular assimétrica, que consiste em um grupo apolar hidrofóbico, com uma cadeia de hidrocarboneto e um grupo polar hidrofílico (pode ser iônica, aniônica ou catiônica) e sua classificação é feita em função da carga elétrica da parte hidrofílica da molécula. Em função dessas características, os surfactantes apresentam diferentes graus de polaridade entre as fases fluidas tanto para óleo/água e água/óleo, o que permite a redução da tensão interfacial e superficial. Essas características levaram os surfactantes a diversos usos industriais, tais como solubilização, detergentia, lubrificação, emulsificação, entre outras (BIGARDI et al., 2003; BORSATO; GALÃO; MOREIRA, 1999; DE SOUZA BEGHELLI et al., 2018; HAIGH, 1996b; LI; SCHRÖDER, 2000; NITSCHKE; PASTORE, 2002; PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006; TRIPATHY et al., 2018).

Os surfactantes aniônicos são historicamente os mais antigos e os mais comuns, como por exemplo: o sabão e o detergente, sendo estes sais de ácidos graxos de cadeia longa. Também são utilizados nas formulações farmacêuticas para aumentar a eficiência dos ingredientes ativos na ligação direta ao fármaco (SEEDHER, 2001) ou aumentando a adsorção ou absorção de fármacos por meio de sua estrutura molecular, hidrofóbica e hidrofílica, em órgãos e organismos (YUSHMANOV et al., 1994). Eles ainda podem ser utilizados na remoção de contaminantes no solo, como por exemplo produtos petroquímicos. Estudo realizado por Peters et al. (1992), os surfactantes aniônicos se destacaram na remoção do óleo diesel em solo contaminado.

Quando os surfactantes são lançados no curso d'água ou até mesmo em sistemas de tratamento de águas residuárias, podem causar diversos prejuízos, já que as estações de tratamento conseguem tratar apenas uma parte desses produtos, são degradados por microrganismos. O que não é tratado nas estações de tratamento, acaba entrando no meio ambiente, seja ele aquático ou terrestre (BERNA et al., 2007; MARTÍN et al., 2017). Alguns pesquisadores relataram a preocupação com o lodo das estações de tratamento de efluentes, devido a inibição dos microrganismos pelo acúmulo de elevadas concentrações de surfactantes, podendo comprometer a eficiência das estações no tratamento dos poluentes (HOLT et al., 1995).

Os pesquisadores Ivanković e Hrenović (2010) observaram que, nas últimas décadas, mais de 4,2 milhões de toneladas de produtos detergentes e 1,2 milhões de toneladas de produtos amaciantes foram usados anualmente na Europa, e a produção mundial de detergentes sintéticos foi em torno de 7,2 milhões de toneladas para esse mesmo período. Em 2006, a produção mundial de surfactantes subiu para 12,5 milhões de toneladas e em 2007, mais de 3 milhões de toneladas foram produzidas apenas na Europa.

Os surfactantes estão sendo utilizados diariamente de forma excessiva tanto nos ambientes industriais como nos residenciais, ocasionando a dispersão desses produtos no meio ambiente, no qual podem ser encontrados nas águas, sedimentos e até mesmo no solo (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010; YING, 2006). O uso excessivo de qualquer tipo de surfactante juntamente com seu descarte no meio ambiente, especialmente em corpos hídricos, pode afetar seriamente os ecossistemas. Por esta razão, alguns países monitoram e regulamentam as quantidades de surfactantes liberados nos efluentes e corpos receptores.

Os países europeus, dispõe de normas que visam às boas práticas ambientais para os detergentes de limpeza doméstica, tanto para sua utilização quanto ao seu manuseio e rotulagem conforme a *Commission Recommendation 89/542/EEC* e *Commission Recommendation 98/480/EC* (EUROPEAN UNION, 1989, 1998). Na Croácia as concentrações máximas permitidas variam do tipo de surfactante e do ambiente no qual ele se encontra, como por exemplo, as estações de tratamento de esgoto podem receber concentração de até 10 mg.L<sup>-1</sup> de surfactantes aniônicos, já nos corpos hídricos a concentração máxima é de até 1 mg.L<sup>-1</sup> para esse mesmo tipo de surfactante (HRVATSKA, 1999).

No Brasil, “as substâncias tensoativas que reagem ao azul de metileno” citadas nas Resoluções Normativas CONAMA N° 357 e, complementada e alterada pela CONAMA N° 430, sobre os padrões de qualidade das águas, com o enfoque apenas para o surfactante LAS (Alquilbenzeno Linear Sulfonado), preconiza 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 0,2 mg.L<sup>-1</sup>, nas águas doce Classe 1 e águas salinas e salobras, respectivamente (CONAMA, 2005, 2011).

De acordo com Cserhát; Forgács; Oros (2002) os surfactantes encontrados em corpos hídricos em altas concentrações podem modificar o comportamento de peixes, nos quais, apresentam grandes absorções nas brânquias e passam a apresentar movimentos erráticos, espasmos musculares e torção do corpo. Os surfactantes podem, ainda, alterar a pigmentação e a morfologia dos microrganismos, além de ativar ou inibir enzimas, alterar a estrutura polipeptídica e mudar a carga superficial da molécula (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006).

A toxicidade dos surfactantes pode causar alterações conforme o organismo avaliado e o tipo de surfactante, entre os quais o crustáceo de água doce *Daphnia magna* tem se mostrado mais sensível à toxicidade aguda (CSERHÁTI; FORGÁCS; OROS, 2002).

Martín et al. (2017) estudaram a presença de 36 substâncias emergentes em sistemas marinhos e encontraram 25 delas no organismo filtrador pepino do mar da espécie *Holothuria tubulosa*, utilizadas no biomonitoramento de poluição marinha. As substâncias encontradas com maior frequência nos filtradores e nos sedimentos avaliados foram os surfactantes, alquilfenóis e parabens, sendo que o subproduto de surfactante, 4-nonilfenol, foi o contaminante encontrado em concentrações mais elevadas em ambas as amostras.

Os surfactantes podem afetar células vivas provocando danos ao funcionamento e integridade da membrana plasmática (SHCHERBAKOVA; LAURINAVICHIOUS; AKIMENKO, 1999). De acordo com Lee (1970), essa toxicidade é provocada pela redução na absorção de nutrientes essenciais, no consumo de oxigênio e na liberação de produtos metabólicos tóxicos, causada pela adsorção do surfactante na superfície celular. Da mesma forma, segundo Penteado; El Seoud; Carvalho (2006), o LAS pode causar diversos efeitos no meio aquático, como, por exemplo, a diminuição da concentração de elementos necessários para a vida aquática, tais como, oxigênio dissolvido devido à diminuição da tensão superficial água/ar; diminuição da penetração da luz, por manter as partículas presentes em suspensão; e aumento da concentração de compostos xenobióticos, como

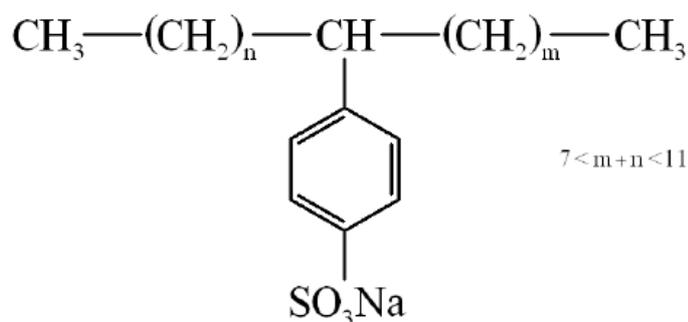
bifenilas policloradas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes no sedimento por solubilização micelar, inibindo sua degradação.

#### 4.2.1 Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS)

O LAS é um surfactante aniônico constituído de uma mistura de homólogos e isômeros de posição “*para*” ligado a cadeias alquiladas lineares com átomos de carbono de C<sub>10</sub> a C<sub>16</sub> com predominância de C<sub>10</sub> a C<sub>13</sub> (OECD SIDS, 2005; PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006; RAND, 1995; SILVA et al., 2017; THE SOAP AND DETERGENT ASSOCIATION, 1996; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996).

Como o LAS é um surfactante biodegradável, sua degradação ocorre com a quebra da cadeia alquílica, do grupo sulfonado e do anel aromático (PERALES et al., 1999). A estrutura molecular do LAS está representada na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura molecular do LAS



Fonte: Adaptado de Penteado; El Seoud; Carvalho (2006).

Wolf e Feijtel (1998) ressaltam que pode ocorrer a substituição em todas as posições dos átomos de carbono da cadeia linear no grupo fenila do LAS, exceto na posição do carbono 1, podendo formar 26 moléculas diferentes.

O LAS tende a ser sorvido em sólidos em suspensão e acumulado em sedimentos, como resultado da natureza anfifílica de sua cadeia carbônica e pelo seu grupo sulfonato. Sendo assim, a substância pode ser solubilizada e transportada por água (HAMPEL et al., 2012; PRATS et al., 1993) e pode ser usado como um indicador de qualidade da água,

devido ao impacto da atividade humana (BRACK; DULIO; SLOBODNIK, 2012; CETESB, 2014).

Por ser o tensoativo mais consumido no mundo, e por ser utilizado como princípio ativo dos detergentes e sabões em pó, conseqüentemente, o de maior produção, sendo 3 milhões de toneladas no ano de 2000 e consumo mundial de 18,2 milhões de toneladas no ano de 2003 (SILVA et al., 2017). Assim como no Brasil, o LAS é o detergente sintético encontrado com certa frequência nos ambientes aquáticos, devido a sua alta comercialização, chegando a lançar no mercado interno cerca de 80 mil t/ano de LAS (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006).

O elevado consumo industrial e doméstico de LAS tem acarretado o aumento de suas concentrações no esgoto (1 a 18 mg.L<sup>-1</sup>), que conseqüentemente, chegam às estações de tratamento de efluentes e/ou nos corpos d'água, ocasionando grandes impactos no meio ambiente (GRANATTO et al., 2019; MUNGRAY; KUMAR, 2009). Em estudos prévios foi identificado que concentrações a partir de 0,27 mg.L<sup>-1</sup> LAS em água podem apresentar efeitos tóxicos nos ecossistemas aquáticos (HERA, 2013; SILVA et al., 2017).

Eichhorn et al. (2002) monitoraram LAS no Rio Macacau, na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, o qual fornece água para 2,5 milhões de pessoas. A determinação do LAS foi realizada por cromatografia líquida e espectrometria de massa e foram detectados neste rio de 0,01 a 0,15 mg.L<sup>-1</sup> LAS.

Ademais, Braga e Varesche (2014) encontraram em efluentes de lavanderia comercial de 12 a 1024 mg.L<sup>-1</sup> LAS e ainda metais, diversas enzimas e outros 33 compostos orgânicos xenobióticos, incluindo conservantes, solventes, compostos auxiliares de limpeza, antioxidantes entre outros. A interferência dos compostos xenobióticos na degradação dos surfactantes pode acarretar prejuízos ao meio ambiente, explicada pela gama de componentes potencialmente tóxicos para organismos aquáticos (CAROSIA et al., 2014).

Dada a crescente preocupação sobre a presença de LAS no meio ambiente e nas estações de tratamento de águas residuárias, estudos estão sendo desenvolvidos para o tratamento e remoção desse material tensoativo nos efluentes.

#### 4.2.2 Tratamento e Remoção do LAS

Muitos estudos realizados sobre a remoção e tratamento do LAS, com água residuária sintética, vêm sendo desenvolvidos e maioria deles estão reportados na literatura em escalas laboratoriais. Conforme observado na Tabela 1, a remoção do LAS foi realizada variando tipos de reatores como: reator anaeróbio horizontal de leito fixo.

Tabela 1 – Estudos referente a remoção do LAS

REATOR	FONTE DE LAS	CONCENTRAÇÃO LAS INICIAL	EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO	REFERÊNCIA
BATELADAS SEGUENCIAIS	padrão	22 mg.L <sup>-1</sup>	53%	DUARTE et al., 2010
RALF	sabão em pó	16 mg.L <sup>-1</sup>	41%	FERREIRA, 2012
RALF	sabão em pó	14 mg.L <sup>-1</sup>	48%	CAROSIA et al., 2014
UASB	padrão	14 mg.L <sup>-1</sup>	50%	OKADA et al., 2013a
UASB	padrão	12 mg.L <sup>-1</sup>	76%	OKADA et al., 2013b
RALF	água residuária de lavanderia comercial	23 mg.L <sup>-1</sup>	65%	BRAGA, 2014
EGSB	água residuária de lavanderia comercial	28 mg.L <sup>-1</sup>	59%	DELFORNO et al., 2014
RALF	água residuária de lavanderia comercial	20 mg.L <sup>-1</sup>	75%	MACEDO et al., 2015
RALF	água residuária de lavanderia comercial	22 mg.L <sup>-1</sup>	96%	ANDRADE et al., 2017
EGSB	Esgoto doméstico	7 mg.L <sup>-1</sup>	60%	GRANATTO et al., 2019

UASB - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*; RALF - Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado; Reator Anaeróbio em Bateladas Sequenciais; EGSB - *Expanded Granular Sludge Bed*.

O reator anaeróbio de leito fluidificado tem sido utilizado desde 1970 para tratamento de efluentes industriais. A partir de então, esta configuração de reator, tanto em escala laboratorial quanto piloto, foram construídas nas estações de tratamento de esgoto nos Estados Unidos e Europa (GONÇALVES et al., 2001).

A aplicação desse reator no tratamento de efluentes domésticos e industriais têm sido crescente devido a suas vantagens sobre os processos tradicionais. Este reator promove a suspensão das partículas sólidas do leito, por ter fluxo ascendente da massa líquida, favorecendo assim, a retenção dos microrganismos que realizam a decomposição da matéria orgânica presente no substrato afluente (METCALF & EDDY, 2016; SANZ; FDZ-POLANCO, 1990).

O estudo conduzido por Oliveira et al. (2013), utilizando reator anaeróbio de leito fluidificado, obteve remoção acima de 90% de LAS para concentrações afluentes variando de 8 a 46 mgL<sup>-1</sup> LAS.

Delforno et al. (2017) utilizaram três configurações reacionais em escala de bancada: EGSB, UASB e RALF para comparar a degradação de compostos orgânicos de efluente de lavanderia comercial diluída em água de abastecimento, no qual observou-se maiores eficiências de remoção de LAS por meio do tratamento com RALF, comparado aos outros reatores utilizados neste estudo. Estudos realizados por Macedo et al. (2017) apresentam eficiência superior a 60% na remoção no LAS com reator anaeróbio de leito fluidificado mesmo em concentrações elevadas (21±7 mg.L<sup>-1</sup>).

Dessa forma, os estudos a respeito dos efeitos tóxicos á biota aquática são de fundamental importância quando esses organismos são expostos continuamente a emissões de efluentes contendo LAS.

### 4.3 Bioensaios de Monitoramento

#### 4.3.1 Histórico da Ecotoxicologia

No ano de 1969, em Estocolmo, durante a reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), o termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez, pelo toxicologista Francês René Truhaut (RAND, 1995; TRUHAUT, 1977; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Ecotoxicologia é definida de várias maneiras, por diversos pesquisadores, porém todas seguem a mesma proposta: é a ciência que estuda os efeitos tóxicos das substâncias, tanto naturais quanto sintéticas, em organismos vivos, sendo eles: comunidades e/ou população, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos (LEVIN et al., 1989; MORIARTY, 1988; NEWMAN, 2010; TRUHAUT, 1977; WALKER et al., 2012; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

As agências Ambientais dos EUA e da Europa, começaram a desenvolver na década de 80, protocolos de testes de toxicidade padronizados para organismos aquáticos (OECD, 1992, 2004, 2011, 2012; USEPA, 1991, 2002). A partir do marco regulatório chamado *Clean Water Act*, a Agência de Proteção Ambiental Americana, implementou programas de controle de poluição, desde padrões de emissão e qualidade de efluentes industriais, à padronização da qualidade das águas e concentração aceitável de contaminantes em águas superficiais. Em 1984, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) implementou como complemento as análises químicas, o monitoramento biológico, “Biomonitoramento”, no qual utiliza-se organismos vivos para monitoramento da qualidade da água (USEPA, 1991, 2002, 2016a, 2016b). Nessa mesma década a Organização de Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) estabelecia protocolos de testes de toxicidade com algas, microcrustáceos e peixes (OECD, 1992, 2004, 2011, 2012).

Nas últimas décadas, no Brasil, tanto a avaliação da qualidade das águas como os testes ecotoxicológicos se tornaram bastante comuns. Em 1975, surgiu a primeira iniciativa em termos metodológicos, para testes de toxicidade aguda em peixes, desenvolvidos pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *Internacional Organization for Standardization* (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A partir desse momento, foram

desenvolvidos e adaptados vários métodos de coleta, preservação e preparo de amostras de ensaios (ABNT, 2015) bem como, para testes de toxicidade aguda e crônica, utilizando alguns grupos e espécies de organismos-teste, dentre os quais se destacam os microcrustáceos (ABNT, 2016, 2017), algas (ABNT, 2018), e peixes (ABNT, 1993, 2016b, 2016c) de águas doces e marinhas e testes com sedimentos (ABNT, 2004).

### **4.3.2 Testes Ecotoxicológicos**

Os testes ecotoxicológicos são em sua maioria, ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias (naturais ou sintéticas), efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, os organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (NEWMAN, 2010; WALKER et al., 2012).

Os ensaios de toxicidade são ferramentas importantes para medir a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que as análises físicas e químicas comumente realizadas, como: a demanda química de oxigênio (DQO), a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos suspensos, concentrações de metais e de outras substâncias, cujos limites encontram-se estabelecidos nas legislações ambientais, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente e, assim, são insuficientes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes. Apesar disso, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Sendo assim, as análises químicas e os testes ecotoxicológicos se complementam (COSTA et al., 2008a; SANTOS et al., 2018; WALKER et al., 2012).

Os testes de toxicidade, assim como qualquer outro método de análise, podem apresentar variabilidade nos resultados obtidos. Essa variabilidade dentro do teste ecotoxicológico pode estar atribuída, a possíveis variações das condições abióticas mantidas durante o período de ensaio, como: qualidade da água de diluição, temperatura, oxigênio dissolvido, pH, aeração, entre outras; pode ainda estar associada as variações bióticas desses organismo, tais como: condições de cultivo e alimento, sexo, origem,

estabilidade genética, equilíbrio hormonal, idade dos organismos, entre outros fatores que podem contribuir para a dispersão dos resultados dos testes (USEPA, 2002a, 2002b; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Para avaliar a “saúde” dos organismos-teste e as condições dos ensaios, alguns critérios vem sendo utilizados, como a taxa de sobrevivência e reprodução, presença de formas resistentes (cistos) nas culturas e uso de substância de referência para a avaliação da sensibilidade do lote dos organismos-teste utilizados (NEWMAN, 2010; SANTOS et al., 2018; USEPA, 2002b, 2002a; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

As substâncias de referência são utilizadas para avaliar a “saúde” e/ou sensibilidade dos organismos cultivados em laboratórios e de “campo”. Essas substâncias também são utilizadas para definir as condições essenciais dos ensaios para cada organismo-teste, podendo ser espécies aquáticas ou terrestres. Uma vez estabelecidas essas condições ótimas de ensaio, os resultados tornam-se comparáveis, ou seja, apresentam “boa” repetibilidade e reprodutibilidade (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; NEWMAN, 2010; SANTOS et al., 2018; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

#### **4.3.2.1 Testes Ecotoxicológicos em Ambientes Aquáticos**

Os bioensaios são muito utilizados em ambientes aquáticos por serem estes um dos principais ecossistemas receptores de contaminantes, seja por lançamento direto nos corpos d’água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou até mesmo depositados nos solos.

Para o desenvolvimento e realização dos testes ecotoxicológicos em ambientes aquáticos são necessários a utilização de organismos aquáticos indicadores, que devido a sua característica de pouca tolerância ecológica à determinadas substâncias químicas, podem apresentar alterações, sejam fisiológicas, morfológicas ou comportamentais, quando expostos a esses poluentes. As exposições são feitas em determinados períodos de tempo, podendo ser em amostras de efluentes, com diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, ou até mesmo em água bruta. O contato com agentes tóxicos pode ser analisado com teste de toxicidade aguda, que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos-teste expostos aos agentes tóxicos, em curto período de tempo, geralmente medidos em 96 horas, ou com teste de toxicidade crônica, quando o

agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações subletais, ocorrendo isso pela diluição dos poluentes.

Essa exposição dos organismos-teste aos contaminantes, em níveis subletais, pode não induzir a morte dos mesmos, mas pode causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo. Basicamente, os testes de toxicidade crônica são analisados sob todo o ciclo de vida do organismo-teste, ou pelo menos a uma parte desse ciclo, no qual utilizam-se os estágios mais sensíveis ou críticos; ou ainda testes funcionais, que avaliam as alterações das funções fisiológicas dos organismos em contato com contaminantes e, sendo assim, o tempo de ensaio de toxicidade crônica varia de organismo para organismo (BIRGE; BLACK; WESTERMAN, 1985; NEWMAN, 2010; RAND, 1995; SCHVARTSMAN, 1991; VAN LEEUWEN, 2007).

Há diferenciações específicas para cada organismo-teste utilizado nos ensaios de toxicidade, contudo, as condições ambientais exigidas se assemelham para a realização dos testes, como: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, fotoperíodo, dureza da água e tempo de exposição do organismo. Nesses ensaios os organismos-teste (peixes, oligoquetos, crustáceos, insetos, dentre outros) são expostos a várias concentrações da solução-teste, contidas em frascos-teste (béqueres, tubos de ensaio), por um período de tempo determinado. E para a validação da viabilidade do lote dos organismos expostos a solução-teste, faz-se necessária utilização da solução-controle, a qual contém água de diluição (reconstituída ou deionizada), para todos os ensaios ecotoxicológicos. Após o término do ensaio, ou seja, a finalização do tempo de exposição do organismo-teste ao agente tóxico, verificam-se os efeitos desse contaminante sobre alguns parâmetros biológicos, como: mortalidade, crescimento, reprodução, entre outros. Esses efeitos observados são analisados estatisticamente e os resultados são expressos em unidades numéricas, tais como:  $CL_{50}$ ,  $CE_{50}$  e CENO (NEWMAN, 2010; WALKER et al., 2012; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Nos testes de toxicidade aguda, o principal efeito observado é a letalidade ou estado de imobilidade. Esses ensaios têm por objetivo determinar a Concentração Letal Média ( $CL_{50}$ ) ou a Concentração Efetiva Média ( $CE_{50}$ ), ou seja, a concentração do contaminante que causa mortalidade ou imobilidade a 50% dos organismos-teste, depois de um determinado tempo de exposição (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; RAND, 1995; RICHARDI et al., 2018; SOUZA et al., 2018). Por outro lado, os ensaios de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes sob condições de

exposições prolongadas (concentrações subletais), sendo assim, essas concentrações permitem a sobrevivência dos organismos-teste, contudo, afetam suas funções biológicas. Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como Concentração de Efeito Não Observado (CENO) ou Concentração de Efeito Observado (CEO), mas também podem ser expressos como  $CL_{50}$  (COSTA et al., 2008b; NEWMAN, 2010; RAND, 1995; SOUZA et al., 2018; WOODBURN et al., 2018).

Os efeitos biológicos e o comportamento dos surfactantes no ambiente devem ser estudados e compreendidos para avaliar seu risco ambiental. Warne e Schifko (1999) verificaram que os surfactantes contribuem para a toxicidade dos organismos aquáticos.

Segundo HERA (2013), podem ser encontrados diferentes homólogos e isômeros do LAS em ambiente aquático, sendo que em cada um desses componentes há grau diferente de toxicidade devido ao comprimento de cadeia carbônica, pois, quanto menor o número de carbonos, menos tóxico é para os organismos aquáticos. Na Tabela 2 são comparadas as toxicidades em dois organismos aquáticos de diferentes funções tróficas, uma espécie de microcrustáceo e uma espécie de peixe, para diferentes homólogos de LAS.

Tabela 2 – Toxicidade média aquática medida em  $mg.L^{-1}$  para diferentes homólogos de LAS

Cadeia Alquilada	Microcrustáceo ( <i>Daphnia magna</i> )		Peixe ( <i>Pimephales promelas</i> )	
	CE <sub>50</sub>	CENO	CE <sub>50</sub>	CENO
C <sub>10</sub>	16,7	9,80	39,60	14,00
C <sub>11</sub>	9,20	-	19,80	6,40
C <sub>12</sub>	4,80	0,58	3,20	0,67
C <sub>13</sub>	2,35	0,57	1,04	0,10
C <sub>14</sub>	1,50	0,10	0,50	0,05

Fonte: Adaptado de Hera (2013).

Estudos sobre a toxicidade aguda representada em CE<sub>50</sub> de LAS para o organismo *Daphnia magna* são amplamente diversos, variando de 0,26 a 55  $mg.L^{-1}$  (OECD SIDS, 2005). Van de Plassche et al. (1999) calcularam a média geométrica dos testes de toxicidade

aguda encontrados na literatura, representados por  $CE_{50}$  para LAS com homólogos de  $C_{11.6}$  e encontram valor de  $8,4 \text{ mg.L}^{-1}$ . Verge et al. (2001) encontraram valores similares ( $8,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para LAS  $C_{12}$  em 48 horas de exposição.

Neste sentido, a avaliação de diferentes *endpoints* pode trazer informações mais precisas e novas sobre a toxicidade do LAS, uma vez que a  $CE_{50}$  tem apresentado valores divergentes entre os trabalhos publicados.

Muitos autores recomendam o uso de mais de uma espécie representante da biota aquática para a avaliação do efeito tóxico de uma amostra, e de preferência que essas espécies sejam pertencentes a diferentes funções tróficas da cadeia alimentar. Sendo assim, é recomendável avaliar o efeito de uma substância ou efluente para mais de uma espécie da biota aquática para que, por meio do resultado obtido com o organismo mais sensível, seja possível estimar com mais segurança o impacto do contaminante no corpo d'água receptor (COSTA et al., 2008b; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008; NEWMAN, 2010; RAND, 1995; WALKER et al., 2012; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

### 4.3.3 Organismos-teste

Uma das principais características na escolha do procedimento dos testes ecotoxicológicos, é a seleção das espécies que serão utilizadas como indicadoras dos efeitos tóxicos. Esta seleção deve ser realizada observando-se alguns fatores de suma importância, tais como a possibilidade de manutenção desses organismos-teste em laboratório, possuir ciclo de vida de curta duração e sensibilidade previsível do organismo-teste a agentes químicos, com constância relativa que permita a obtenção de resultados precisos, garantindo, assim, boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006; VAN LEEUWEN, 2007).

Para Rand (1995) a seleção das espécies a serem utilizadas em testes de toxicidade devem seguir as seguintes premissas: os organismos devem ter significativa representação ecológica e econômica dentro das biocenoses, abundância e disponibilidade, bem como a importância comercial ou na cadeia alimentar; apresentar estabilidade genética e uniformidade de suas populações; ter baixo índice de sazonalidade; ter sensibilidade constante e apurada, e ainda, esses organismos-teste devem ser de fácil cultivo em

laboratório, e para melhor representatividade dos ecossistemas, se possível, a espécie deve ser nativa.

Elder (1989) acrescenta que, além dos organismos-teste responderem à variedade de contaminantes em concentrações naturalmente encontradas no ambiente, essas espécies devem ser representativas, ou seja, as respostas ao contaminante devem corresponder às respostas esperadas a uma comunidade, sugere ainda que, os procedimentos experimentais devem ser simples e rápidos, como também promover a reprodutibilidade dos resultados.

A utilização de no mínimo três espécies que representem diferentes funções tróficas da cadeia alimentar é recomendada para se obter resultados mais precisos de efeitos tóxicos específicos e aumentar a probabilidade de respostas tóxicas a organismos-teste de diferentes sensibilidades, pois dificilmente uma única espécie de organismo-teste representará integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema (BAUN et al., 1999; BERTOLETTI, 2013; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; RIBO, 1997).

Diversas espécies de organismos aquáticos vêm sendo utilizadas internacionalmente em testes ecotoxicológicos, possibilitando subsídio para melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos em diversos contaminantes e corpos receptores. Dentre os principais grupos de organismos, utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, microcrustáceos, oligoquetos, peixes, bactérias e insetos (ARENZON; PEREIRA NETO; GERBER, 2011). Representando os mais diversos ecossistemas e funções tróficas (Tabela 3), em termos gerais, os diferentes níveis de transferência de energia dentro da biota aquática.

Tabela 3 – Diferentes níveis de transferência de energia

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

Fonte: Adaptado de Zagatto e Bertolleti (2006)

Em geral, os cladóceros da família Daphnidae são os organismos-teste preferencialmente utilizados em ensaios toxicológicos devido à sua representatividade na comunidade zooplancônica, à facilidade de cultivo, ao seu tamanho: pequeno porte, e por terem ciclo de vida relativamente curto (RAND, 1995). Os cladóceros multialmente mais utilizados em testes de toxicidade aquática são *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia* (MAUL; FARRIS; LYDY, 2006; RENO et al., 2018; SÁNCHEZ-ORTÍZ; SARMA; NANDINI, 2010; SANTOS et al., 2018; SARMA; NANDINI, 2006; SUCAHYO et al., 2008). A utilização dessas espécies em testes ecotoxicológicos é justificada pela sua alta sensibilidade a diferentes agentes tóxicos (LIU; WANG, 2015; NADDY; COHEN; STUBBLEFIELD, 2015; RENO et al., 2018; SARMA; NANDINI, 2006).

Estudos desenvolvidos acerca da qualidade da água frequentemente utilizam espécies exóticas como organismos-teste por falta de protocolos de ensaios ecotoxicológicos que recomendem a utilização de espécies nativas. O emprego de espécies exóticas de regiões temperadas é um fator limitante para avaliar a toxicidade de contaminantes e monitorar a saúde ambiental de ecossistemas tropicais, uma vez que não são adaptados aos ecossistemas locais e podem se tornar espécies invasoras (FREITAS; ROCHA, 2011; MARTINS; BIANCHINI, 2011; SILVA et al., 2016), sendo assim, o uso de espécies nativas deve ser incentivado em estudos ecotoxicológicos (SILVA et al., 2016).

Os macroinvertebrados das famílias Chironomidae e Oligochaeta têm sido amplamente utilizados em testes de toxicidade, por serem organismos representativos na

comunidade bentônica e por serem considerados bons indicadores de qualidade da água (AMORIM; CASTILLO, 2009; CESAR; HENRY, 2017; FONSECA; ROCHA, 2004a). Sendo assim, a avaliação dos efeitos tóxicos para as espécies nativas *Chironomus sancticaroli* e *Allonais inaequalis*, é de suma importância devido à sua ampla ocorrência e grande representatividade entre os organismos aquáticos (CORBI et al., 2006; DORNFELD et al., 2006; FONSECA; ROCHA, 2004a; PIMENTA et al., 2016; TRIVINHO-STRIXINO, 2011; TRIVINHO-STRIXINO; CORREIA; SONODA, 2000; TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 2005).

A seguir, são descritos os organismos-teste: *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* e *Daphnia magna*, utilizados nesta pesquisa, pela elevada representatividade na biota aquática, por apresentarem diferentes funções tróficas na cadeia alimentar, serem de fácil cultivo em laboratório e por terem “curto” ciclo de vida.

#### **4.3.3.1 *Chironomus sancticaroli*, Strixino e Strixino, 1981**

Os quironomídeos pertencentes à classe Insecta, ordem Díptera de subordem Nematocera, ocorrentes em todas as regiões zoogeográficas do mundo, são considerados, dentro do grupo dos insetos, os mais abundantes e mais bem adaptados, e amplamente distribuídos em corpos d'água, tendo seus hábitos relacionados ao sedimento em que estão inseridos (RICHARDI et al., 2015; ROQUE et al., 2004; TRIVINHO-STRIXINO, 2011). Dessa forma, esses organismos são geralmente utilizados em testes ecotoxicológicos devido à sua resistência às alterações de qualidade da água e de sedimento, possibilitando maior tempo de exposição desses organismos a contaminantes e tornando-os portanto, potenciais bioindicadores em exposições prolongadas e indicativos de respostas crônicas (BONANI, 2010; DE BISTHOVEN et al., 1998; REBECHI; NAVARRO-SILVA, 2012).

A família Chironomidae é composta por 11 subfamílias, sendo que cinco delas (Chironominae, Orthoclaadiinae, Podonominae, Tanypodinae e Telmatogetoninae) têm histórico de ocorrência no Brasil (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Os organismos desta família possuem grande capacidade de adaptação aos diferentes ambientes da Terra, até mesmo em locais considerados inóspitos para a maioria dos insetos, como águas salobras e marinhas, geleiras polares e nascentes termais

(ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995; JONUSAITE; KELLY; DONINI, 2011; ROBERT MICHAUD et al., 2008).

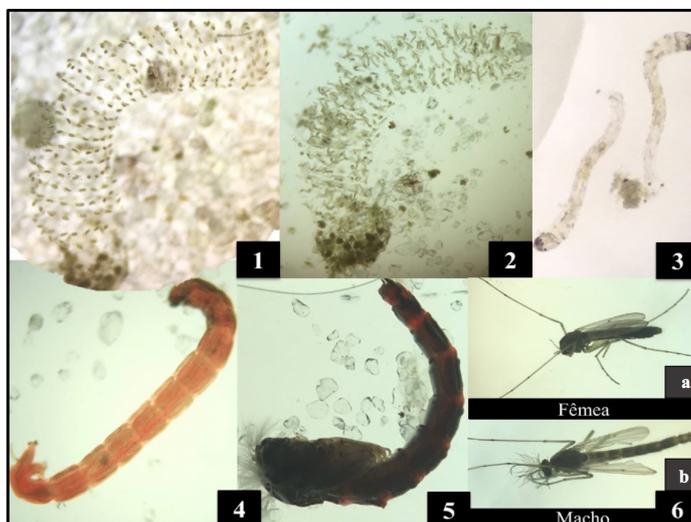
Segundo Corbi e Trivinho-Strixino (2006) os macroinvertebrados aquáticos pertencentes à família Chironomidae, em áreas de mata ciliar, apresentaram maiores diversidade e riqueza e menor dominância se comparada a regiões próximas ao emissário de estações de tratamento de esgotos, demonstrando ser bons indicadores de impacto ambiental.

Os macroinvertebrados do gênero *Chironomus* representa uma porção significativa da biodiversidade bentônica, desempenhando um importante papel na cadeia alimentar e na ciclagem de resíduos encontrados no sedimento pelo processo de bioturbação, além de serem facilmente cultivados em laboratório, o que facilita a utilização dos mesmos em testes de toxicidade (ÁLVAREZ-MANZANEDA et al., 2017; AQUILINO; SÁNCHEZ-ARGÜELLO; MARTÍNEZ-GUITARTE, 2018; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008, 2017; GIESY; HOKE, 1989; OECD, 2011b; TRIVINHO-STRIXINO; CORREIA; SONODA, 2000; USEPA, 2000).

Os autores Spies e Reiss (1996) descrevem a espécie *Chironomus xanthus*, Rempel (1931) como sinônimo sênior de *Chironomus sancticaroli*, Strixino e Strixino (1981). No entanto, Trivinho-Strixino (2011) ressalta que há uma ausência de comparação detalhada entre a espécie *Chironomus xanthus* com seu, até então, considerado sinônimo júnior, *Chironomus sancticaroli*, o que torna inválida a sinonímia sugerida pelos autores, mantendo-se a denominação da espécie como *C. sancticaroli*.

Sendo assim, a espécie *Chironomus sancticaroli*, descrita por Strixino e Strixino, em 1981, a partir de exemplares encontrados na cidade de São Carlos-SP, compõem-se de insetos holometábolos, que possuem ciclo de vida completo com ovo, larva (I até IV instares), pupa e adulto (Figura 2). As três primeiras fases do ciclo de vida são aquáticas, iniciando com a fase de ovo após a ovoposição pela fêmea, próxima à vegetação (ou próxima às bordas dos recipientes de cultivo quando mantidos em laboratório); seguindo-se ao estágio larval que ocorrem no sedimento e na água, constituído de quatro instares, após, passa-se para a fase pupa, e por último, ao estágio terrestre, no qual o organismo encontra-se na forma alada (adultos do inseto) (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Figura 2 – Ciclo de vida do organismo *C. sancticaroli* - 1) Desova; 2) Eclosão das larvas; 3) Larvas de I instar; 4) Larvas IV instar; 5) Pupa; 6) Insetos Adultos a) Fêmea e b) Macho



Fonte: Adaptado de Geromel-Costa (2018)

As fêmeas dessa espécie têm capacidade de ovopositar em torno de 500-600 ovos, que ficam em invólucros de uma massa gelatinosa, rica em nutrientes que serão utilizados como alimento pelas larvulas recém-eclodidas (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995). A massa gelatinosa, ao entrar em contato com a água se expande, adquirindo formato tubular recurvado, com uma extremidade livre e outra fixa na vegetação (ou em caso de cultivo em laboratório, fixa-se na parede do recipiente) por um pedúnculo estreito também gelatinoso (FONSECA; ROCHA, 2004a; OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

O maior gasto energético do ciclo de vida dessa espécie ocorre no estágio larval, (OLIVER, 1971), no qual desde o período de crescimento embrionário até o momento da eclosão das larvulas, há demanda de tempo aproximado de 48 horas, e a partir dessa etapa, as larvas de I instar, dispersas na coluna d'água, alimentam-se de bactérias presentes no sedimento. No estágio de II instar, as larvas iniciam a construção dos casulos, em formato de tubos, por meio da adição de pequenas partículas do substrato, unidas por fios de seda, secretados pelas glândulas salivares (FONSECA; ROCHA, 2004a). A movimentação das larvas dentro dos casulos, por meio de ondulações anteroposteriores, fazem com que o material líquido, contendo partículas de alimento do meio, fique aprisionado e sirva-lhes de alimento (OLIVER, 1971). Essas ondulações corporais também auxiliam no

reabastecimento de oxigênio e na eliminação de metabólitos, por meio da movimentação do fluxo de água para fora do casulo (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995). Conforme a larva se desenvolve, a construção do seu casulo vai sendo adaptada ao seu comprimento. Quando a larva de IV instar passa o estágio de pupa, seu casulo está mais resistente e com coloração castanho-escuro. Quando ocorre a maturação dessa fase, em poucos segundos há o rompimento do casulo, e o organismo eleva-se à superfície para a emergência do adulto (FONSECA; ROCHA, 2004a).

Na fase adulta, o gasto energético é menor, pois os insetos adultos são terrestres, não se alimentam, e possuem tempo de vida efêmero, de aproximadamente quatro dias, demandando abrigo apenas para o acasalamento, maturação dos ovos e ovoposição (OLIVER, 1971). Após a emergência de adultos, é possível distinguir machos e fêmeas, sendo que machos apresentam tamanho médio de 5,6 mm, coloração amarelo-esverdeada, tendendo ao castanho, abdômen afinado e antenas plumosas. As fêmeas possuem tamanho médio de 5,38 mm e coloração um pouco mais acastanhada, abdômen mais espesso e antenas “lisas” (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Alguns fatores ambientais são determinantes para o desenvolvimento desses organismos, como: a temperatura, disponibilidade de alimento e fotoperíodo; sendo esse último fator importante para induzir a inibição da emergência de adultos, quando a luminosidade for inferior a 12 horas, a restrição de alimentos leva a uma metamorfose tardia dos mesmos (DANKS, 1978; MACKEY, 1977). Por outro lado, a temperatura é um dos fatores que influenciam nas funções bioquímicas, físicas e mecânicas, como por exemplo, o aumento da temperatura leva ao desenvolvimento mais acelerado da espécie (REYNOLDS; BENKE, 2005; STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985). No entanto, em temperaturas acima de 30°C, há aumento da mortalidade das larvas (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Canteiro e Albertoni (2011), afirmam, que em temperaturas mais elevadas, tanto o desenvolvimento embrionário dos organismos quanto o crescimento larval podem ser favorecidos, sendo assim, infere-se que uma fêmea provida de maior tamanho larval pode produzir mais ovos do que a de menor tamanho. No entanto, Strixino e Trivinho-Strixino (1985) consolidam que, o aumento da temperatura fomenta a aceleração dos processos fisiológicos e das reações químicas dos organismos, tendo por consequência adultos menores.

Por consequente, as temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento dessa espécie são entre 18-31°C, mesmo apresentando maiores sobrevivências entre 22-26°C (STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985). Na faixa de temperatura de 19-26°C, de acordo com Trivinho-Strixino (1980), após 14 dias da eclosão dos ovos inicia-se a emergência de adultos, que se prolonga por 13-14 dias, entretanto estes períodos podem variar conforme alterações na temperatura. Essa mesma autora descreve ainda que, a fecundidade das fêmeas adultas de *C. sancticaroli* também pode oscilar por influência da temperatura ambiental, quando o tempo necessário para o amadurecimento do ovócito é de aproximadamente 33 horas após a emergência do adulto, entre 22 e 25° C e 72 horas entre 15 e 18°C, o que pode ocasionar interferência no número de ovos produzidos e no número de ovos férteis, resultando em uma variação significativa na quantidade de larvas que serão disponibilizadas para uso em ensaios ou mesmo em novos cultivos.

As taxas de mortalidade e natalidade desses organismos, sofrem variações conforme a modificação ambiental. A taxa de natalidade está intimamente relacionada à fecundidade e à sobrevivência, pois é por meio delas que determina-se o potencial reprodutivo da população (TRIVINHO-STRIXINO, 1980). De acordo com Allee et al. (1949) a fecundidade é a taxa com a qual um organismo produz unidades reprodutoras (óvulos ou espermatozoides). Trivinho-Strixino (1980) deriva a fecundidade em três classificações:

- Fecundidade Inerente: número máximo de ovos que seriam produzidos pela fêmea se não houvesse modificação ambiental;

- Fecundidade Potencial: número de óvulos maduros da primeira desova presentes nos ovários das fêmeas;

- Fecundidade Realizada: número de ovos efetivamente ovipostos pelas fêmeas do inseto.

Para se quantificar a fecundidade no inseto *C. sancticaroli* podem ser utilizados métodos de estimativa diretos, como por exemplo, dissecação de fêmeas grávidas ou ainda métodos de estimativa indiretos por meio da relação entre tamanho das asas das fêmeas e fecundidade, a qual é estabelecida após análise de regressão (TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Dada a importância ecológica dos Chironomidae na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, eles são frequentemente utilizados como bioindicadores em estudos de monitoramento da qualidade das águas (CORTELEZZI et al., 2011). Sendo assim, as alterações morfológicas podem ser usadas para averiguar os impactos ambientais dos contaminantes (DI VEROLI et al., 2010; KWAK; LEE, 2005; PARK et al., 2010).

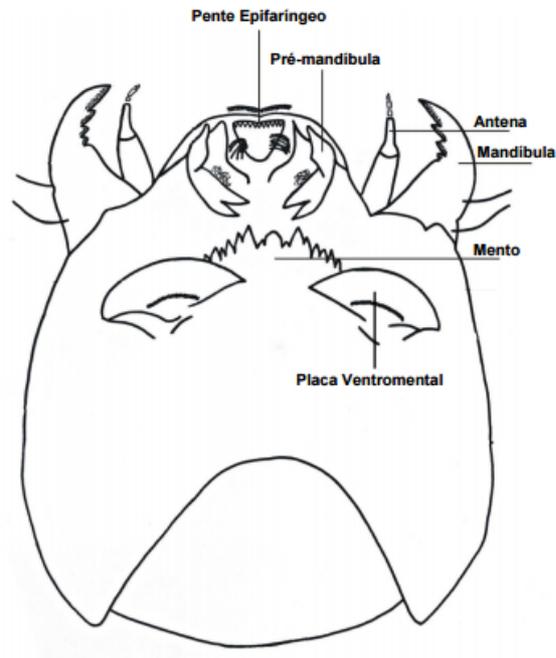
O estudo da composição taxonômica de larvas de Chironomidae e o percentual de ocorrência de deformidades encontradas em peças do aparelho bucal, principalmente no mento, são utilizados em programas de biomonitoramento para obter informações a respeito do nível de poluição orgânica e química em ecossistemas aquáticos (DE SOUZA BEGHELLI et al., 2018; MORAIS et al., 2010).

As cápsulas cefálicas das larvas de *C. sancticaroli* são compostas principalmente de quitina, material biológico de alta resistência onde estão inseridas, dentre outras, estruturas sensoriais e peças bucais como: antena, mandíbula, pré-mandíbula, pente epifaríngeo e mento (REBECHI; NAVARRO-SILVA, 2012).

A indução de deformidade está relacionada aos estágios mais sensíveis do ciclo de vida de quironomídeos, ou seja, a fase larval (NHRIEC, 1990). Nessa fase, observa-se que o comportamento alimentar de larvas do inseto *C. sancticaroli*, com a ingestão de sedimentos contaminados, contribui para o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de deformidades no mento (HUDSON; CIBOROWSKI, 1996).

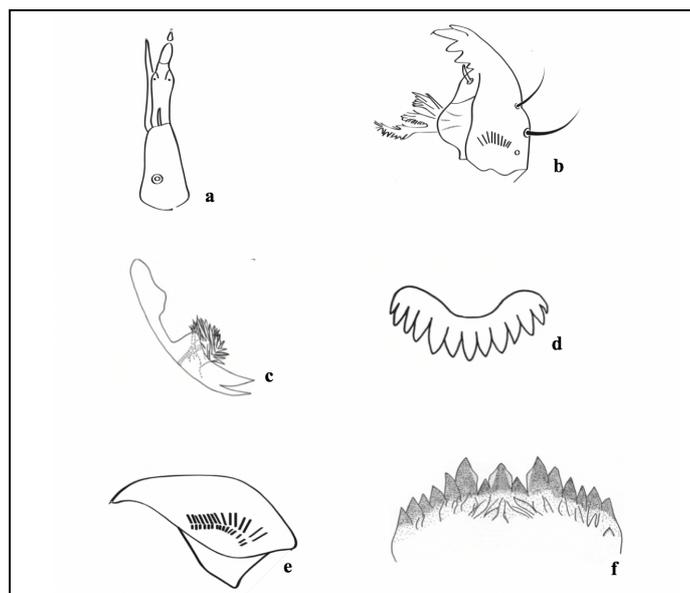
A determinação da faixa etária da população é importante para a realização de avaliações ecológicas, taxonômicas e ambientais. As medidas morfométricas de cápsula cefálica, especialmente o comprimento e largura, são amplamente utilizadas na identificação dos instares dos insetos (Figura 3), de modo que a duração de cada fase leva em conta as medidas de todas as estruturas diariamente (Figura 4). No estudo de Richardi et. al (2013) avaliou-se o desenvolvimento de *C. sancticaroli*, no qual foi semelhante para os primeiro instar: do primeiro para o terceiro dia; segundo instar: do quarto ao quinto dia; terceiro instar: do quinto ao oitavo dia; e quarto instar: do sexto para o dia 19, em condições laboratoriais.

Figura 3 – Cápsula cefálica de *C. sancticaroli* na posição ventral, evidenciando as seis estruturas selecionadas para análise



Fonte: (REBECHI, 2009)

Figura 4 – Estruturas utilizadas para determinar os instares das larvas de *Chironomus sancticaroli*: a) Antenas, b) Mandíbula, c) Pré-mandíbula, d) Pente epifaríngeo, e) Placas ventromentais, f) Mento.



Fonte: Adaptado de Richardi et al. (2013)

Beghelli et. al (2018) analisaram o efeito de sedimento contaminado por metais nas larvas de *C. sancticaroli* considerando cinco análises biológicas como: alterações das peças bucais, comprimento larval, largura da cápsula cefálica, mortalidade e dano total; e observaram que a mortalidade variou de 60 a 73%, enquanto a incidência de alterações morfológicas variou de 33% nas larvas no controle e 100% nas larvas com sedimento contaminado, e evidenciaram que a alteração morfológica mais comum foi a redução de um ou mais dentes no mento.

#### 4.3.3.2 *Allonais inaequalis*, Stephenson, 1911

Os Oligoquetos são organismos abundantes na fauna aquática continental e podem ser encontrados nos sedimentos e na coluna de água (GORNI; ALVES, 2006). Esses organismos são conhecidos pela sua interação com ambiente onde vivem, pela importância na ciclagem de nutrientes e matéria orgânica, por meio do processo de bioturbação, podendo ainda interagir com os poluentes biodisponíveis tanto na água quanto no substrato. Em sua maioria, a subclasse Oligochaeta é constituída por minhocas terrestres, no entanto, algumas famílias dos grupos Naididae, Tubificidae e Enchytraeidae habitam ambientes aquáticos de água doce (SHUHAIMI-O et al., 2012).

Os organismos pertencentes à família Naididae geralmente se reproduzem de forma assexuada por fissão, usualmente pelo modo de fissão paratômica, na qual ocorre o surgimento de uma nova cabeça e cauda, intercaladas no meio do corpo, dentro da zona de fissão, reproduzindo um indivíduo transitório (BELY; SIKES, 2010; ENVALL; KÄLLERSJÖ; ERSÉUS, 2006). Entretanto, alguns membros dessa família, periodicamente, se reproduzem sexualmente (BELY; WRAY, 2001, 2004). São animais detritívoros, alimentam-se de matéria orgânica sedimentada, outras espécies são carnívoras ou parasitárias, tendo a capacidade de habitar diversos ambientes, entre eles: sedimentos e vegetações aquáticas (BELY; WRAY, 2004).

A espécie *Allonais inaequalis* pertence ao Filo Annelida, Classe Clitellata, Ordem Haplotaxida, Família Naididae, consiste em oligoquetos aquáticos que se reproduzem tipicamente por fissão (BELY; SIKES, 2010), e são considerados como organismos de vida livre, por viverem tanto na coluna d'água quanto no sedimento (ERSÉUS et al., 2017; VERDONSCHOT; SMIES; SEPERS, 1982).

Os organismos da espécie de oligoqueta *A. inaequalis* possuem corpo delgado com bordas segmentadas distintas e contorno irregular, com uma série de constrições. O comprimento varia entre 3-9 mm (37 a 85 segmentos), não apresentam pigmentação, a cabeça e o prostômio são alongados (Figura 5) (NESEMANN; SHARMA; SINHA, 2004), e a região acima do prostômio possui forma arredondada (Figura 5a). As cerdas ou pelos dorsais começam no VI segmento e consistem em até 2 cerdas capilares acompanhadas por 1 e/ou 2 cerdas aciculares. As cerdas agulhas são pectinadas, com dentes laterais irregulares entre 1 a 4 dentes mais finos, intermediários. As cerdas ventrais são bífidas com nó ligeiramente proximal, e podem ocorrer em lotes de 5 a 8 cerdas (CORBI; GORNI; CORREA, 2015).

Figura 5 – Oligochaeta *A. inaequalis*: a) Região do prostômio, b) Vista geral



Fonte: Acervo pessoal

No Brasil, a ocorrência deste táxon foi observada por Alves, Marchese e Escarpinati (2006) nos sedimentos do córrego Pinheirinho, município de Araraquara-SP, e por Gorni e Alves (2006) no reservatório do Ribeirão Anhumas, em Américo Brasiliense-SP e na Lagoa Dourada, em Brotas-SP.

O uso de oligoquetos como organismo-teste em bioensaios de toxicidade tem sido frequentemente recomendado, uma vez que são espécies facilmente encontradas nos

ecossistemas aquáticos, de fácil cultivo em condições de laboratório, e podem ser expostos a substâncias tóxicas, tanto por meio da alimentação quanto pelo contato corporal ao sedimento ou a água (CHAPMAN, 2001; CORBI; GORNI; CORREA, 2015; EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013; SMITH; KENNEDY; DICKSON, 1991). Entretanto, ainda há poucos registros na literatura de teste ecotoxicológicos com a espécie *A. inaequalis*. Corbi et al. (2015) sugeriram o uso dessa espécie em ensaios de toxicidade, e ainda realizaram testes de toxicidade aguda de 96 horas de exposição ao  $ZnCl_2$ , no qual obtiveram  $CL_{50}$   $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$ . Rocha et al. (2018b) realizaram testes de toxicidade aguda com pesticidas (Carbofuran e Furadan) resultando mortalidade de 50% dos *A. inaequalis* nas concentrações 1,38 e 20,28  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Já Gazonato Neto et al. (2018) analisaram a sensibilidade dessa espécie aos metais, Cd e Hg, obtendo  $CL_{50-96h}$  de 627  $\mu\text{g.L}^{-1}$   $CdCl_2$  e  $CL_{50-96h}$  de 129  $\mu\text{g.L}^{-1}$   $HgCl_2$ .

#### 4.3.3.3 *Daphnia magna*, Straus, 1820

Os cladóceros do gênero *Daphnia*, também conhecidos popularmente como “pulgas d’água” são de ampla distribuição geográfica, e são encontradas em diversos tipos de habitats de água doce. Embora esses organismos prefiram temperaturas entre 18 e 22°C, podem tolerar faixas de temperatura com maior amplitude (EBERT, 2005; VANOVERBEKE; DE GELAS; DE MEESTER, 2007).

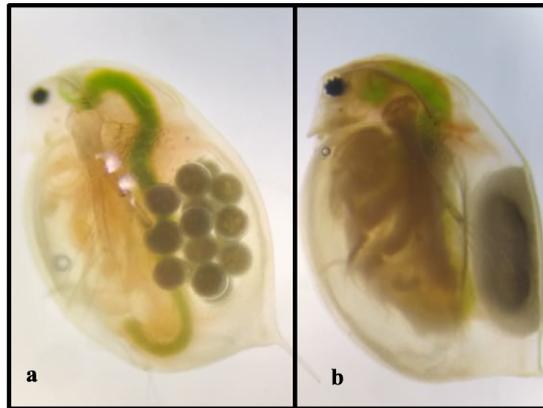
Estes microcrustáceos se alimentam de algas, bactérias e outras pequenas partículas em suspensão por meio de filtração (RUPPERT; BARNES, 1996; STOLLEWERK, 2010) e possuem o corpo coberto por uma carapaça única, em grande parte feita de quitina (polissacarídeo), que termina posteriormente em um espinho apical (não são todas as espécies que apresentam esse espinho), bem como um conjunto de antenas longas duplamente ramificadas e quatro a seis apêndices torácicos que são mantidos dentro da carapaça e ajudam a produzir corrente de água, transportando comida e oxigênio para a boca e superfícies respiratórias nas patas. Esse organismos possuem também o pós-abdômen portando garras e espinhos, que se movem para frente e ventralmente, servindo para limpar partículas presas às setulas das patas natatórias, e ainda mantêm os ovos e embriões retidos dentro da câmara (RUPPERT; BARNES, 1996).

Os cladóceros são ecologicamente importantes, pois além de serem consumidores primários e se alimentarem de matéria orgânica aderida às partículas de sedimentos, algas e bactérias (convertendo-as em proteína animal), estão diretamente expostos a compostos tóxicos por contato corporal e através da ingestão de alimentos contaminados (FONSECA; ROCHA, 2004b), e ainda são extremamente importantes na cadeia alimentar por serem fontes de alimento para outros organismos, como outros invertebrados e peixes (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2012; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Esses organismos podem se reproduzir tanto de maneira assexuada, por partenogênese, quanto por reprodução sexuada (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2012; TOYOTA et al., 2015). A reprodução por meio de partenogênese é a predominante, ocorrendo geralmente em períodos em que as condições ambientais são favoráveis. Na reprodução assexuada, as fêmeas produzem mitoticamente ovos diplóides que passam dos ovidutos a uma câmara de incubação localizada ao longo da superfície dorsal do tronco posterior, desenvolvendo seus clones exatos (Figura 6a) (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2012). Os ovos se desenvolvem dentro dessa câmara, originando exclusivamente fêmeas, e são liberados para a água após seu completo desenvolvimento (STOLLEWERK, 2010).

Em condições ambientais adversas (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2012), com pouca disponibilidade de alimentos, mudanças de temperatura e aumento da densidade populacional, esses microcrustáceos reproduzem-se de forma sexuada. Durante a reprodução sexual, as fêmeas produzem ovos haplóides que são fertilizados por machos, dando origem a um ovo de resistência (efípio) que é rico em nutrientes e revestido por um espesso envoltório de coloração opaca e escura (Figura 6b). Esse efípio permanece em estado de dormência até as condições ambientais se tornarem favoráveis para seu desenvolvimento (STOLLEWERK, 2010). Estes mesmos fatores de estresse ambiental podem estar associados com o aparecimento dos machos, que diferem das fêmeas pelo menor tamanho corporal, maior comprimento da primeira antena e ausência de processo abdominal (Figura 7) (OLMSTEAD; LEBLANC, 2000).

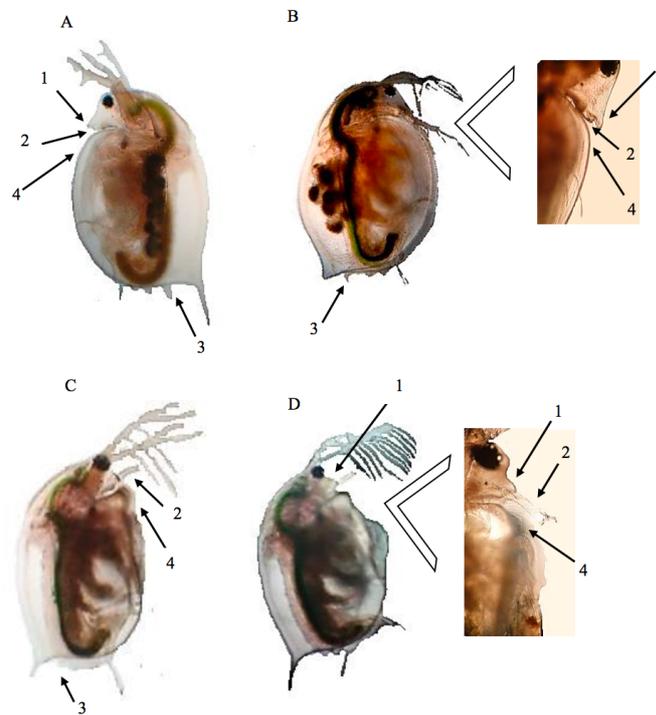
Figura 6 – *Daphnia magna*; a) Reprodução por partenogênese; b) Ovo efípio produzido a partir da reprodução sexuada



Fonte: Acervo pessoal

Na Figura 7, pode-se observar as principais diferenças entre as fêmeas e os machos da espécie *D. magna*, em destaque para a região cefálica e carapaça abaixo da região cefálica. Nas fêmeas (A e B): (1) presença de rostró alongado na região da cabeça; (2) primeira antena bem pequena; (3) processos abdominais, que são constituídos por expansões na parte posterior do pós-abdômen; e (4) carapaça abaixo da cápsula cefálica com borda suave sem cerdas. No macho (C e D): (1) a porção frontal da região da cabeça é achatada; (2) primeira antena alongada; (3) ausência de processo abdominal; e (4) carapaça abaixo da cápsula cefálica modificada e com cerdas (MIGUEL, 2016).

Figura 7 – As principais diferenças entre a fêmea (A e B) e o macho (C e D) do microcrustáceo *D. magna*.



Fonte: (MIGUEL, 2016)

Ao longo do ciclo de vida, os cladóceros passam por quatro principais estágios: ovo, neonato (recém-liberados da câmara de incubação até completarem 24 horas de idade), após esse período de tempo são denominados juvenis (até o final da pré-primípara). O último instar de juvenil é também chamado de primípara, durante o qual os primeiros ovos atingem seu completo desenvolvimento no ovário. A fase adulta corresponde a primípara (primeira reprodução), que ao sofrer ecdise tem o primeiro lote de ovos liberados na câmara de incubação. O número de instares adultos varia muito entre as diferentes espécies de cladóceros. Cada reprodução no estágio adulto caracteriza-se pelas seguintes etapas: liberação de neonatos, ecdise (imediatamente seguida pelo aumento do tamanho corporal) e a postura de ovos. O número de ninhadas assim como o número de neonatos produzidos, também variam entre as espécies, dependendo principalmente da disponibilidade do alimento e das condições ambientais (RAND, 1995; WANG; LU; CHANG, 2011).

Dentre as diversas espécies de cladóceros utilizadas como organismo-teste em todo o mundo, a mais comumente utilizada, em testes ecotoxicológicos, é *Daphnia magna* (TATARAZAKO; ODA, 2007). A espécie *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo planctônico de água doce, de tamanho relativamente grande, com adultos atingindo comprimentos médios de 5,0 a 6,0 mm, os quais se reproduzem por partenogênese sob condições normais, mas que recorrem à reprodução sexuada sob condições de estresse ambiental, e apresentam elevada fecundidade (HEBERT, 1978). Por ter um tamanho maior, seu manuseio em laboratório é mais fácil do que o de cladóceros de tamanhos menores (KOIVISTO, 1995).

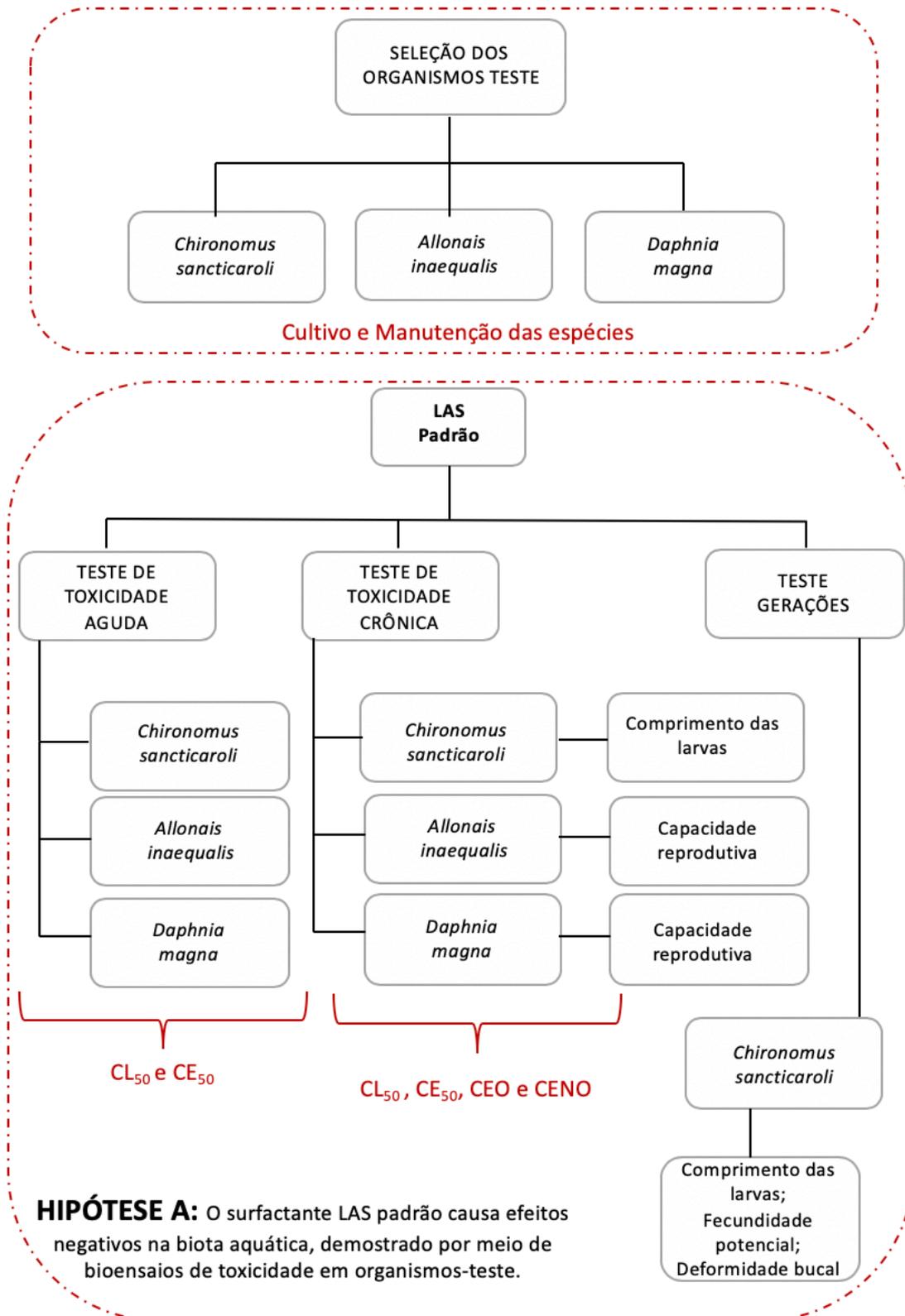
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

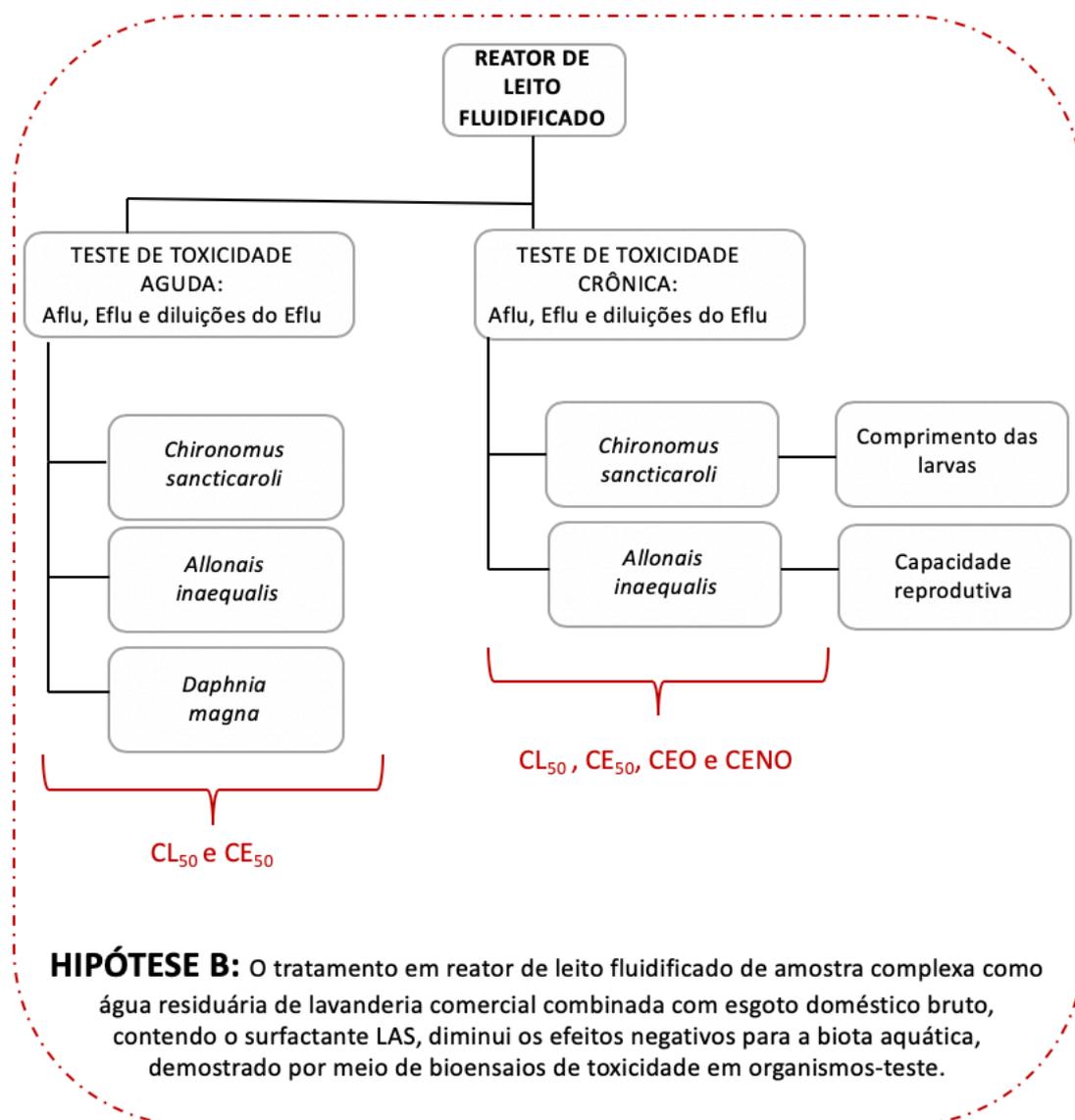
A execução deste projeto foi realizada conforme detalhado nas seções seguintes e a síntese dos procedimentos que foram realizados estão expostos na Figura 8.

Para testar a Hipótese A e avaliar se o surfactante LAS padrão causa efeitos negativos na biota aquática, foram realizados bioensaios de toxicidade aguda, crônica e de gerações com os organismos-teste selecionados.

Ademais, como a água residuária de lavanderia é um efluente extremamente complexo (BRAGA; VARESCHE, 2014), foram realizadas análises ecotoxicológicas aguda e crônica para avaliar a Hipótese B: se o tratamento em reator de leito fluidificado de amostra complexa, como água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico bruto, contendo o surfactante LAS, diminui os efeitos negativos para a biota aquática. Esses bioensaios avaliaram, não somente a toxicidade do LAS, mas também os compostos secundários produzidos nesse reator.

Figura 8 – Fluxograma das etapas experimentais





Fonte: Elaborado pela Autora

Para o desenvolvimento dessa pesquisa no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) foram utilizadas substâncias-teste fornecidas pelo Laboratório de Processos Biológicos (LPB), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP), por meio de uma parceria de pesquisa. As substâncias fornecidas foram: LAS padrão, afluente e efluente do reator de leito fluidificado em escala aumentada, operado pela doutoranda Thais Z. Macedo, sob orientação da professora Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete A. Varesche.

O surfactante utilizado neste trabalho, Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS padrão), com predominância de homólogos C<sub>12</sub> (dodecilbenzeno sulfonado de sódio),

apresentou grau de pureza de 80,7% (Tabela 4). O restante (19,3%) corresponde a sulfato de sódio (15%) e impurezas orgânicas (4,3%) provenientes da fabricação (HOUSE; FARR, 1989). O LAS (marca Sigma-Aldrich® - 25 g) foi armazenado ao abrigo de luz.

Tabela 4 – Características químicas do LAS Padrão

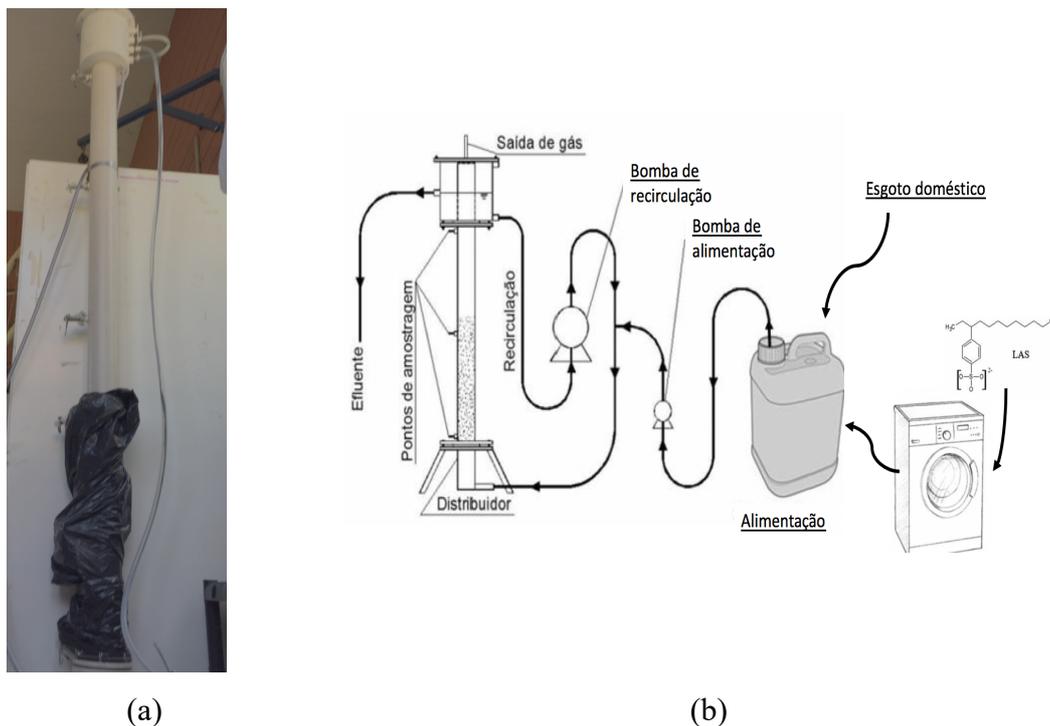
<b>Fórmula empírica</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>Na</b>
<b>Nomenclatura</b>	Alquilbenzeno Linear Sulfonado (dodecilbenzeno sulfonado de sódio)
<b>CAS</b>	25 155-30-0
<b>Porcentagem de LAS no produto comercial (grau de pureza)</b>	80,7%
<b>Peso molecular</b>	348,48 g.mol
<b>pH</b>	7 - 10.5 a 1 g.L a 25 °C

Fonte: (SIGMA - ALDRICH®, 2016)

O reator de leito fluidificado do qual o afluente e o efluente foram amostrados foi confeccionado em acrílico nos tamanhos de 10 cm de diâmetro e volume útil de 19,8 L (Figura 9a) Reator construído em escala aumentada e (Figura 9b) Esquema de um reator de leito fluidificado. O reator de leito fluidificado em escala aumentada, operado pela doutoranda Thais Z. Macedo, teve o objetivo de avaliar a remoção do LAS de água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico. A operação do reator foi dividida em seis fases, conforme observado na Tabela 5 e a avaliação ecotoxicológica foi realizada avaliando cada etapa.

A concentração do LAS foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseado em metodologia desenvolvida e validada por Duarte et al. (2006), com detector de fluorescência, coluna C8 (Supelco), empregando metanol puro e perclorato de sódio (0,075 M) como fase móvel, fluxo de 0.5 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura de 35°C. As amostras foram previamente filtradas em membrana 0,2 µm para boa utilização e conservação do equipamento.

Figura 9 – Reator de leito fluidificado em escala aumentada (a) e esquema de funcionamento do reator (b)



Fonte: a) Acervo pessoal b) Adaptado de Motteran et al. (2018)

Tabela 5 – Fases da operação do reator de leito fluidificado em escala aumentada operado pela doutoranda Thais Z. Macedo

	<b>FASE I</b>	<b>FASE II</b>	<b>FASE III</b>	
Alimentação	Água Residuária de Lavanderia e Esgoto	Água Residuária de Lavanderia, Esgoto Doméstico e Etanol (50mg.L <sup>-1</sup> )	Água Residuária de Lavanderia, Esgoto Doméstico, Etanol (200mg.L <sup>-1</sup> ) e Bicarbonato de Sódio (250mg.L <sup>-1</sup> )	
TDH (h)	21±2,4	18±2,0	21±4,7	
Vasc (cm.s <sup>-1</sup> )*	0,9	0,9	0,9	
LAS afluente	19,8±10,8 mg.L <sup>-1</sup>	23,8±16,8 mg.L <sup>-1</sup>	23,5±11,6 mg.L <sup>-1</sup>	
LAS efluente	9,0±5,0 mg.L <sup>-1</sup>	9,2±5,0 mg.L <sup>-1</sup>	13,3±7,5 mg.L <sup>-1</sup>	
	<b>FASE IV</b>	<b>FASE V</b>	<b>FASE VI</b>	<b>FASE VI<sub>b</sub></b>
Alimentação	Água Residuária de Lavanderia, Esgoto Doméstico, Etanol (200mg.L <sup>-1</sup> ) e Bicarbonato de Sódio (250mg.L <sup>-1</sup> )	Água Residuária de lavanderia, Esgoto Doméstico, Etanol (200mg.L <sup>-1</sup> ) e Bicarbonato de Sódio (300mg.L <sup>-1</sup> )	Água Residuária de Lavanderia, Esgoto Doméstico e Etanol (100mg.L <sup>-1</sup> ) e Bicarbonato de Sódio (300mg.L <sup>-1</sup> )	Água Residuária de Lavanderia, Esgoto Doméstico e Etanol (100mg.L <sup>-1</sup> )
TDH (h)	21±6,7	18±2,6	20±3,0	19±3,0
Vasc (cm.s <sup>-1</sup> )	0,7	0,5	0,7	0,7
LAS afluente	21,9±12,4 mg.L <sup>-1</sup>	23,7±16,8 mg.L <sup>-1</sup>	16,5±1,9mg.L <sup>-1</sup>	6,3±1,3 mg.L <sup>-1</sup>
LAS efluente	11,6±5,1 mg.L <sup>-1</sup>	14,7±6,8 mg.L <sup>-1</sup>	7,7±2,6 mg.L <sup>-1</sup>	2,8±1,2 mg.L <sup>-1</sup>

\*Vasc= Velocidade ascensional

Fonte: Adaptado de Macedo et al. (2018)

## 5.1 Cultivo e Manutenção das Espécies Estudadas

Os cultivos e as manutenções das espécies *C. sancticaroli*, *A. inaequalis* e *D. magna* foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP).

### 5.1.1 Cultivo e manutenção de *Chironomus sancticaroli*

O cultivo e as condições de manutenção de *C. sancticaroli* seguiram metodologia previamente descrita (FONSECA, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004a; STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985). Os primeiros indivíduos de *C. sancticaroli* a serem cultivados no LEAA foram obtidos a partir de amostras de água e sedimento aquático em lagoas de estabilização do matadouro de Frango (BR-Aves) em São Carlos (São Paulo, Brasil).

As culturas de *C. sancticaroli* foram mantidas sob aeração constante em bandejas plásticas (38 cm de comprimento x 33 cm de largura x 6 cm de altura), cobertas por um suporte telado com nylon de (42 cm de comprimento x 36 cm de largura x 38 cm de altura) para evitar a saída dos organismos adultos alados (Figura 10, o cultivo de *C. sancticaroli*). No interior das bandejas, havia 0,6 cm de areia (substrato), água deionizada e alimento, nas seguintes condições: condutividade entre  $35 \pm 10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e dureza entre 12 e  $16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$  e pH entre 6,5 e 7,5 e temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro (NOVELLI et al., 2012; VIVEIROS, 2012).

A alimentação do cultivo, 5 mL de solução de ração para peixes ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de solução de Tetramin®, com validade de 15 dias sob refrigeração), foi realizada a cada 3 dias por meio de pipeta graduada devidamente esterilizada. A composição química do alimento Tetramin® está descrita no Apêndice A.

Figura 10 – Cultivo de *C. sancticaroli*

Fonte: Acervo pessoal

### 5.1.2 Cultivo e manutenção de *Allonais inaequalis*

O cultivo e as condições de manutenção de *A. inaequalis* seguiram a metodologia proposta por Corbi et al., (2015). Os primeiros indivíduos de *A. inaequalis* a serem cultivados no LEAA foram obtidos a partir de amostras de água e sedimento aquático em lagoas no Parque Ecológico Municipal, localizadas em São Carlos (São Paulo, Brasil).

As culturas de *A. inaequalis* foram mantidas em caixas sifonadas de PVC da marca Tigre (diâmetro 25 cm x 17,2 cm de altura) (HIGASHI, 2016), sob aeração lenta (1 bolha de ar por segundo). No interior das caixas, havia 0,6 cm de areia (substrato), água deionizada e alimento, nas seguintes condições: condutividade entre  $20 \pm 2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e dureza entre 12 e 16  $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$  e pH entre 6,5 e 7,5 e temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Pode-se observar na Figura 11 o cultivo de *A. inaequalis*.

O alimento oferecido semanalmente constituiu-se de 10 mL de solução de ração para peixes (2g.L<sup>-1</sup> de Tetramin®, com validade de 15 dias sob refrigeração), esse alimento foi introduzido nas caixas de cultivo por meio de pipeta graduada devidamente esterilizada.

Figura 11 – Cultivo de *A. inaequalis*



Fonte: Acervo pessoal

### 5.1.3 Cultivo e manutenção de *Daphnia magna*

O cultivo e as condições de manutenção de *D. magna* seguiram as recomendações da Agência Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016a). Os primeiros indivíduos de *D. magna* a serem cultivados no LEAA foram introduzidos aclimatados e cultivados pela pesquisadora desse trabalho, obtidos a partir do inóculo cedido pelo Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia Aquática, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos, SP.

As culturas de *D. magna* foram mantidas em béqueres de 2L, com 40 indivíduos em cada béquer e mantidos em incubadora BOD com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro

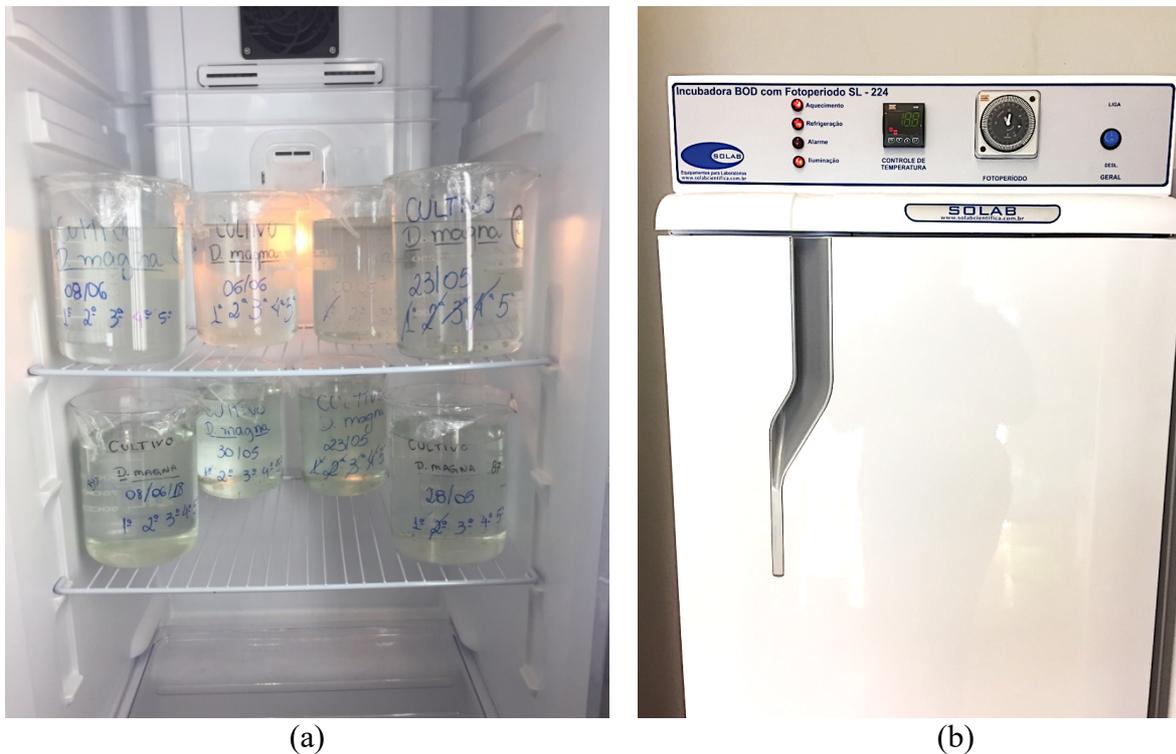
(SOLAB, modelo SL-224), e temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  (Figura 12). Para evitar a evaporação do meio de cultura, os béqueres foram recobertos por um filme de plástico.

Para o preparo da água reconstituída utilizou-se  $73,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $123,3 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$  e  $64,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , dissolvidos em 1 L de água deionizada, conforme as normas da ABNT (2016a, 2017). A água reconstituída, foi utilizada tanto para o cultivo quanto para a preparação das soluções-teste, as quais apresentaram pH entre 7,6 e 8,0 e dureza total entre 175 e 225  $\text{mg.L}^{-1}\text{CaCO}_3$  (MANSANO; DE OLIVEIRA; ROCHA, 2012; MIGUEL, 2016; MOREIRA et al., 2014; ROCHA, 1983).

A manutenção das culturas consistia em troca total ou parcial do meio, com reposição do alimento. Semanalmente eram realizadas três trocas do meio de cultivo, sendo duas trocas totais e uma parcial. Na água de cultivo foram adicionados a vitamina Fishtamin® ou Vitachem Fresh® e o condicionador condicionante de água Blackwater Aquatan® (1 gota para cada 2 L de água reconstituída).

O cultivo de *D. magna* foi alimentado com duas soluções: **1)** suspensão algácea de *Pseudokirchneriella subcapitata*, cultivada em meio Oligo (ABNT, 2018), na concentração de  $3 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  e **2)** aditivo alimentar, constituído da mistura de 50 mL de ração fermentada de peixe ( $5 \text{ g.L}^{-1}$  de Tetramin®, armazenados em proporções de 50 mL no congelador, por até 2 meses), e 50 mL de solução com  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  de fermento biológico), formando um composto alimentar de 100 mL (armazenado em geladeira por 7 dias), após feita essa mistura alimentou-se as *D. magna* na proporção de  $1 \text{ mL.L}^{-1}$  (Informações detalhadas sobre a composição química do alimento Tetramin®, vitaminas Fishtamin® e Vitachem Fresh®, o preparo dos meios, o cultivo da alga e o preparo da suspensão alimentar estão apresentadas nos Apêndices A, B, C e D, respectivamente).

Figura 12 – Cultivo de *D. magna* a) cultivo dentro da BOD b) BOD utilizada para a manutenção do cultivo dessa espécie.



Fonte: Acervo pessoal

## 5.2 Bioensaios de Toxicidade

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos para testar a Hipótese A e assim, avaliar se o surfactante LAS padrão causa efeitos negativos na biota aquática, foi preparada uma solução-estoque de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) padrão, armazenado em frasco âmbar e refrigerado para evitar sua degradação. A partir dessa solução-estoque foram preparadas as soluções-teste, por meio de diluições em água deionizada para as espécies *C. sanctiocaroli* e *A. inaequalis*. Para a espécie *D. magna* foram feitas as diluições em água reconstituída como definido em protocolo.

Os testes de toxicidade realizados para testar a Hipótese B e avaliar se o tratamento em reator de leito fluidificado de água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico bruto, contendo o surfactante LAS, diminui os efeitos negativos na biota aquática, foram realizados acompanhando as seis fases de operação do reator, pelo período de 11 meses (fevereiro 2017 a dezembro 2017). No total foram realizados 50 ensaios

ecotoxicológicos, entre eles, ensaios de toxicidade aguda e crônica, para verificação da mortalidade e impacto no desenvolvimento dos organismos-teste. As soluções-teste foram: afluente, efluente e diluições do efluente em água deionizada e água reconstituída (50, 40, 30, 20 e 0,1%), a critério de verificação da diluição ideal no lançamento desse efluente em corpo d'água. A diluição de 0,1% do efluente foi realizada para efeito de simulação do efluente do reator em confluência com a vazão de um rio de pequeno porte.

Os testes de toxicidade foram realizados em salas climatizadas específicas para cada organismo-teste, como pode ser observado na Figura 13 (a) as prateleiras de testes com fotoperíodo e (b) detalhes dos testes com sistema de aeração, para as espécies *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*. Na Figura 14, pode-se observar a câmara incubadora (BOD) de testes ecotoxicológicos para a espécie *D. magna*.

Figura 13 – Sala climatizada para realização de testes de toxicidade com as espécies *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*



(a)

(b)

Fonte: Acervo pessoal

Figura 14 – Câmara incubadora (BOD) utilizada para realização de testes de toxicidade com a espécie *D. magna* a) vista geral da incubadora (marca Solab) b) testes realizados dentro da BOD



(a)



(b)

Fonte: Acervo pessoal

### 5.2.1 Testes de Sensibilidade (Carta-controle)

Para a realização dos ensaios de sensibilidade (carta-controle) foram preparadas as soluções estoque de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de KCl e  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , as quais foram armazenadas em frascos âmbar e refrigeradas. A partir dessas soluções estoque foram preparadas as soluções-teste, por meio de diluições em água deionizada para *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*. Para a espécie *D. magna* foram feitas as diluições em água reconstituída (Tabela 6).

Tabela 6 – Características do teste de sensibilidade para os organismos-teste

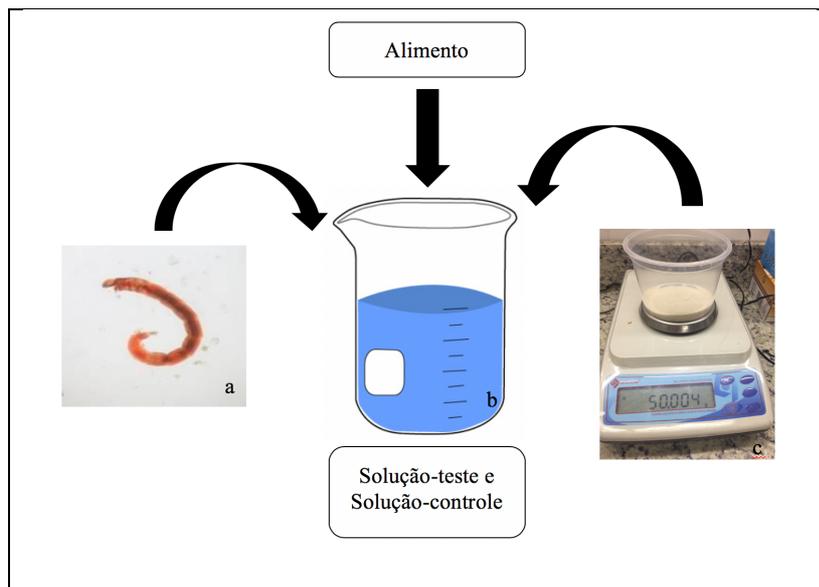
	<i>C. sancticaroli</i>	<i>A. inaequalis</i>	<i>D. magna</i>
Substância de referência	KCl	KCl	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Tipo de teste	Estático	Estático	Estático
Volume da Solução-teste	250 mL	100 mL	100 mL
Sedimento	50 g de areia tratada	Sem Substrato	Sem Substrato
Organismo-teste	6	6	10
Fase do ciclo de vida	IV instar	Qualquer fase	Neonatas até 24h
Número de réplicas para cada concentração	3	3	2
Temperatura	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
Fotoperíodo	12h luz/ 12h escuro	12h luz/ 12h escuro	16h luz/ 8h escuro
Alimentação	5mL apenas no início do teste ( $5 \text{ g.L}^{-1}$ de Tetramin®)	5mL apenas no início do teste ( $2 \text{ g.L}^{-1}$ de Tetramin®)	Sem alimentação
Aeração	Sem aeração	Sem aeração	Sem aeração
Duração do teste	96 horas (4 dias)	96 horas (4 dias)	48 horas (2 dias)
Evitar evaporação das soluções-teste durante o ensaio	Plástico filme transparente	Plástico filme transparente	Plástico filme transparente

Fonte: Elaborado pela Autora

Os testes para obtenção da carta-controle para o organismo-teste *C. sancticaroli* foram realizados anualmente, para verificação da faixa de sensibilidade desse organismo. Sendo assim, foram realizados 3 ensaios. Os testes foram feitos em béqueres de vidro de 500 mL (forma alta) e as concentrações de KCl utilizadas foram de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a  $13 \text{ g.L}^{-1}$  e solução-controle contendo apenas água deionizada e alimento (Figura 15)

(FONSECA, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004; OECD, 2011b; STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985; USEPA, 2002a).

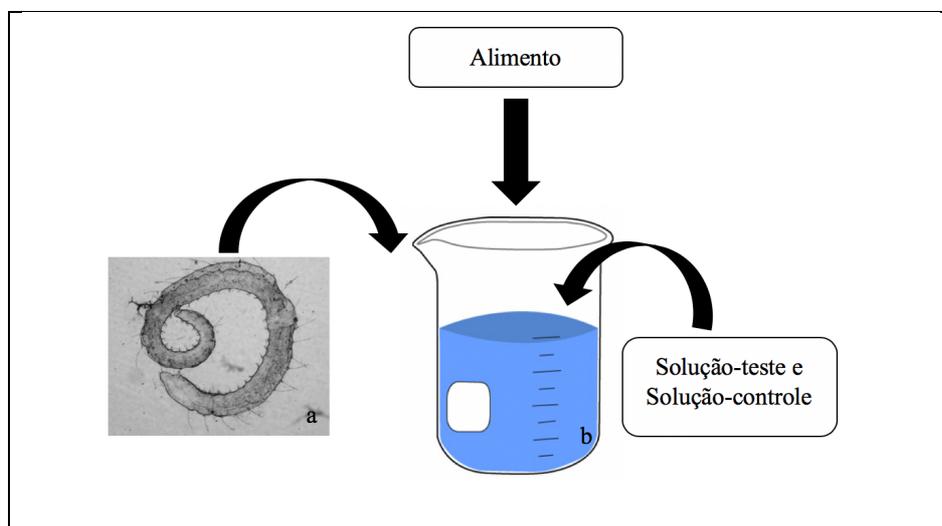
Figura 15 – Esquema de montagem de teste de toxicidade aguda e carta-controle em laboratório a) larva do inseto *C. sancticaroli* no IV instar, b) béquer de vidro com 250 mL de solução-teste/controlado, c) 50g de areia tratada



Fonte: Elaborado pela Autora

Para a espécie *A. inaequalis* os ensaios de carta-controle foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, variando as concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 g.L<sup>-1</sup> de KCl e a solução-controlado contendo apenas água deionizada e alimento (Figura 16) (CORBI; GORNI; CORREA, 2015). Para verificação da faixa de sensibilidade desses organismos, foram realizados ensaios a cada 5 meses, totalizando 7 ensaios.

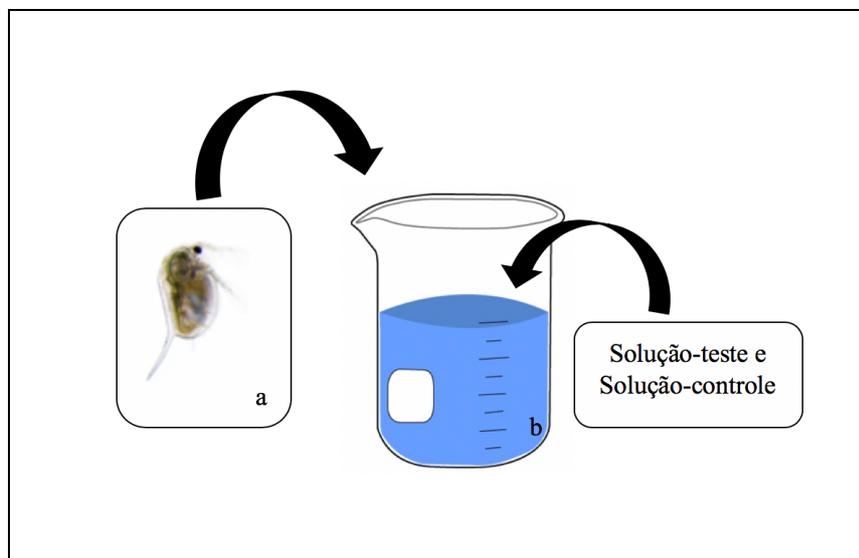
Figura 16 – Esquema de montagem de teste de toxicidade aguda e carta-controlé em laboratório a) Oligochaeta *A. inaequalis*, b) béquer de vidro com 100 mL de soluço-teste/controlé



Fonte: Elaborado pela Autora

Os testes de sensibilidade com a espécie *D. magna* foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, e as concentra es utilizadas de  $\text{CuSO}_4$  forma de 0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 a 0,25  $\text{mg.L}^{-1}$  e a soluço-controlé contendo apenas água reconstituída (Figura 17), pelo fato desse ensaio ser de curta dura o (48h), não houve necessidade de alimentar os organismos-teste (ABNT, 2016a; ARAUCO; CRUZ; MACHADO NETO, 2005; OECD, 2004; USEPA, 2002a, 2016a). A espécie *D. magna*   um organismo exótico, o que o torna mais susceptível as altera es climáticas. Portanto, os testes de sensibilidade foram realizados a cada 2 meses, totalizando 23 bioensaios.

Figura 17 – Esquema de montagem de teste de toxicidade aguda e carta-controle, em laboratório a) Neonatas com menos de 24h de vida da espécie *D. magna*, b) béquer de vidro com 100 mL de solução- teste/controlado



Fonte: Elaborado pela Autora

Os ensaios ecotoxicológicos descritos nos itens 5.2.2 e 5.2.3 foram separados em ensaios relacionados à Hipóteses A e ensaios relacionados à Hipótese B, bem como aos objetivos desse trabalho.

## 5.2.2 Bioensaios de Toxicidade Aguda

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados para a identificação de efeitos severos e rápidos da toxicidade dos contaminantes relacionados às Hipóteses A e B seguindo as configurações padrão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 – Características padrão de testes de toxicidade aguda para os 3 organismos-teste utilizados

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>A. inaequalis</i>	<i>D. magna</i>
Tipo de teste	Estático	Estático	Estático
Volume da Solução-teste	250 mL	100 mL	100 mL
Sedimento/ substrato	50 g de areia tratada	Sem substrato	Sem substrato
Organismo-teste	6	6	10
Fase do ciclo de vida	IV instar	Qualquer fase	Neonatas até 24h
Número de réplicas para cada concentração	3	3	2
Temperatura	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	20 ± 2 °C
Fotoperíodo	12h luz/ 12h escuro	12h luz/ 12h escuro	16h luz/ 8h escuro
Alimentação	5mL apenas no início do teste (5 g.L <sup>-1</sup> de Tetramin®)	5mL apenas no início do teste (2 g.L <sup>-1</sup> de Tetramin®)	Sem alimentação
Aeração	Sem aeração	Sem aeração	Sem aeração
Duração do teste	96 horas (4 dias)	96 horas (4 dias)	48 horas (2 dias)
Evitar evaporação das soluções-teste durante o ensaio	Plástico filme transparente	Plástico filme transparente	Plástico filme transparente

Fonte: Elaborado pela Autora

### Hipótese A: Teste com *C. sancticaroli*

Os testes de toxicidade aguda relacionados à Hipótese A foram realizados utilizando-se as soluções-teste: 5, 10, 15, 20, 23, 25, 26, 29, 30, 35, 40 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão, e a solução-controle, contendo água deionizada e alimento. Os ensaios foram realizados em béqueres de vidro de 500mL, totalizando 8 ensaios (FONSECA, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004; OECD, 2011b; STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985; USEPA,

2002a). As variáveis pH e condutividade elétrica foram medidas no início e no fim de cada teste.

#### **Hipótese B:** Teste com *C. sancticaroli*

Os testes de toxicidade aguda relacionados à Hipótese B foram realizados utilizando-se as soluções-teste: afluente do reator de leito fluidificado (água residuária de lavanderia combinada com esgoto doméstico) e seu respectivo efluente, e as diluições de 0,1, 20, 30 e 50% do efluente, mais a solução-controle contendo água deionizada. Foram realizados, no total, 14 testes de toxicidade aguda em béqueres de vidro de 500mL, compreendendo todas as fases de operação do reator.

#### **Hipótese A:** Teste com *A. inaequalis*

Os ensaios de toxicidade aguda relacionados à Hipótese A foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, variando as concentrações de LAS padrão de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20 e 25 mg.L<sup>-1</sup>, e a solução-controle contendo água deionizada, totalizando 9 testes de toxicidade aguda (CORBI; GORNI; CORREA, 2015). Foram analisadas no início e no final de cada teste as variáveis pH e condutividade elétrica. O esquema de montagem de teste de toxicidade aguda em laboratório com as Oligochaeta *A. inaequalis* segue o mesmo padrão demonstrado na Figura 16.

#### **Hipótese B:** Teste com *A. inaequalis*

Os ensaios de toxicidade aguda relacionados à Hipótese B foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, utilizando as soluções-teste: afluente do reator de leito fluidificado (água residuária de lavanderia combinada com esgoto doméstico) e efluente, e as diluições de 0,1, 20, 30 e 40% do efluente, mais a solução-controle contendo água deionizada, totalizando 18 testes de toxicidade aguda variando as fases do reator.

**Hipótese A:** Teste com *D. magna*

Os ensaios de toxicidade aguda relacionados à Hipótese A com o organismo-teste *D. magna* foram realizados utilizando-se solução-teste LAS padrão, variando as concentrações de 2,0; 2,2; 2,8; 3,4; 3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,0 mg.L<sup>-1</sup>, em 2 réplicas por teste, mais a solução-controle contendo água reconstituída, em béqueres de vidro de 100 mL, totalizando 16 testes de toxicidade aguda. Por se tratar de teste de curta duração, não houve necessidade de alimentar os organismos-teste (ABNT, 2016a; ARAUCO; CRUZ; MACHADO NETO, 2005; OECD, 2004; USEPA, 2002a, 2016a) As variáveis pH e condutividade elétrica foram medidas no início e no fim dos ensaios. O esquema de montagem de teste de toxicidade aguda, em laboratório, com os neonatos com menos de 24 horas de vida da espécie *D. magna*, segue o mesmo padrão demonstrado na Figura 17.

**Hipótese B:** Teste com *D. magna*

Os bioensaios de toxicidade aguda relacionados à Hipótese B foram realizados utilizando-se as seguintes soluções-teste: Afluente, efluente, e as diluições de 0,1, 20, 30, 40 e 50% do efluente do reator de leito fluidificado, mais a solução-controle contendo água reconstituída. Foram realizados, no total, 13 testes de toxicidade aguda em béqueres de vidro de 100 mL, compreendendo todas as fases de operação do reator.

### 5.2.3 Bioensaios de Toxicidade Crônica

Por se tratar de teste de toxicidade de efeito prolongado, a exposição aos agentes tóxicos teve maior duração, e muitas vezes essas concentrações foram subletais, sendo assim ocorreram variações na montagem dos ensaios para cada organismo-teste, no qual pode-se observar as características específicas para cada espécie testada na Tabela 8.

Tabela 8 – Características padrão de testes de toxicidade crônica para os 3 organismos-teste utilizados

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>A. inaequalis</i>	<i>D. magna</i>
Tipo de teste	Estático	Estático	Semi-estático
Volume da Solução-teste	250 mL	100 mL	100 mL
Sedimento	50 g de areia tratada	Sem substrato	Sem substrato
Organismo-teste	6	6	1
Fase do ciclo de vida	I instar	Qualquer fase	Neonatas até 24h
Número de réplicas para cada concentração	3	3	10
Temperatura	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	20 ± 2 °C
Fotoperíodo	12h luz/ 12h escuro	12h luz/ 12h escuro	16h luz/ 8h escuro
Alimentação	5mL no início e no meio do teste (5 g.L <sup>-1</sup> de Tetramin®)	5mL no início e no meio do teste (2 g.L <sup>-1</sup> de Tetramin®)	A cada 48h (complexo alimentar)
Aeração	Constante	Constante	Sem aeração
Duração do teste	10 dias	10 dias	21 dias
Evitar evaporação das soluções-teste durante o ensaio	Plástico filme transparente	Plástico filme transparente	Plástico filme transparente

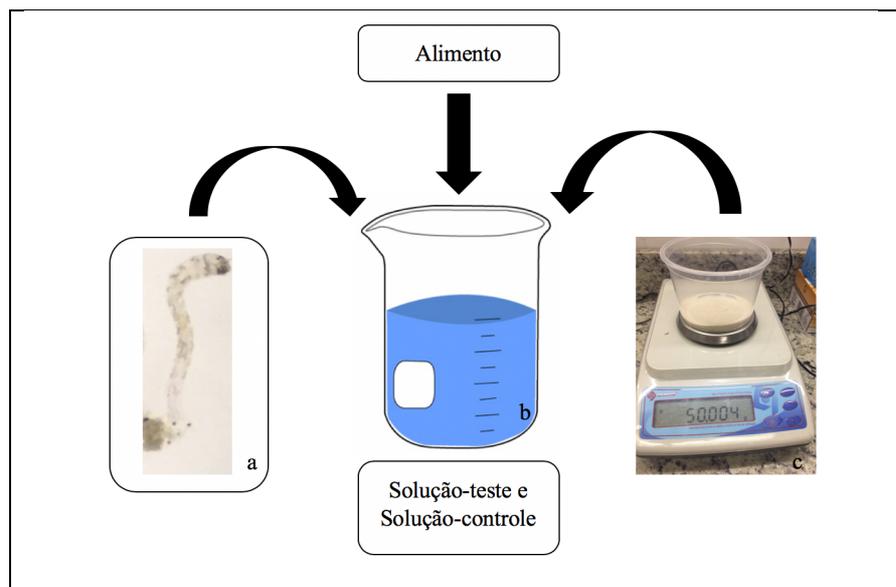
Fonte: Elaborado pela Autora

#### Hipótese A: Teste com *C. sancticaroli*

Os testes de toxicidade crônica relacionados à Hipótese A com a espécie *C. sancticaroli* foram realizados utilizando-se soluções-teste: 5, 10, 13, 15, 16, 19, 20, 22, 25, 28, 30 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão, mais a solução-controle contendo água deionizada. Os ensaios foram realizados em béqueres de vidro de 500mL (Figura 18), totalizando 10

ensaios (FONSECA, 1997; STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985; USEPA, 2002b). As variáveis pH e condutividade elétrica foram medidas no início, no meio e no fim dos testes.

Figura 18 – Esquema de montagem de teste de toxicidade crônica em laboratório a) larva do inseto *C. sancticaroli* no I instar, b) béquer de vidro com 250 mL de solução-teste/controlado, c) 50g de areia tratada



Fonte: Elaborado pela Autora

Foi observada neste teste, a sobrevivência dos organismos quando expostos desde o início até completar grande parte do seu ciclo de vida (IV instar), as larvas sobreviventes foram armazenadas em eppendorff® de 5 mL com álcool isopropílico e refrigeradas para evitar degradação. Posteriormente, essas larvas foram medidas, para avaliar seu desenvolvimento, foram colocadas em uma lâmina de vidro e banhadas com álcool isopropílico para evitar ressecamento das mesmas, e para facilitar o aferimento do comprimento das larvas, utilizou-se o programa computacional IMAGEJ, com o qual os indivíduos foram fotografados em lâminas sobre papel milimetrado para calibração, durante o uso do *software* (Figura 19).

Figura 19 – Lâminas das larvas de *C. sancticaroli* sobre papel milimetrado

Fonte: Acervo pessoal.

### **Hipótese B:** Teste com *C. sancticaroli*

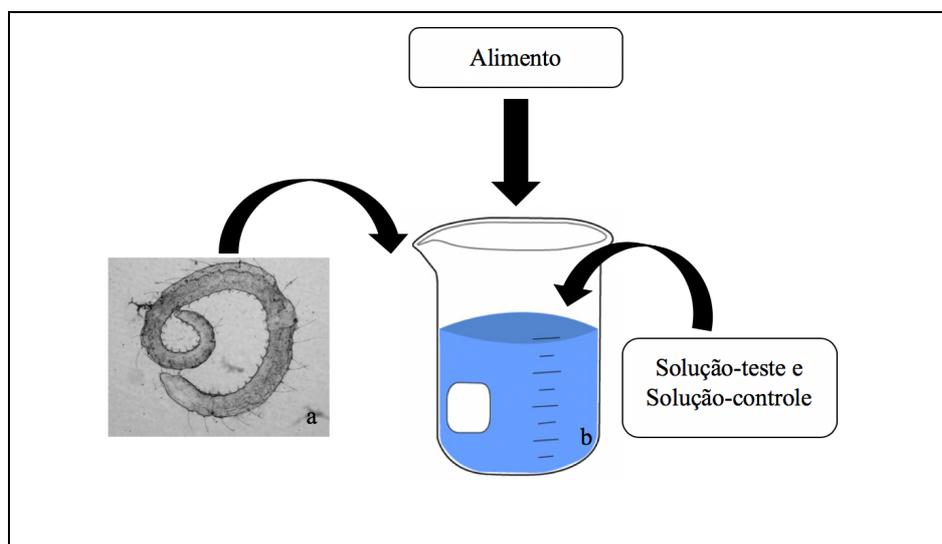
Para a realização dos ensaios de toxicidade crônica relacionados à Hipótese B foram utilizadas as seguintes soluções-teste: afluente, efluente, e as diluições de 0,1, 20% do efluente do reator de leito fluidificado, mais a solução-controle contendo água deionizada. O total 2 testes de toxicidade crônica foram realizados para a fase VI<sub>b</sub> de operação do reator.

A análise do comprimento das larvas sobreviventes expostas as soluções-teste do reator seguiu as mesmas configurações dos testes relacionados à Hipótese A.

### **Hipótese A:** Teste com *A. inaequalis*

Os ensaios de toxicidade crônica relacionados à Hipótese A para a espécie *A. inaequalis* foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, variando as concentrações de LAS padrão de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 13 mg.L<sup>-1</sup>, mais a solução-controle contendo água deionizada (Figura 20) (CORBI; GORNI; CORREA, 2015). As variáveis pH e condutividade elétrica foram medidas no início, no meio e no fim dos ensaios. Foram observadas, nesse teste, além da sobrevivência do organismo, sua capacidade reprodutiva em ambientes não favoráveis. Inicialmente, foram introduzidos 6 organismos, e após a exposição de 10 dias aos contaminantes, foram contabilizados os sobreviventes e verificado se houve reprodução com a contagem do número de indivíduos.

Figura 20 – Esquema de montagem de teste de toxicidade crônica em laboratório a) *Oligochaeta A. inaequalis*, b) béquer de vidro com 100 mL de solução-teste/controlre



Fonte: Elaborado pela Autora

### **Hipótese B:** Teste com *A. inaequalis*

Os testes de toxicidade crônica relacionados à Hipótese B foram realizados utilizando as soluções-teste: afluente, efluente, e as diluições de 0,1, 20% do efluente do reator de leite fluidificado, mais a solução-controlre contendo água deionizada, foram realizados, no total, 3 testes de toxicidade crônica para a fase VI<sub>b</sub> de operação do reator.

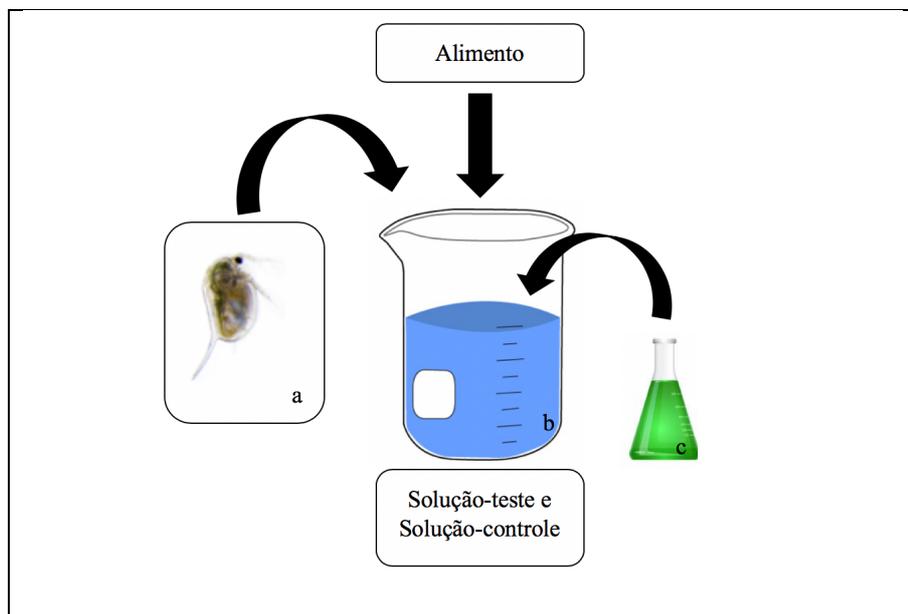
Ao final dos testes foram contabilizadas a reprodução dos sobreviventes dessa espécie, por meio da contagem de indivíduos por réplica.

### **Hipótese A:** Teste com *D. magna*

Os testes de toxicidade crônica relacionados à Hipótese A com a espécie *D. magna* foram realizados em béqueres de vidro de 100 mL, as soluções-teste utilizadas variaram entre as concentrações de LAS padrão subletais (0,4; 1,0; 2,5 mg.L<sup>-1</sup>) e letais (4,8; 5,0; 5,2; 5,4 e 5,6 mg.L<sup>-1</sup>), e mais a solução-controlre contendo apenas água reconstituída. Por se tratar de teste de toxicidade semi-estático (renovação do meio a cada 48 horas), a cada troca, foram preparados novos meios, tanto para as soluções-controlre quanto para as

diferentes soluções-testes (Figura 21) (ABNT, 2017; OECD, 2012; USEPA, 2016b). Os organismos-teste foram alimentados a cada troca, com suspensão algácea de *Pseudokirchneriella subcapitata*, na concentração de  $3 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  e aditivo alimentar, constituído da mistura de 50 mL de ração fermentada de peixe (5  $\text{g.L}^{-1}$  de Tetramin®) e 50 mL de solução com 0,25  $\text{g.L}^{-1}$  de fermento biológico), formando um composto alimentar de 100 mL, após feita essa mistura, os *D. magna* foram alimentados na proporção de 1  $\text{mL.L}^{-1}$ . Os indivíduos-teste foram transferidos para o novo meio utilizando pipeta de Pasteur de vidro de boca larga para não os danificar. As variáveis pH e condutividade elétrica foram medidas no início, no meio e no fim dos bioensaios. Foram observadas, nesse teste, além da sobrevivência do organismo-teste, sua capacidade reprodutiva na presença do surfactante LAS.

Figura 21 – Montagem de teste de toxicidade crônica em laboratório a) Neonatos com menos de 24h de vida da espécie *D. magna*, b) béquer de vidro com 100 mL de solução- teste/controlado, c) suspensão algácea como complementação alimentar



Fonte: Elaborado pela Autora

### 5.2.3.1 Teste de Toxicidade Crônica de Longa Duração – Teste de Gerações

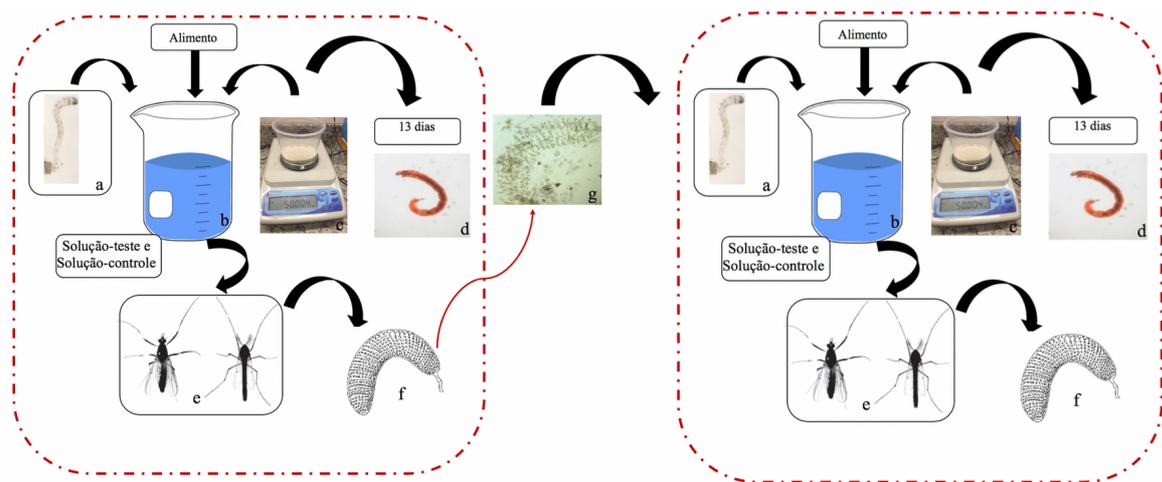
#### Hipótese A:

Os testes ecotoxicológicos de longa duração foram adaptados a partir da metodologia proposta por Bernegossi et al. (2019), envolvendo todo o ciclo de vida da espécie *C. sancticaroli*. Inicialmente, foram utilizadas 10 larvas de I instar desse inseto (I geração), sob aeração constante, temperatura variando entre  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro, condições semelhantes a de um teste de toxicidade crônica padrão (10 dias) (DORNFELD, 2006; FONSECA, 1997). Os testes foram realizados em 3 réplicas, em béqueres de vidro de 1L, com 500 mL da solução-teste, concentrações de LAS padrão variaram de 5, 10 e  $15 \text{ mg.L}^{-1}$ , e a solução-controle contendo água deionizada, 50 g de areia e 5 mL de ração de peixe ( $5 \text{ g.L}^{-1}$  Tetramin®). Após o décimo terceiro dia, quando as larvas estavam no IV instar, foram coletados alguns exemplares (em média, 3 larvas por réplica), para acompanhar seu desenvolvimento (comprimento da larva), e analisar possíveis alterações como a deformidade bucal (Figura 22). Após 14 ou 16 dias, os demais organismos sobreviventes, ainda expostos às soluções-teste e solução-controle, normalmente finalizaram o ciclo de vida, sendo contabilizados a emergência dos adultos, machos e fêmeas. Os adultos emergidos permaneceram nos béqueres, até efetuarem a ovoposição (desova), normalmente depositadas na beira da água, nas áreas marginais do recipiente. Após a confirmação da ovoposição, as fêmeas foram separadas por meio de um sugador simples (material para coleta das fêmeas adultas está descrito no Apêndice E), para análise de fecundidade potencial.

As desovas provenientes de cada concentração da solução-teste e solução-controle foram inseridas, separadamente, em placas de Petri contendo água de cultivo, por 48 horas, até a eclosão e as larvas de I instar estarem visíveis e iniciando natação. Após esse período, e com auxílio de um microscópio e uma pipeta Pasteur de vidro, mais 25 larvas de cada condição-teste foram reintroduzidas em béqueres com as mesmas condições dos anteriores, assim um novo teste se iniciou (II geração) (Figura 22), permitindo dar sequência às análises de possíveis mutações genéticas nos organismos, como por exemplo, alteração no comprimento das asas das fêmeas adultas (fecundidade) e alteração de tamanho das larvas (desenvolvimento), e permitindo analisar as alterações nos dentes do mento das larvas

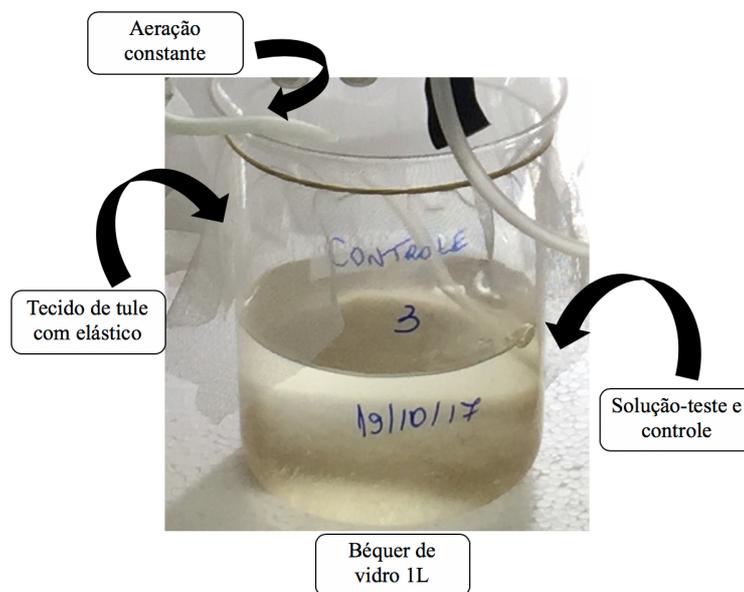
(ausência ou excesso de dentes). Esse teste continuou sequencialmente, até a ocorrência da mortalidade total dos organismos presentes no teste controle, para determinar quantas gerações o organismo-teste conseguiu chegar para cada solução-teste. Como o controle chegou a 3º geração, todas as condições foram mantidas, no máximo, até a 3º geração, a finalização do teste ocorreu quando a última larva emergiu adulto ou morreu, possibilitando o cálculo da proporção de emergência de adultos. Os ensaios foram mantidos sob aeração constante e as larvas foram alimentadas a cada 5 dias. Os recipientes foram cobertos com tela (tecido de tule com elástico), para que os adultos alados não fugissem (Figura 23).

Figura 22 – Teste de toxicidade de gerações **a)** larva do inseto *C. sancticaroli* no I instar, **b)** béquer de vidro com 500 mL de solução-teste/controlado, **c)** 50g de areia tratada, **d)** larvas IV instar, **e)** emergência de adultos (macho e fêmea), **f)** desova, **g)** eclosão das larvas



Fonte: Bernegossi et al. (2019)

Figura 23 – Recipiente-teste utilizado na realização dos testes de gerações



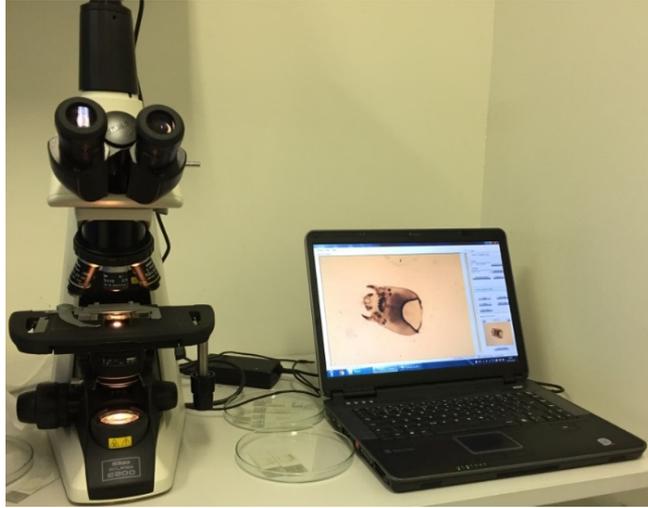
Fonte: Elaborado pela Autora

#### 5.2.3.1.1 Deformidade Bucal

Os organismos-teste capturados do ensaio de gerações foram preservados em álcool isopropílico em eppendorff® de 5 mL e refrigerados para evitar degradação, para posterior preparo das lâminas e observação da deformidade do mento de acordo com o descrito por Kuhlmann et al. (2000). As cápsulas cefálicas foram retiradas e dispostas dorso-ventralmente em lâminas contendo meio de *Hoyer*, cobertas por lamínula e pressionadas para a exposição do mento. As lâminas preparadas foram mantidas em estufa a temperatura de 35°C por 48 horas para secagem do meio até a leitura em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) com auxílio do software TSView (Figura 24).

Organismos com dentes quebrados ou ocultados por qualquer estrutura bucal não foram utilizados para o cálculo de deformidade. Após a leitura das lâminas, os percentuais de deformidade foram calculados para os organismos-teste.

Figura 24 – Cápsula cefálica de *C. sancticaroli* disposta em lâmina observada no *software* TSVView para análise de deformidade do mento

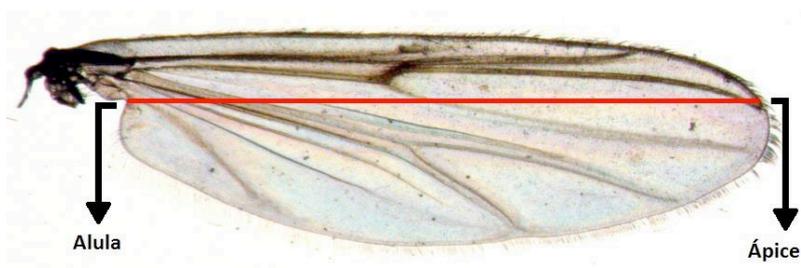


Fonte: Acervo pessoal.

#### 5.2.3.1.2 Avaliação da Fecundidade Potencial

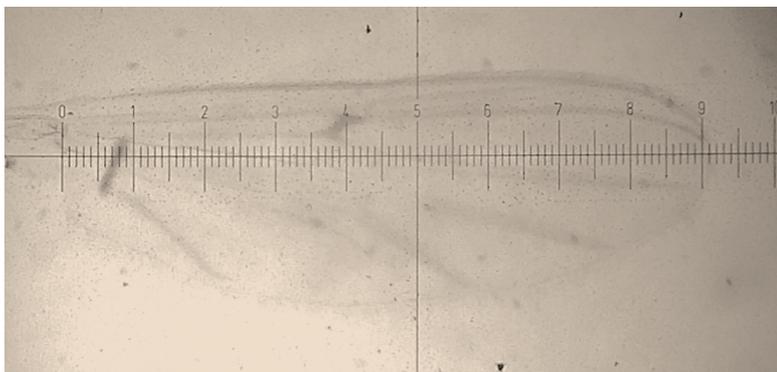
A avaliação da fecundidade potencial seguiu os métodos recomendados por Trivinho-Strixino (1980), no qual a asa é medida a partir da alula e segue em linha reta até o ápice (Figura 25). As fêmeas capturadas nos testes de gerações foram armazenadas em eppendorff® de 5 mL com álcool isopropílico e refrigeradas para evitar degradação para posterior preparo das lâminas, as asas direita e esquerda do inseto adulto foram retiradas e dispostas em lâminas contendo meio de *Hoyer*, cobertas por lamínula. As lâminas preparadas foram mantidas em estufa a temperatura de 35°C por 48 horas para secagem do meio até a leitura, comprimento da asa em microscópio óptico da marca Quimis® com aumento de 200X e com auxílio de lente graduada (Figura 26).

Figura 25 – Asa da fêmea de *C. sancticaroli*



Fonte: (REBECHI, 2012)

Figura 26 – Asa da fêmea do inseto *C. sancticaroli* medida com auxílio de lente graduada



Fonte: Acervo pessoal.

Após o dimensionamento do comprimento das asas das fêmeas direita e esquerda, foi feita uma média dos comprimentos e por meio da fórmula estabelecida por Trivinho-Strixino (1980), foi avaliada a fecundidade potencial:

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

Onde,

F = fecundidade potencial

k = constante (471,64)

L = comprimento da asa

m = constante (707,41)

### 5.3 Análises estatísticas

Os resultados dos testes de toxicidade aguda, crônica e crônica de longa duração foram analisados por meio da estatística descritiva, em gráficos Boxplot, originados pelo software Origin® 2018. Os resultados foram avaliados também por meio da análise de Cluster, utilizando-se as distâncias de similaridade Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957) baseado na variação das concentrações e seus efeitos de letalidade para agrupar o conjunto de dados, utilizando-se o *software* PAST® (*Paleontological Statistics*) versão 3.21 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Para determinar quão bem os clusters gerados representam diferenças entre os objetos, calculou-se o coeficiente de correlação cofenético, e valores próximos a 0, indicando um agrupamento pobre, e próximo de 1, indicando um bom agrupamento, com robustez dos dados analisados (MICHIE, 1982).

As análises estatísticas foram baseadas em hipóteses, utilizando-se o *software* PAST® (*Paleontological Statistics*) versão 3.21 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), no qual foi utilizada a análise estatística de variância ANOVA one-way com  $p$  valor  $<0,05$ , mas quando os dados não estavam normalmente distribuídos ou as variâncias eram desiguais, foi utilizada a análise de variância não paramétrico de Kruskal-Wallis com  $p$  valor  $<0,05$ .

As hipóteses utilizadas foram:

$H_0$ = Todas as concentrações de LAS padrão, tem o mesmo efeito tóxico/ de que os afluentes, efluentes e as diluições dos efluentes nas seis fases de operação do reator têm o mesmo efeito tóxico

$H_1$ = Nem todas as concentrações de LAS padrão, tem o mesmo efeito tóxico/ Afluentes, efluentes e as diluições dos efluentes nas seis fases de operação do reator não têm o mesmo efeito tóxico

Quando a hipótese nula ( $H_0$ ) era rejeitada pela análise ANOVA ou Kruskal-Wallis, foram utilizados testes *posteriori* de Tukey (variância) ou de Dunn (variância desiguais) (RUXTON; BEAUCHAMP, 2008) para verificar quais concentrações ou amostras do reator apresentavam comportamentos distintos em seus efeitos tóxicos.

Os resultados obtidos a partir dos testes de sensibilidade, testes de toxicidade aguda e crônica com os organismos *C. sancticaroli*, *A. inaequalis* e *D. magna*, foram analisados e tratados (distribuição normal) utilizando o pacote “DRC” e “MASS” no software “R” (R Core Team, 2014), para obter o valor de  $CL_{50}/CE_{50}$ .

O gráfico de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD) e a concentração perigosa a 50% (valor  $HC_{50}$ ) foram estimadas usando distribuição log-normal através do *software* ETX 2.0 (WINTERSEN; VAN VLAARDINGEN; TRAAS, 2004).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

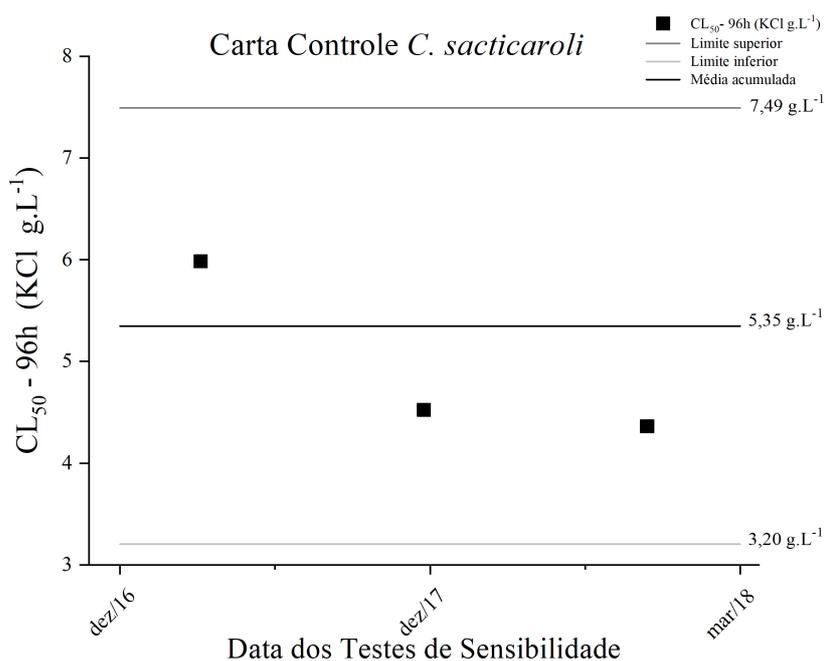
### 6.1 Carta-controle

As cartas-controle foram desenvolvidas a partir dos resultados obtidos por todos os membros do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos, que realizaram testes ecotoxicológicos para suas pesquisas, periodicamente. As análises para a compilação das cartas controle foram realizadas no período entre 2016 a 2018.

As cartas-controle foram desenvolvidas a partir do valor de  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  de cada teste realizado, e para determinar a faixa de sensibilidade, utilizaram-se as médias e seus respectivos desvios padrão, determinando os limites superior e inferior da faixa de sensibilidade. As cartas-controle apresentam a variação do comportamento dos organismos-teste, e quando essa variação segue um padrão na sensibilidade a uma substância de referência pode-se determinar que o lote está adequado para utilização em bioensaios de toxicidade.

A partir da carta-controle para o inseto *C. sancticaroli* é possível identificar a sensibilidade média de  $5,35 \text{ g.L}^{-1}$  de KCl (Figura 27). Pode-se observar as variações das  $CL_{50}$  desse organismo-teste mesmo dentro da faixa de sensibilidade, essa variação pode estar atrelada a variações de sazonalidade climática, onde esse organismo se apresenta mais resistente à substância de referência, no ano de 2016. Entretanto, os testes da carta-controle apontaram que a resposta da sensibilidade do *C. sancticaroli*, manteve-se dentro da faixa de sensibilidade. Permitindo assim, a utilização desses organismos-teste em ensaios de toxicidade.

Diversos autores realizaram teste com a substância de referência utilizada neste trabalho para analisar a sensibilidade dos organismos *C. sancticaroli* e encontraram valores de  $2,4$  a  $6,4 \text{ g.L}^{-1}$  de KCl (DA COSTA et al., 2014; DELL'ACQUA, 2017; MORAIS et al., 2014; SUEITT et al., 2015). A partir desses resultados, pode-se inferir que a faixa de sensibilidade do inseto *C. sancticaroli*, utilizada nesta pesquisa, está dentro dos limites encontrados na literatura, tornando se viável a comparação dos testes de toxicidade com a literatura existente.

Figura 27 – Carta-control para a espécie *Chironomus sancticaroli*

Fonte: Elaborado pela Autora

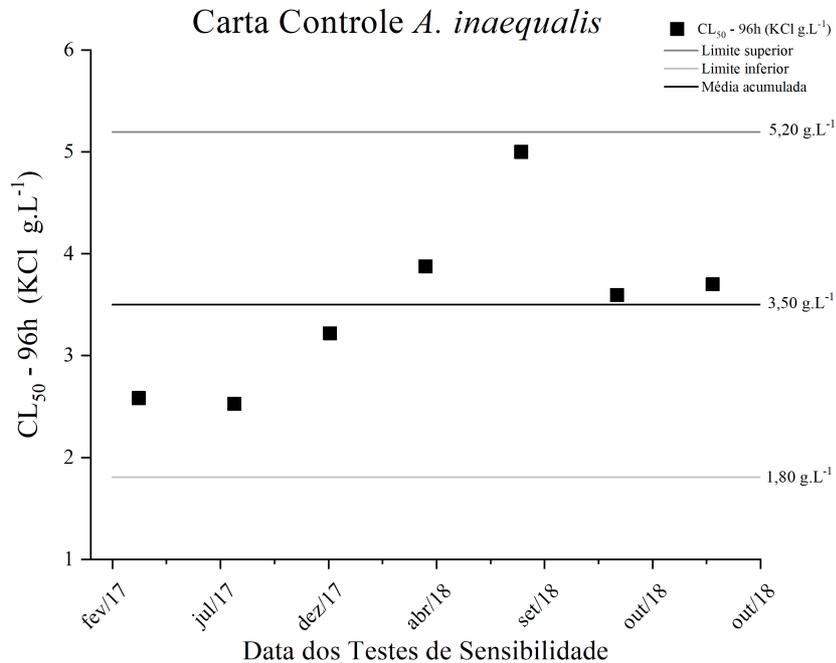
A espécie *A. inaequalis* apresentou sensibilidade média de 3,50 g.L<sup>-1</sup> de KCl (Figura 28), a partir dos testes realizados a cada 5 meses, entre os anos de 2017 a 2018. Pode-se observar o efeito da variação de sazonalidade climática para essa espécie, o qual pode estar associado às temperaturas externas, em estações mais frias do ano, nota-se maior sensibilidade desse organismo à substância de referência. Entretanto, todos os testes de sensibilidade realizados com este organismo apresentaram-se dentro da faixa de sensibilidade, o que possibilita sua utilização para testes ecotoxicológicos.

O oligoqueto *A. inaequalis* é considerado um organismo-teste relativamente “novo” para os ensaios de toxicidade, o que não o desclassifica para tal uso, porém ainda há poucos relatos na literatura a respeito de seu uso em testes ecotoxicológicos.

Corbi; Gorni e Correa (2015) e Higashi (2016) realizaram testes de sensibilidade com *A. inaequalis* utilizando KCl como substância de referência, e obtiveram CL<sub>50</sub> de 3,5 g.L<sup>-1</sup> em ambos os estudos. Em outro estudo valor de CL<sub>50</sub> de 4,72 g.L<sup>-1</sup> para KCl e *A. inaequalis* foi encontrado (GEROMEL-COSTA, 2018). Com base nesses estudos, a sensibilidade média do organismo-teste *A. inaequalis* obtida nesta pesquisa, corroboram a

sensibilidade desses organismos em testes de toxicidade com aquelas anteriormente descritas em trabalhos publicados.

Figura 28 – Carta-controlê para o organismo-teste *Allonais inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

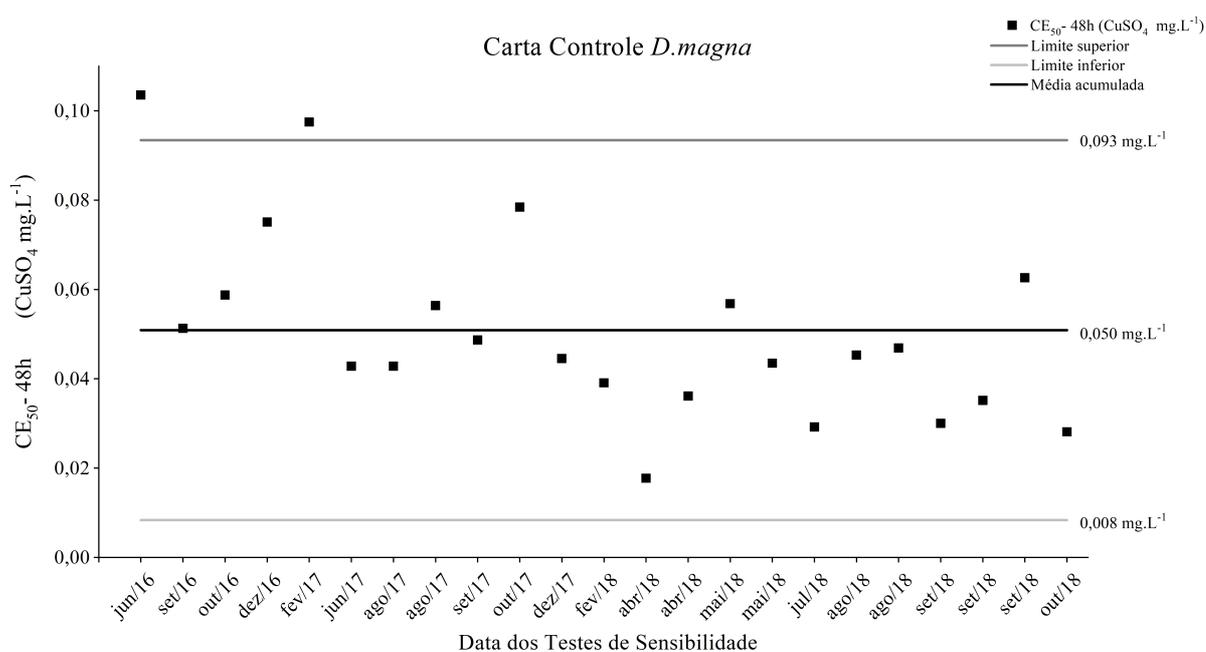
A espécie *D. magna*, por se tratar de um organismo-teste exótico, necessita de controle mais rígido quanto a sua sensibilidade e, conseqüentemente, realizaram-se testes de sensibilidade a cada 2 meses, para acompanhar possíveis alterações de sensibilidade à substância de referência, com o intuito de determinar o uso ou não uso daquele lote de organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos.

Foram realizados ensaios de sensibilidade com *D. magna* no período de 2016 a 2018, por ser um organismo-teste de climas temperados, a variação da sensibilidade desse organismo pode estar atrelada a fatores de tolerância a ambientes externos não favoráveis, como é o caso da sazonalidade climática, em estações mais quentes esse organismo apresenta-se mais sensível à substância de referência. Os testes da carta-controlê resultaram em CE<sub>50</sub> médio de 0,05 mg.L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> (Figura 29), no qual, nota-se que a maioria das CE<sub>50</sub> estão dentro da faixa de sensibilidade estabelecida. Porém, os testes de junho de 2016 e fevereiro de 2017, apontam maior sensibilidade dos organismos-teste, pois, encontram-se

fora dos limites determinados, sendo assim, os testes ecotoxicológicos realizados nessas datas foram descartados e desconsiderados.

A concentração que causa efeito de imobilidade para a espécie *D. magna* utilizando-se sulfato de cobre em análise de sensibilidade, foi estudada por diversos pesquisadores, que encontraram valores de  $CE_{50}$  entre 0,034 a 0,055  $mg.L^{-1}$   $CuSO_4$  (ARAUCO; CRUZ; MACHADO NETO, 2005; BASTOS, 2013; STRUEWING et al., 2015). A partir desses resultados, pode-se inferir que o  $CE_{50}$  médio encontrado nesta pesquisa para o microcrustáceo *D. magna* está dentro dos limites encontrados na literatura, tornando se viável a comparação dos bioensaios de toxicidade com a literatura existente.

Figura 29 – Carta-control para o microcrustáceo *Daphnia magna*



Fonte: Elaborado pela Autora

## 6.2 Hipótese A

Com o intuito de testar a Hipótese A, foram realizados testes de toxicidade aguda, crônica e crônica de longa duração com a substância Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS padrão), com a espécies *C. sancticaroli*, *A. inaequalis* e *D. magna*, para obter respostas de toxicidade, desenvolvimento, fecundidade, reprodução e possíveis deformidades nos organismos-teste com esse contaminante em específico.

### 6.2.1 Teste de Toxicidade Aguda com LAS padrão

Os testes de toxicidade aguda foram realizados para identificação do efeito tóxico imediato do LAS nos invertebrados selecionados nesta pesquisa, resultando em concentrações de efeito letal e/ou de imobilidade, com o intuito de responder se o surfactante LAS padrão causa efeitos negativos na biota aquática. Para a confecção da análise dos dados, são apresentados Boxplots e análise de agrupamento hierárquico de Cluster.

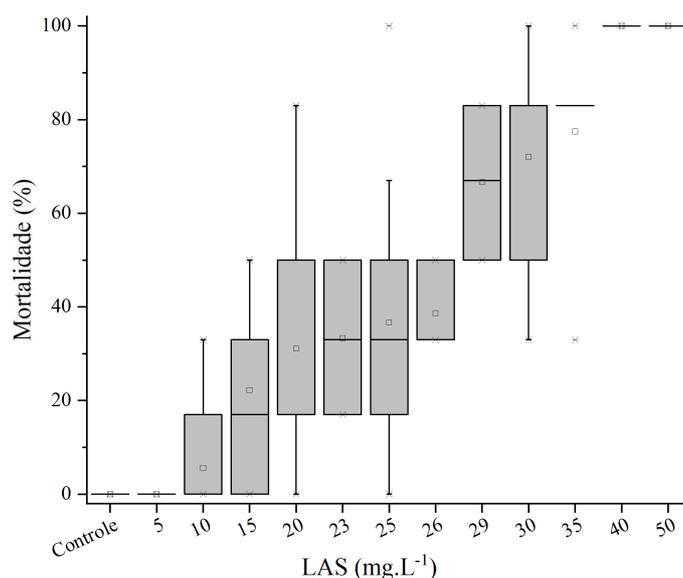
O pH e a condutividade elétrica das soluções-teste e da solução-controle apresentaram pouca variação no intervalo de tempo entre o início e o final dos bioensaios. Portanto, infere-se que tais variáveis não influenciaram na mortalidade dos organismos-teste. Nos testes de toxicidade aguda realizados com *C. sancticaroli*, a variação do pH foi de 6,8 a 7,5 e de 15 a 26  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  para a condutividade elétrica, tanto para os testes controle quanto para as concentrações de LAS padrão. Nos testes com *A. inaequalis*, a amplitude de variação do pH foi de 7,0 a 7,5 e de condutividade elétrica foi de 11 a 27  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Já para o organismos-teste *D. magna*, os valores iniciais e finais das soluções-teste e solução-controle de pH variaram entre 7,6 a 8,0, enquanto a condutividade elétrica, entre 389 a 483  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 6.2.1.1 *Chironomus sancticaroli*

Foram realizados testes de toxicidade aguda com o inseto *C. sancticaroli* em fase larval de IV instar, com duração de 96 horas, no qual pôde-se observar, por meio do gráfico Boxplot, que a mortalidade desse organismo-teste está associada às concentrações de LAS

(Figura 30). Em concentrações mais elevadas (29, 30, 35, 40 e 50 mg.L<sup>-1</sup>), nota-se mortalidade entre 50 e 100% desse inseto, evidenciando elevado efeito tóxico desse surfactante para essa espécie. As concentrações intermediárias testadas (20, 23, 25 e 26 mg.L<sup>-1</sup>) apontam mortalidade média acima de 30%, e mesmo nas concentrações mais baixas (10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>), pode-se observar mortalidade acima de 5% dos organismos. Já a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> não causa efeito letal a essa espécie, podendo compará-la ao controle. A partir desses resultados pode-se inferir que o LAS padrão em exposição aguda ao inseto *C. sancticaroli* causa efeito tóxico sobre a vida desse macroinvertebrado aquático e esse efeito é dependente da concentração utilizada.

Figura 30 – Boxplot representando a mortalidade das larvas de IV instar de *C. sancticaroli* expostas a diferentes concentrações de LAS padrão por 96 horas

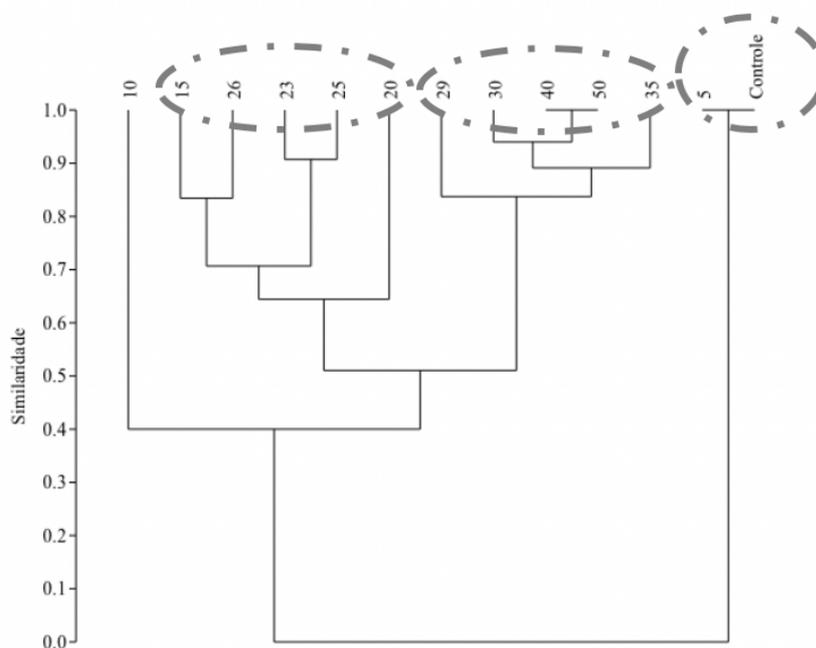


Fonte: Elaborado pela Autora

O agrupamento hierárquico Cluster (coeficiente de correlação cofenética de 0,95) (Figura 31), destaca 3 agrupamentos por similaridade. O primeiro agrupamento é composto do teste controle e a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>, com similaridade de 100%. O segundo agrupamento contempla as concentrações mais altas (29, 30, 35, 40 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) com mais

de 85% de semelhança. As concentrações intermediárias (15, 20, 23, 25 e 26 mg.L<sup>-1</sup>) foram agrupadas no terceiro agrupamento, com similaridade aproximadamente de 70%. Por outro lado, a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>, por apresentar menor efeito tóxico ao *C. sancticaroli*, aparece distante dos demais agrupamentos, com similaridade de 40%, excluindo apenas o controle e a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>. O agrupamento de similaridade de Bray-Curtis demonstra que o efeito tóxico do LAS está atrelado às concentrações utilizadas. As concentrações mais elevadas causam maiores efeitos tóxicos ao *C. sancticaroli* e dessa maneira se agrupam, e o mesmo ocorre para as demais concentrações.

Figura 31 – Análise de Cluster com similaridade do efeito tóxico das concentrações de LAS padrão as larvas de IV instar de *C. sancticaroli*



Fonte: Elaborado pela Autora

A concentração letal a 50% (CL<sub>50-96h</sub>) dos indivíduos de *C. sancticaroli*, em 96 horas de exposição ao LAS padrão, foi 25,25 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão (Tabela 9). Essa concentração pertencente à faixa de concentrações intermediárias testadas nesse organismo e está inserida no terceiro agrupamento da análise de Cluster.

Tabela 9 – Concentração de LAS padrão que causa letalidade a 50% dos organismos- teste *C. sancticaroli*

<p style="text-align: center;"><b>Teste de Toxicidade Aguda</b> <i>C. sancticaroli</i></p>	<p style="text-align: center;"><b>CL<sub>50-96h</sub></b> <b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b></p>
	<p style="text-align: center;">25,25 (23,98 – 26,53)</p>

Fonte: Elaborado pela autora

Pittinger; Woltering e Master (1989) observaram, em testes de toxicidade crônica, que a presença de 20 g de sedimentos reduziu a biodisponibilidade do LAS, atenuando seus efeitos tóxicos aos *Chironomus*, no qual evidenciaram a emergência de 75% dos adultos desse inseto expostos a 5 mg.L<sup>-1</sup> de LAS. Pode-se inferir para esta pesquisa, que o LAS (C<sub>12</sub>) estava menos biodisponível ao *C. sancticaroli*, pela utilização de 50 g de areia tratada nos testes de toxicidade aguda e crônica, assim, o efeito de adsorção do LAS pode ter interferido na taxa de letalidade desse organismo-teste. Porém, isso não desqualifica o uso do substrato para tais testes, pelo fato de que no ambiente aquático real, há sedimentos de fundo, compostos em geral, por areia, silte, argila, e por essa espécie possuir hábitos bentônicos, de fundo de rios.

Em outro estudo, no qual foi observada a adsorção do LAS no sedimento, o teste de toxicidade aguda com exposição de 48 horas com a espécie *C. riparius* para solução-teste LAS padrão (C<sub>12</sub>), sem substrato, obtiveram CL<sub>50-48h</sub> de 2,65 mg.L<sup>-1</sup> (MÄENPÄÄ; KUKKONEN, 2006). O estudo realizado por Hwang et al. (2003), nos Estados Unidos, com a espécie *C. riparius*, em teste de toxicidade aguda com o LAS (C<sub>12</sub>), sem sedimento, resultou em CL<sub>50-96h</sub> de 2,2 mg.L<sup>-1</sup>. Os pesquisadores Pittinger; Woltering e Master (1989), realizaram testes de toxicidade aguda de 72 horas, sem sedimento, para verificar o efeito do LAS (C<sub>11-6</sub>) e outros surfactantes na eclosão dos ovos e na sobrevivência das larvas de *C. riparius* pós-nascimento. Os autores não encontraram nenhuma redução significativa na eclosão dos ovos, nem mesmo na concentração mais elevada utilizada: 18,9 mg.L<sup>-1</sup> LAS, e o efeito de letalidade CL<sub>50-72h</sub> foi entre 1,0 e 4,7 mg.L<sup>-1</sup>.

Mesmo com a utilização de substrato, as diferenças de sensibilidade ao contaminante LAS, encontradas na literatura com a espécie *C. riparius* comparadas à espécie utilizada nessa pesquisa *C. sancticaroli*, são perceptíveis. Outros pesquisadores

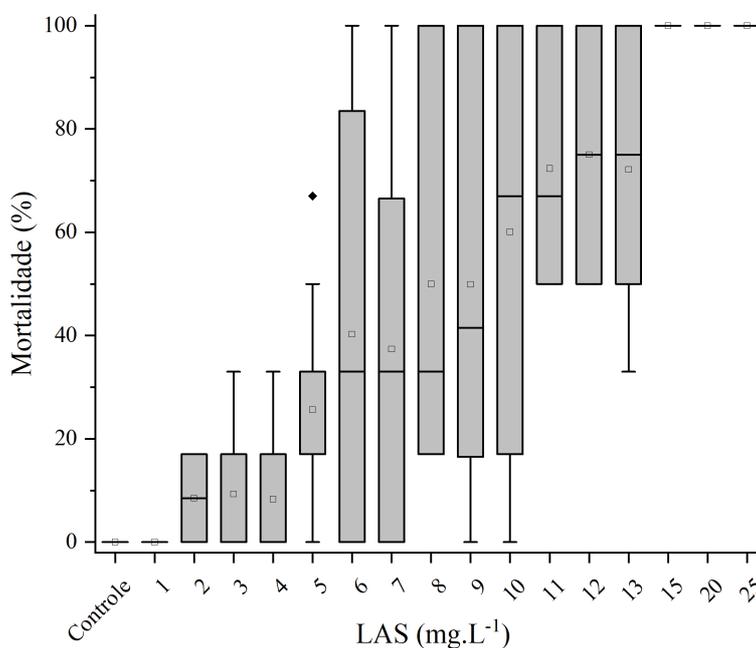
também notaram essas diferenças quando realizaram testes de toxicidade, como Dornfeld et al. (2019) que comparam a sensibilidade dos organismos *C. sancticaroli* e *C. riparius* ao cobre, e concluíram que o *C. sancticaroli* é 7 vezes mais resistente a essa substância que o *C. riparius*. Esses resultados confirmam a importância da utilização de espécies nativas em bioensaios e que o organismo *C. sancticaroli* é mais resistente ao LAS que o *C. riparius*.

#### 6.2.1.2 *Allonais inaequalis*

Os resultados obtidos por meio de testes de toxicidade aguda (96 horas de duração) com a espécie *A. inaequalis* para a toxicidade do LAS evidenciaram que a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> e o controle, não apresentaram efeito tóxico ao oligoqueto, conforme observado no gráfico Boxplot (Figura 32). Os resultados também indicam que em concentrações baixas (2, 3, 4 e 5 mg.L<sup>-1</sup>) o LAS causam mortalidade de 10 a 30% dos oligoquetos.

As concentrações intermediárias (6, 7, 8, 9 e 10 mg.L<sup>-1</sup>) apresentam variações em seus efeitos tóxicos entre 0 a 100% de letalidade, essa oscilação pode estar atrelada a diversos fatores, entre eles, a resposta metabólica do organismo ao LAS padrão (MÄENPÄÄ; KUKKONEN, 2006) e ainda, a sensibilidade ao contaminante, por meio da sazonalidade climática observada na carta-contrôle. Já as concentrações de 11, 12, 13, 15, 20 e 25 mg.L<sup>-1</sup> apontam elevada toxicidade do LAS aos *A. inaequalis*, ocasionando efeito letal de 70 a 100% desses organismos.

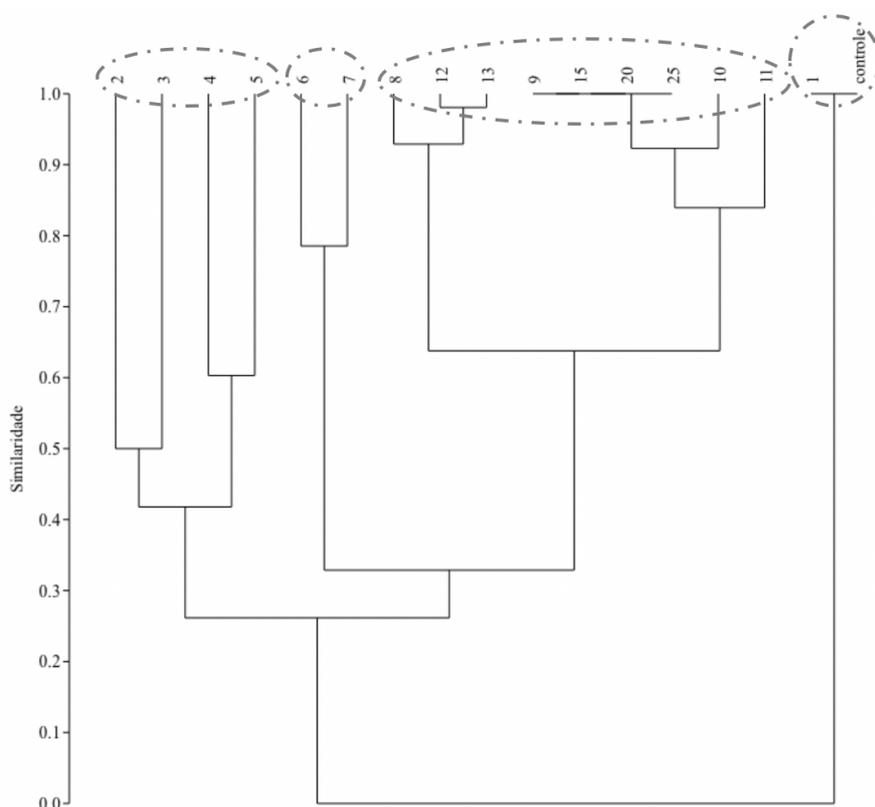
Figura 32 – Boxplot representando a mortalidade dos oligoquetos *A. inaequalis* expostos a diferentes concentrações de LAS padrão por 96 horas



Fonte: Elaborado pela Autora

O Cluster de similaridade de Bray-Curtis (Coeficiente cofenético 0,94) (Figura 33), apresenta 4 agrupamentos. O primeiro agrupamento é constituído pelo teste controle e a concentração e 1 mg.L<sup>-1</sup> de LAS, com similaridade de 100%, e distanciando-se das demais concentrações que causam mortalidade a essa espécie. O segundo agrupamento contempla as concentrações mais elevadas (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 20 e 25 mg.L<sup>-1</sup>) com similaridade acima de 65%, no qual pode-se inferir que quanto mais alta a concentração mais tóxico é o LAS para essa espécie. O terceiro agrupamento inclui as concentrações 6 e 7 mg.L<sup>-1</sup>, com similaridade de 75% entre si, e acima de 35% do agrupamento das concentrações mais elevadas. O quarto agrupamento compoem as concentrações mais baixas (2, 3, 4 e 5 mg.L<sup>-1</sup>), apontam similaridade acima de 40% entre si e 25% com o agrupamento das concentrações mais tóxicas. O agrupamento de similaridade demonstra que o efeito tóxico do LAS está atrelado às concentrações utilizadas, e quanto maiores as concentrações maiores são seus efeitos tóxicos sobre a espécie *A. inaequalis*, e dessa maneira se agrupam, e o mesmo ocorre para as demais concentrações.

Figura 33 – Análise Cluster de similaridade das concentrações em relação a toxicidade do LAS padrão para a espécie *A. inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

A concentração que causa mortalidade a 50% ( $CL_{50}$ ) da espécie *A. inaequalis*, em exposição de 96 horas ao LAS ( $C_{12}$ ), está apresentada na Tabela 10. Apesar da notória variação do efeito letal do LAS nas concentrações intermediárias, o valor da concentração  $CL_{50}$  de *A. inaequalis* não foi afetado.

Tabela 10 – Concentração de LAS padrão que causa letalidade a 50% dos organismos- teste *A. inaequalis*.

Teste de Toxicidade Aguda <i>A. inaequalis</i>	$CL_{50-96h}$ ( $mg.L^{-1}$ )

Fonte: Elaborado pela Autora

Apesar da utilização de oligoquetos em ensaios ecotoxicológicos ser recomendada na literatura (CHAPMAN, 2001; CORBI; GORNI; CORREA, 2015; EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013; SMITH; KENNEDY; DICKSON, 1991) há poucos relatos desses organismos em teste de toxicidade, e quase inexistentes para a espécie *A. inaequalis*.

Mäenpää e Kukkonen (2006) realizaram testes de toxicidade aguda com o oligoqueto *Lumbriculus variegatus*, utilizando-se o LAS (C<sub>12</sub>) em 48 horas de exposição, e obtiveram CL<sub>50</sub> 5,65 mg.L<sup>-1</sup>. Casellato e Negrisolo (1989) realizaram testes de toxicidade aguda com os oligoquetos *Branchiura sowerlyi* e *Limnodrilus hoffmeisteri*, utilizando LAS em 96 horas de exposição, e obtiveram CL<sub>50-96h</sub> de 4,38 mg.L<sup>-1</sup> para *B. sowerlyi* e CL<sub>50-96h</sub> de 1,98 mg.L<sup>-1</sup> para *L. hoffmeisteri*. A partir dos resultados encontrados na literatura, pode-se inferir que a espécie *A. inaequalis* é mais resistente que outros oligoquetos, com CL<sub>50-96h</sub> de 8,13 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão.

### 6.2.1.3 *Daphnia magna*

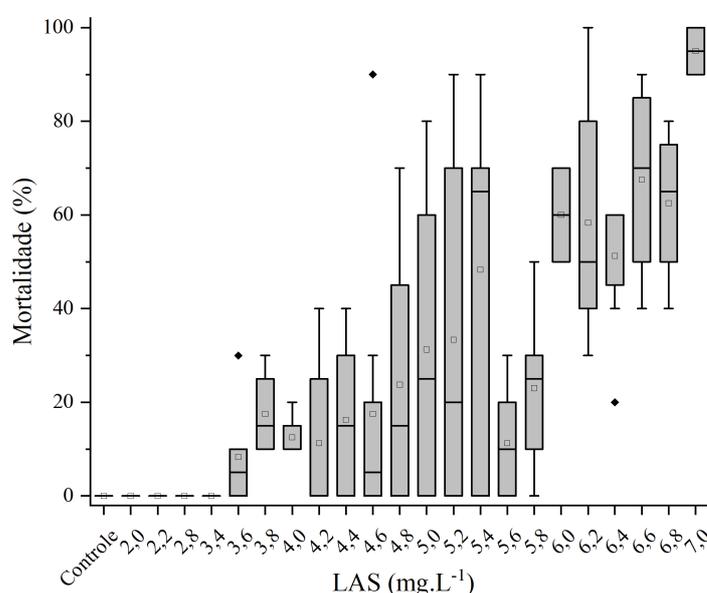
Nos testes de toxicidade aguda realizados com o organismo-teste *D. magna*, as concentrações de LAS padrão mais baixas (2,0; 2,2; 2,8 e 3,4 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram semelhanças com o teste controle, no qual pode-se observar que essas concentrações não causaram mortalidade para o microcrustáceo (Figura 34). Analisando as concentrações de 3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4 e 4,6 mg.L<sup>-1</sup> pode-se evidenciar efeito letal sobre os *D. magna*, entre 10 e 20% de mortalidade.

As concentrações intermediárias (4,8; 5,0; 5,2 e 5,4 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram variações em seus efeitos tóxicos entre 0 a 90% de letalidade, essa oscilação pode estar relacionada ao extenso período de realização de testes com este organismo, (2 anos). Dentro desse período, é possível observar a variância de sensibilidade entre épocas de verão e inverno, demonstrado pela carta-controle. Essa variância demonstra que a resposta do organismo pode variar ao longo do ano, e nas concentrações intermediárias, testes que ocorreram em épocas distintas, produziram efeitos contrários.

As concentrações 5,6 e 5,8 mg.L<sup>-1</sup> apresentam-se mais tóxicas ao organismo-teste que as concentrações mais baixas, causando mortalidade de 15 a 25%. Já para as maiores

concentrações utilizadas (6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8 e 7,0 mg.L<sup>-1</sup>) pode-se identificar elevada toxicidade do LAS (C<sub>12</sub>) ao microcrustáceo, evidenciando a mortalidade média de 50 a 95% dessa espécie. Com os resultados dos testes de toxicidade aguda com *D. magna*, pode-se concluir que o efeito tóxico do LAS está relacionado com suas concentrações.

Figura 34 – Boxplot representando a mortalidade do cladóceros *D. magna* expostos a diferentes concentrações de LAS padrão por 48 horas

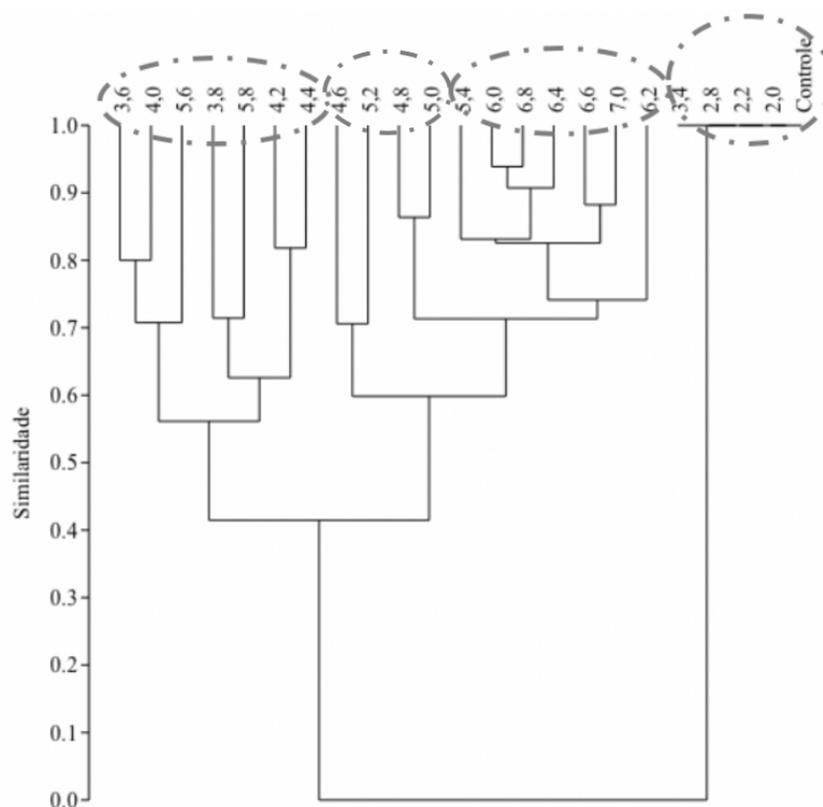


Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente cofenético de 0,98) foi realizada por meio dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *D. magna* (Figura 35). O Cluster apresenta 4 grandes agrupamentos por similaridade dos efeitos tóxicos das concentrações de LAS. O primeiro agrupamento, com as concentrações mais baixas (2,0; 2,2; 2,8 e 3,4 mg.L<sup>-1</sup>) e o teste controle apontam similaridade de 100%, esse agrupamento distancia-se dos demais que causam mortalidade a essa espécie. O segundo grande agrupamento contempla as maiores concentrações (6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8 e 7,0 mg.L<sup>-1</sup>) evidenciando que as concentrações que causam maiores efeitos letais ao *D. magna* se assemelham acima de 75%. O terceiro agrupamento, com as concentrações intermediárias

(4,6; 4,8; 5,0 e 5,2 mg.L<sup>-1</sup>) apresentam similaridade de 60% do agrupamento das concentrações mais tóxicas. E o quarto grande agrupamento é composto pelas concentrações (3,6; 3,8; 4,0; 4,2; 4,4; 5,6 e 5,8 mg.L<sup>-1</sup>) que apresentaram efeitos letais de 10 a 25% nesse organismo. Pode-se inferir por meio dos resultados de similaridade de Bray-Curtis, que as concentrações de LAS se agruparam conforme seus efeitos tóxicos ao organismo-teste, demonstrando que em maiores concentrações desse surfactante maior é a toxicidade para *D. magna*.

Figura 35 – Análise de Cluster com similaridade do efeito tóxico das concentrações de LAS padrão para a espécie *D. magna*



Fonte: Elaborado pela Autora

A concentração de imobilidade a 50% (CE<sub>50</sub>) dos indivíduos *D. magna*, em 48 horas de exposição ao LAS padrão, foi de 6,11 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão (Tabela 11). Apesar da notória variação do feito letal do LAS nas concentrações intermediárias, o cálculo da

concentração  $CE_{50}$  de *D. magna* não foi afetado, e seu resultado assemelha-se à faixa de  $CE_{50}$  encontrada na literatura.

Tabela 11 – Concentração de LAS padrão que causa imobilidade a 50% dos organismos- teste *D. magna*

Teste de Toxicidade Aguda <i>D. magna</i>	$CE_{50-48h}$ ( $mg.L^{-1}$ )
	6,11 (5,90 – 6,34)

Fonte: Elaborado pela Autora

Os testes de toxicidade aguda e crônica envolvendo o organismo-teste *D. magna* são bem definidos e estabelecidos na literatura mundial. Entretanto, a concentração efetiva de imobilidade em 50% ( $CE_{50}$ ) utilizando Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS), apresenta ampla variação na literatura, como definido por Rand (1995) em seus estudos, que apontaram variação de  $CE_{50}$  entre 1 e 10  $mg.L^{-1}$  LAS; e os apresentados na OECD SIDS (2005) variando de 0,26 a 55  $mg.L^{-1}$  LAS (FEIJTEL; PLASSCHE, 1995).

Outros autores estudaram a toxicidade do LAS ( $C_{12}$ ) em 48 horas de exposição na espécie *D. magna*, e obtiveram  $CE_{50-48h}$  entre 4,4 a 8,1  $mg.L^{-1}$  (HERA, 2013; HODGES et al., 2006; VERGE et al., 2001), o que permite inferir que o resultado de  $CE_{50}$  obtido, nessa pesquisa, está entre os valores encontrados na literatura.

#### 6.2.1.4 Impacto à biota aquática

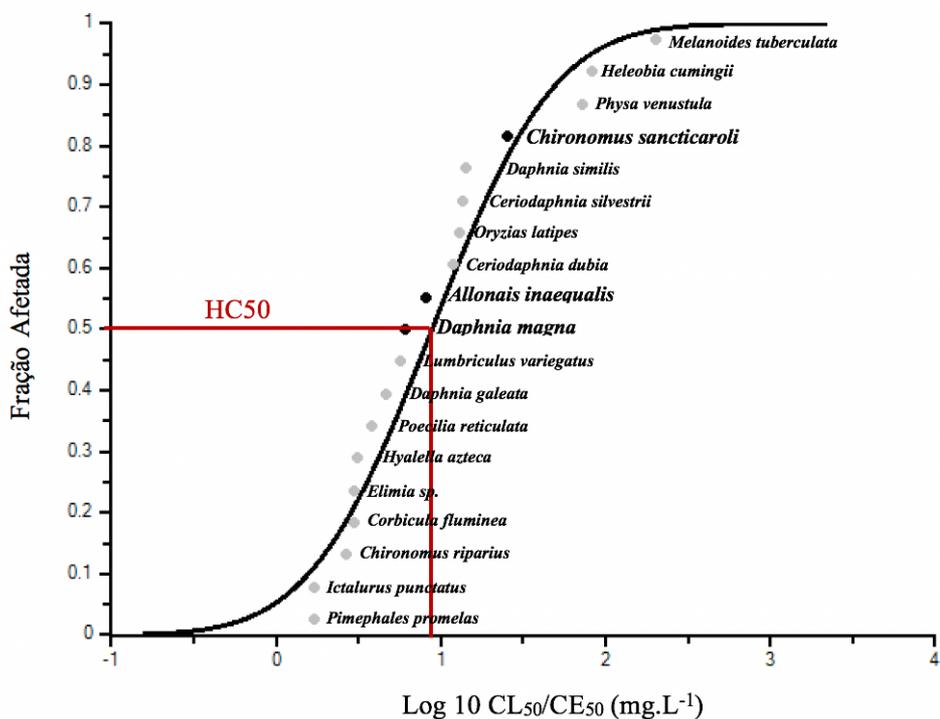
Muitos estudos a respeito da ação dos tensoativos sobre o meio ambiente aquático vêm sendo realizados nos últimos 50 anos, e diversos efeitos tóxicos à biota foram relatados (ABEL, 1974; BARBIERI, 2008; DA SILVA COELHO; ROCHA, 2010; LEWIS, 1992; SWEDMARK et al., 1971). Para Lewis (1990), as proteínas constituintes das membranas celulares se ligam às moléculas dos surfactantes, que podem ser feitas pela ocorrência da desnaturação das células, levando à lise celular, causando a permeabilidade da membrana. Esse processo pode aumentar a vulnerabilidade dos organismos aquáticos, por facilitar a entrada de outras substâncias presentes no meio.

Do mesmo modo, sabe-se que a toxicidade do LAS em ambientes aquáticos é dependente do homólogo ou isômero avaliado, e que sua toxicidade aumenta com o comprimento da cadeia alquílica (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1996; PRATS et al., 1993). Assim, alterações na estrutura molecular do LAS que ocorrem no ambiente aquático, com biodegradação ou fotodegradação, podem resultar na modificação da toxicidade do LAS. Muitos autores relataram o aumento da toxicidade do LAS com o aumento da cadeia alquílica para os *D. magna*, como faixa de CE<sub>50</sub> de 13,90 a 29,50 mg.L<sup>-1</sup>, de 4,40 a 8,00 mg.L<sup>-1</sup> e de 0,68 a 1,22 mg.L<sup>-1</sup> para LAS de cadeia alquílica de 10 carbonos (C<sub>10</sub>), 12 carbonos (C<sub>12</sub>) e 14 carbonos (C<sub>14</sub>), respectivamente (HODGES et al., 2006; MAKI; BISHOP, 1979; VERGE et al., 2001).

Outros autores, como Maki e Bishop (1979), observaram que as características físicas da água, como a dureza, podem alterar a sensibilidade dos organismos ao LAS. Lewis (1992) estudou o efeito dos surfactantes, entre eles o LAS, no qual observou que o aumento da dureza e da temperatura da água pode elevar a toxicidade dos surfactantes aniônicos na biota. Oya et al. (2007) realizaram testes de toxicidade aguda com *D. magna* utilizando 7 tipos de surfactantes e 3 detergentes, e ainda avaliaram os efeitos da dureza e da tensão superficial da água, resultando no aumento da toxicidade do LAS com o aumento da dureza da água. A faixa de variação avaliada foi entre 5 e 625 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, o qual aponta que dureza em valores baixos (5 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>) causa menor efeito tóxico, com CE<sub>50</sub> 50 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, já a dureza mais elevada (625 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>) apresentou maior efeito tóxico, CE<sub>50</sub> 5 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>. Pode-se salientar que a faixa de dureza da água, utilizada nesta pesquisa para *D. magna*, é de 175 a 225 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, dessa maneira infere-se que a sensibilidade da *D. magna* ao LAS pode estar relacionada também à dureza da água dos testes.

A partir dos dados CL<sub>50</sub> descritos na literatura, para ensaios de toxicidade aguda com LAS, para as espécies aquáticas (Apêndice F), produziu-se o gráfico de Distribuição de Sensibilidade de Espécie (SSD) (Figura 36).

Figura 36 – Distribuição de Sensibilidade de Espécies - Efeito da Toxicidade Aguda ao LAS.



Fonte: Elaborado pela Autora

Entre as espécies selecionadas nessa pesquisa, pode-se observar que os organismos-teste, consumidores secundários, *D. magna* e *A. inaequalis* são mais sensíveis ao LAS ( $C_{12}$ ), quando comparadas ao *C. sancticaroli* (consumidor terciário). Resultados similares foram apresentados por diversos autores, entre os quais, Cserhádi, Forgács e Oros (2002), que confirmaram que o organismo *D. magna* representa uma das espécies mais sensíveis ao LAS, e o Projeto Hera (2013) e Mäenpää e Kukkonen (2006), inferiram que os insetos são mais resistentes ao LAS quando comparados aos organismos-teste oligoquetos.

A sensibilidade dos organismos aquáticos ao LAS também pode estar relacionada a sua biodisponibilidade no ambiente. Nesse sentido, alguns pesquisadores observaram a capacidade de adsorção desse surfactante ao sedimento (HAMPEL et al., 2012; IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010; PRATS et al., 1993; YING, 2006), e outros pesquisadores observam a diferença da sensibilidade desses organismos-teste, quando exposto ao LAS na presença de sedimento. Casellato e Negrisoló (1989) relatam diferenças a resposta de sensibilidade do LAS na presença de sedimentos em bioensaios de toxicidade

aguda com oligoquetos. Assim como, Mäenpää e Kukkonen (2006) que estudaram o efeito da bioacumulação de surfactantes em testes de toxicidade aguda e crônica com as espécies *Lumbriculus variegatus* e *Chironomus riparius*, concluíram que os organismos-teste apresentaram maior sensibilidade ao LAS na ausência de sedimento, e que o inseto *C. riparius* demonstra ser menos sensível a esse contaminante que a espécie de oligoqueto *L. variegatus*. Pode-se observar, por meio dos resultados do presente estudo, que o oligoqueto utilizado nessa pesquisa também se mostra mais sensível ao LAS quando comparado ao *Chironomus*. Assim, a maior resistência ao LAS pela espécie *C. sancticaroli* pode estar relacionada à utilização de 50g de sedimento em seus bioensaios de toxicidade, que pode ter influenciado na biodisponibilidade do surfactante a esse organismo.

As diferenças de sensibilidade dos organismos-teste ao LAS utilizados nessa pesquisa, bem como os reportados na literatura, devem estar relacionadas às características fisiológicas de cada espécie, como seu estado nutricional e estágio de ciclo de vida, assim como, às condições de cultivo desses organismos, aclimatação, alimentação, temperatura, fotoperíodo e dureza da água, e ainda podem estar relacionadas às propriedades da substância testada, no caso do LAS sua cadeia alquílica, com diferentes homólogos e isômeros, além da degradabilidade, e pureza dessa substância (COWGILL, 1987; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1996; PRATS et al., 1993; RAND, 1995).

Alguns autores afirmam que a Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD), utilizando diferentes espécies dentro da mesma comunidade, podem responder de formas diferentes, dependendo de suas características fisiológicas e ecológicas, ao mesmo contaminante, entretanto, auxilia na estimativa de riscos a toxicidade dos contaminantes na comunidade aquática (LARRAS et al., 2012; SWARTJES et al., 2012).

E mesmo com as peculiaridades de cada espécie, os gráficos SSD podem ser utilizados para estimar a concentração perigosa HC (*Hazardous Concentration*) que afeta uma certa proporção de espécies (LARRAS et al., 2012; MALTBY et al., 2005; MALTBY; BROCK; VAN DEN BRINK, 2009). A concentração perigosa que afeta 50% das espécies (HC<sub>50</sub>) (Figura 36) é igual à concentração de efeito de toxicidade aguda a 50% do organismo-teste *D. magna* (CE<sub>50</sub>), calculado nessa pesquisa. Por meio da concentração de HC<sub>50</sub>, infere-se que concentrações em torno de 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de LAS, representa potencial efeito tóxico a 50% dos organismos aquáticos. As concentrações LAS encontradas em

estações de tratamento de esgoto variam 1 a 18 mg.L<sup>-1</sup> (GRANATTO et al., 2019; MUNGRAY; KUMAR, 2009), desta forma a concentração perigosa HC está entre as concentrações encontradas em ambiente real, evidenciando a importância do tratamento dos surfactantes como o LAS.

A investigação dos efeitos crônicos do LAS aos organismos aquáticos, torna-se indispensável, principalmente os nativos, por apresentaram relatos escassos na literatura. Por se tratar de teste com maior tempo de exposição ao contaminante e abordar a maior parte do ciclo de vida dos organismos, pode-se determinar as concentrações que não causam mortalidade (CENO) a essas espécies, simulando o efeito da entrada desse surfactante continuamente no ambiente aquático natural.

## 6.2.2 Teste de Toxicidade Crônica com LAS padrão

Os testes de toxicidade crônica foram realizados com intuito de responder sobre o desenvolvimento e reprodução dos organismos-teste selecionados quando exposto ao LAS (C<sub>12</sub>) por períodos mais longos, além das análises de letalidade, nas quais foram utilizados gráficos Boxplot e agrupamento hierárquico de “Cluster” com similaridade de Bray-curtis, para determinar as semelhanças dessas repostas entre as concentrações de LAS e o controle.

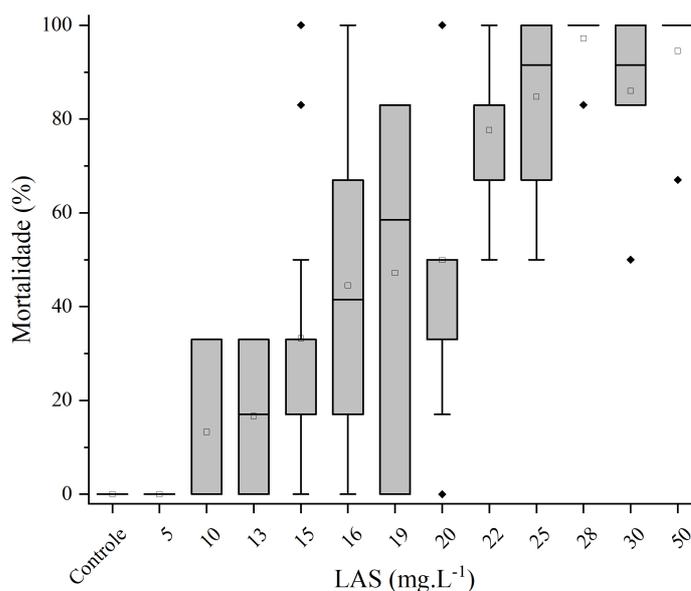
As análises de pH e de condutividade elétrica foram medidas no início, durante e no final dos bioensaios de toxicidade crônica, entretanto, não apresentaram elevadas variações em suas amplitudes, o que permite inferir que tanto o pH quanto a condutividade elétrica não influenciaram na mortalidade das espécies testadas. Nos bioensaios utilizando *C. sancticaroli*, a variação de pH e condutividade elétrica para as soluções-teste e solução-controle, foram de 6,8 a 7,3; 11 a 24  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Valores semelhantes foram encontrados para a espécie *A. inaequalis*, em pH 7,0 a 7,5 e condutividade elétrica de 10 a 21  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Para o organismo-teste *D. magna*, a amplitude de variação do pH foi de 7,6 a 8,0 e de condutividade elétrica entre 430 a 497  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , tanto para os testes controles quanto para as soluções-teste.

### 6.2.2.1 *Chironomus sancticaroli*

Os bioensaios de toxicidade crônica utilizando a espécie *C. sancticaroli* foram realizados em períodos de 10 dias, e iniciou-se com a exposição desse inseto em fase larval de I instar, a partir de 24 horas após eclosão da desova. Por meio do gráfico Boxplot (Figura 37), pode-se observar que as maiores concentrações utilizadas de LAS (C<sub>12</sub>) (20, 22, 25, 28, 30 e 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) causam letalidade média de 50 a 100%, evidenciando a elevada toxicidade desse contaminante ao organismo *Chironomus*. As concentrações intermediárias (16 e 19  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) apresentam ampla variação em seus efeitos tóxicos, causando mortalidade de 0 a 100 % desse organismo-teste. Como observado na carta-controle de *C. sancticaroli*, os testes com substância de referência KCl apontam variações de sensibilidade dentro da faixa estabelecida, ao longo do período de testes, apontando que a sensibilidade pode ser dependente da sazonalidade climática. Assim, a oscilação das concentrações 16 e 19  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS, pode estar relacionada a essa dependência. As concentrações mais baixas (10, 13 e 15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), causam menor efeito letal nesse organismo, com menos de 35% de

mortalidade. A concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> se assemelha ao controle, não causando efeito tóxico ao inseto.

Figura 37 – Boxplot representando a mortalidade das larvas de *C. sancticaroli* expostas a diferentes concentrações de LAS padrão por 10 dias



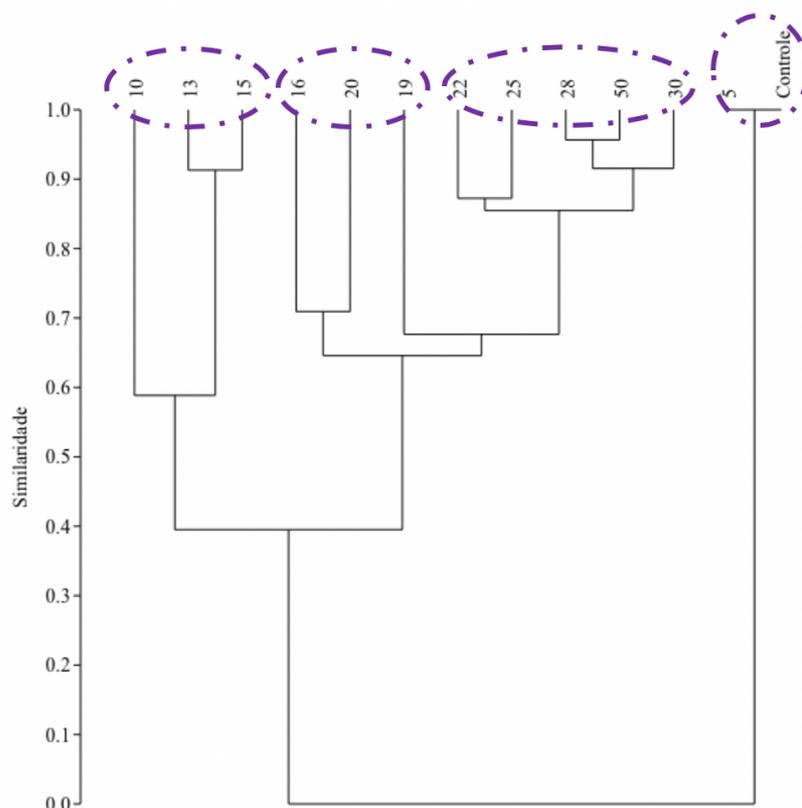
Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (com coeficiente cofenético de 0,98) (Figura 38) evidencia 4 agrupamentos. O primeiro agrupamento inclui o teste controle e a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>, com similaridade de 100%, e divergem das demais concentrações, por não causarem efeitos tóxicos ao *C. sancticaroli*. O segundo agrupamento é composto pelas concentrações mais elevadas (22, 25, 28, 30 e 50 mg.L<sup>-1</sup>), que causam maior letalidade ao *C. sancticaroli*, com semelhança acima de 85%. O terceiro agrupamento, das concentrações 16, 19 e 20 mg.L<sup>-1</sup>, apontam similaridade acima de 60% das concentrações que causam maiores efeitos letais a esse inseto. Já o quarto agrupamento abrange as concentrações mais baixas (10, 13 e 15 mg.L<sup>-1</sup>) que causam menores efeitos tóxicos a essa espécie, com similaridade acima de 60 % entre si e 40% de similaridade dos demais agrupamentos.

Tanto o Boxplot, quanto o agrupamento por similaridade Cluster, evidenciam que a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão não causa efeito tóxico ao *C. sancticaroli*,

podendo ser comparado ao controle, e que o aumento da concentração desse surfactante influencia diretamente na mortalidade desse organismo.

Figura 38 – Análise de Cluster com similaridade do efeito tóxico das concentrações de LAS padrão as larvas de *C. sancticaroli*



Fonte: Elaborado pela Autora

As análises estatísticas foram baseadas em hipóteses, e como a hipótese nula ( $H_0$  - todas as concentrações de LAS padrão, tem o mesmo efeito tóxico no inseto *C. sancticaroli*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais concentrações apresentam comportamentos distintos. O teste de Dunn, demonstra que o teste controle e a concentração de  $5\text{mg.L}^{-1}$  não são diferentes estatisticamente, entretanto, apontam diferença estatística das demais concentrações.

A partir dessa análise estatística, pode-se verificar as concentrações que causam ou não efeito letal e a concentração que causa letalidade a 50% dos indivíduos *C. sancticaroli* (Tabela 12).

Tabela 12 – Concentrações CENO, CEO e CL<sub>50</sub> de LAS padrão para a espécie *C. sancticaroli*.

Teste de Toxicidade Crônica	CENO (mg.L <sup>-1</sup> )	CEO (mg.L <sup>-1</sup> )	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
<i>C. sancticaroli</i>	5,00	10,00	18,00 (17,10 – 18,93)

Fonte: Elaborado pela Autora

As análises descritivas (Boxplot e Cluster) e o teste estatístico de Dunn confirmam que a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão não causa efeito letal aos organismos *C. sancticaroli*, quando expostos a essa concentração por 10 dias. As mesmas análises confirmando que a concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão causa efeito letal, mesmo que em pequena parcela desses organismos. Ainda, pode-se observar que a variação do efeito tóxico também está associada com o tempo de exposição ao contaminante e com a fase do ciclo de vida dos organismos-teste. Em exposição aguda (96 h) com organismos na Fase larval de IV instar, obteve-se CL<sub>50</sub> de 25,25 mg.L<sup>-1</sup>, já com maior tempo de exposição e exposição às fases mais suscetíveis (fase larval de I instar) ao mesmo contaminante essa concentração diminui para CL<sub>50</sub> de 18,00 mg.L<sup>-1</sup>. As larvas de I instar se alimentam de bactérias presentes no sedimento (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1982) facilitando a ingestão de maiores quantidades de LAS biodisponível, justificando letalidade em menores concentrações.

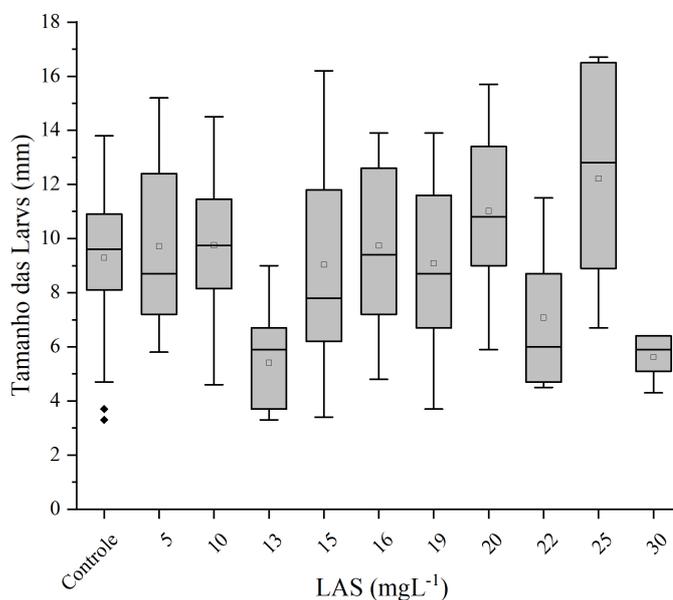
Alguns autores realizaram testes de toxicidade crônica, sem sedimento, com a espécie *C. riparius*, estudando o efeito do LAS (C<sub>11,8</sub>) em 10 dias de exposição, e obtiveram CENO de 2,4 mg.L<sup>-1</sup> (PITTINGER; WOLTERING; MASTERS, 1989). Já Van de Plassech et al. (1999) realizaram testes de toxicidade crônica com duração de 5 dias com LAS (C<sub>11,6</sub>), e observaram CENO 2,8 mg.L<sup>-1</sup>. Por outro lado, Hwang et al. (2003)

observaram a concentração de efeito letal a 50% dos insetos de *C. riparius* expostos por 10 dias ao LAS (C<sub>12</sub>), no qual obtiveram CL<sub>50</sub> 1,3 mg.L<sup>-1</sup>. Esses estudos demonstram que o *C. riparius* é mais sensível ao LAS em exposição crônica, do que o *C. sancticaroli*, utilizado neste estudo.

Por mais que as espécies *C. riparius* e *C. sancticaroli* sejam pertencentes ao mesmo gênero *Chironomus*, cada espécie apresenta uma sensibilidade distinta ao contaminante LAS. Esse resultado indica a necessidade de utilização de espécies nativas em testes de toxicidade, visto que o LAS é um produto comercial muito utilizado mundialmente e seus efeitos tóxicos precisam ser descritos de acordo com o real impacto de cada região (DA SILVA COELHO; ROCHA, 2010; HERA, 2013; LEWIS M. A., 1990; MÄENPÄÄ; KUKKONEN, 2006; PITTINGER; WOLTERING; MASTERS, 1989; VERSTEEG; RAWLINGS, 2003). Como há poucos relatos de espécies de clima tropical, e no caso do inseto *C. sancticaroli*, seus efeitos tóxicos referentes ao LAS são inexistentes, respostas encontradas nesse trabalho são de suma importância ao estudo do impacto ambiental desse surfactante no Brasil.

Além disso, os testes de toxicidade crônica com a espécie *C. sancticaroli* contemplaram quase todo seu ciclo de vida em fase larval (10 dias), permitindo analisar o crescimento das larvas quando em contato com concentrações do LAS (C<sub>12</sub>) (Figura 39). Com relação ao tamanho das larvas, nenhuma diferença foi identificada entre o controle e todas as concentrações de LAS, demonstrando assim que a presença do LAS em longo prazo não interferiu no tamanho dessas larvas. Neste estudo, o tamanho médio das larvas foi em torno de 9,35 mm.

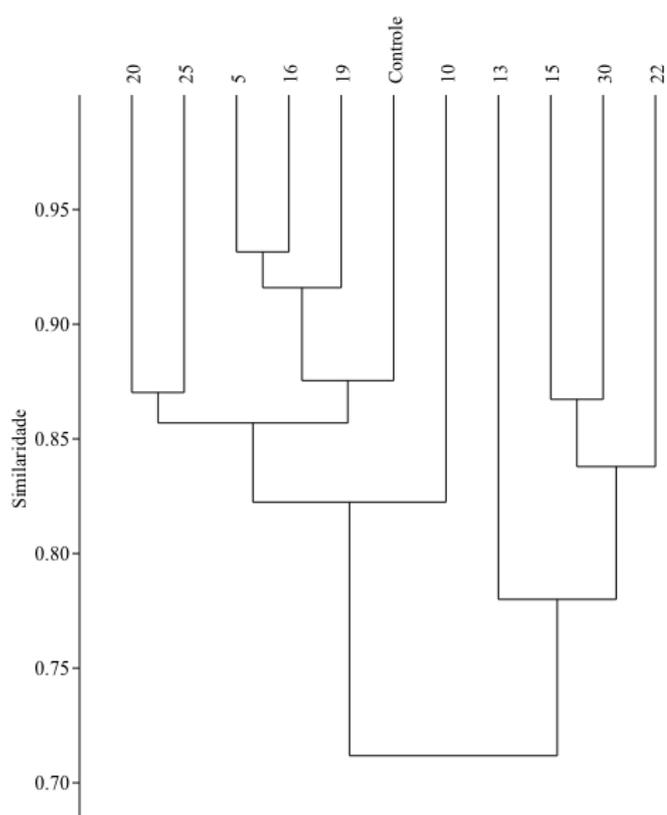
Figura 39 – Boxplot representando o tamanho das larvas (mm) do inseto *C. sancticaroli* em contato com o LAS padrão



Fonte: Elaborado pela Autora

Do mesmo modo que o gráfico Boxplot aponta similaridade entre as concentrações de LAS e o controle, o agrupamento hierárquico de Cluster (coeficiente cofenético de 0,83) (Figura 40) corrobora com similaridade acima de 70% para o tamanho das larvas do *C. sancticaroli* entre as concentrações e o controle, evidenciando que o desenvolvimento das larvas não foi afetado em 10 dias de exposição ao surfactante LAS. Da mesma forma, a análise estatística ANOVA one-way ( $p < 0,05$ ) confirma que não há diferença estatística entre as concentrações e o controle para o tamanho das larvas do *C. sancticaroli*. Entretanto, em concentrações acima de 10 mg.L<sup>-1</sup> de LAS, o número de amostragem para determinar o comprimento médio das larvas diminuiu conforme o aumento das concentrações (mortalidade), e com a baixa representatividade de amostras, não se pode afirmar que o LAS afeta o crescimento da larva desse organismo.

Figura 40 – Análise de Cluster com similaridade entre o tamanho das larvas de *C. sancticaroli* e as concentrações de LAS padrão

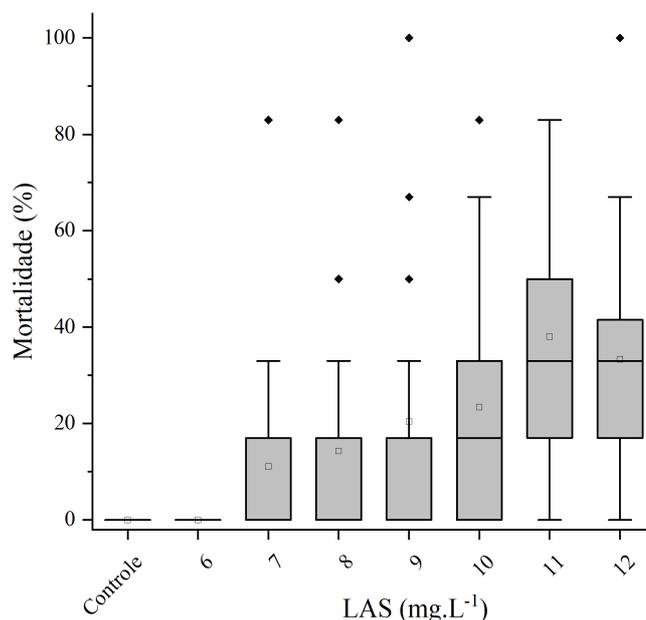


Fonte: Elaborado pela Autora

#### 6.2.2.2 *Allonais inaequalis*

Os resultados obtidos por meio dos testes de toxicidade crônica (10 dias) com a espécie *A. inaequalis* apontam que as concentrações mais elevadas do surfactante (10, 11 e 12 mg.L<sup>-1</sup>) causam maiores efeitos tóxicos a essa espécie, com mortalidade acima de 25%, quando comparadas às concentrações mais baixas (7, 8 e 9 mg.L<sup>-1</sup>), que causam mortalidade entre 10 e 20% de *A. inaequalis* (Figura 41). A concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> de LAS não causa efeito tóxico ao oligoqueto, se assemelhando ao controle.

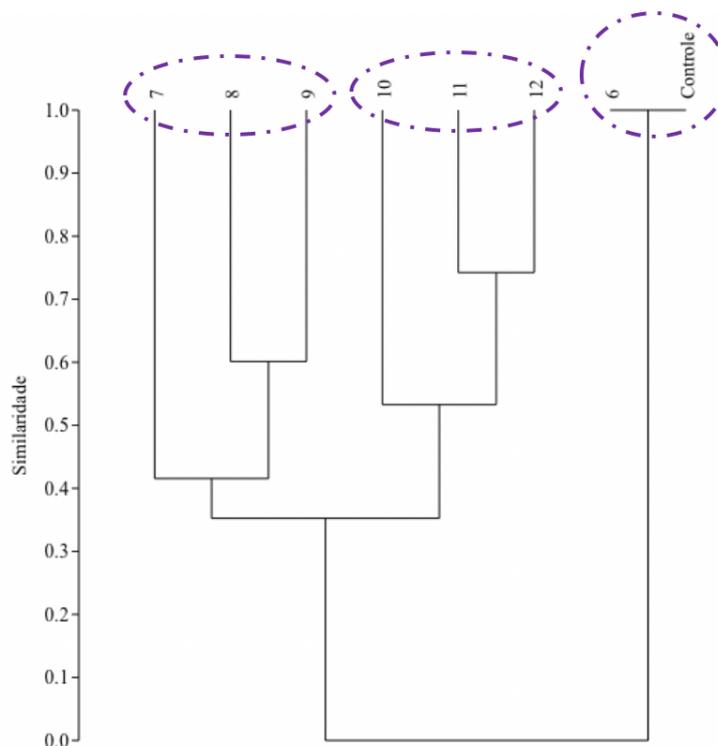
Figura 41 – Boxplot representando a mortalidade dos oligoquetos *A. inaequalis* expostos a diferentes concentrações de LAS padrão por 10 dias



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente de correlação cofenética 0,97) (Figura 42) confirma os resultados obtidos no gráfico Boxplot, apontando 3 agrupamentos. O primeiro agrupamento é composto pelo teste controle e a concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup>, que se assemelham em 100% e se diferenciam das demais concentrações de LAS testadas, provavelmente por não causarem mortalidade a esse organismo. O segundo agrupamento inclui as concentrações mais elevadas (10, 11 e 12 mg.L<sup>-1</sup>), que causam maior letalidade ao *A. inaequalis*, com semelhança acima de 55%. O terceiro agrupamento contempla as concentrações mais baixas (7, 8 e 9 mg.L<sup>-1</sup>) que causam menores efeitos tóxicos a essa espécie, com similaridade acima de 45% entre si e 40% de similaridade do agrupamento das concentrações mais tóxicas.

Figura 42 – Análise de Cluster com similaridade de Bray-Curtis das concentrações de LAS em seu efeito tóxico ao organismo-teste *A. inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

A hipótese nula ( $H_0$  - todas as concentrações de LAS padrão tem o mesmo efeito tóxico no organismo-teste *A. inaequalis*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Assim, aplicou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais concentrações apresentam comportamentos distintos em seus efeitos tóxicos. Por meio do teste de Dunn verificou-se que o teste controle e a concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> não são diferentes estatisticamente. Pode-se inferir que a concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> de LAS não causa efeito tóxico ao *A. inaequalis*.

Após o teste estatístico de Dunn pode-se determinar os CENO e CEO do LAS padrão na espécie *A. inaequalis*, observando-se qual concentração causa efeito tóxico e não tóxico para essa substância. Já a concentração letal a 50% de *A. inaequalis* com o LAS (C<sub>12</sub>) utilizou-se o *software* “R” para análise estatística de CL<sub>50</sub> (Tabela 13).

Tabela 13 – Concentrações CENO, CEO e CL<sub>50</sub> de LAS padrão para o organismo-teste *A. inaequalis*.

Teste de Toxicidade Aguda	CENO (mg.L <sup>-1</sup> )	CEO (mg.L <sup>-1</sup> )	CL <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
<i>A. inaequalis</i>	6,00	7,00	8,51 (7,00 – 10,10)

Fonte: Elaborado pela Autora

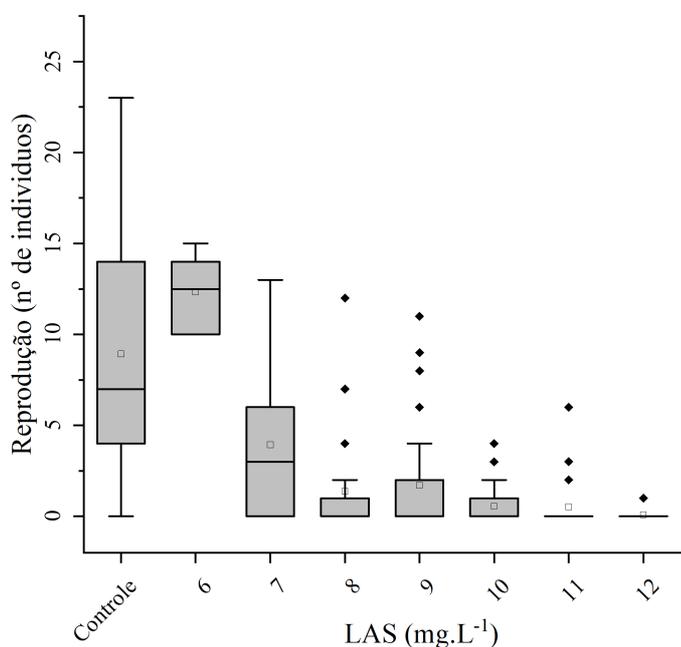
A concentração de efeito não observado (CENO) está evidenciada pelas análises descritivas e corroborada pelo teste estatístico de Dunn, no qual denota-se que a concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> e o controle, não causam efeitos tóxicos ao oligoqueto, e a partir da concentração de 7 mg.L<sup>-1</sup> esses efeitos já podem ser observados. Casellato e Negrisola (1989) realizaram testes de toxicidade aguda e crônica, nos oligoquetos *B. sowerlyi* e *L. hoffmeisteri*, utilizando surfactante LAS, e obtiveram resultado de CENO 1,00 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. A partir dos resultados encontrados nesta pesquisa, pode-se inferir que os oligoquetos *A. inaequalis* apresentam menor sensibilidade às concentrações de LAS comparados a outros oligoquetos descritos na literatura. Vale ressaltar que pouco se sabe a respeito da fisiologia da espécie *A. inaequalis*, dificultando a compreensão de suas respostas a sensibilidade às substâncias tóxicas, como é o caso do surfactante LAS, cujo efeito tóxico em testes de toxicidade aguda (CL<sub>50-96h</sub>) apresentam valores semelhantes ao CL<sub>50</sub> dos testes de toxicidade crônica.

Os testes de toxicidade crônica com *A. inaequalis* também proporcionaram o estudo do seu desenvolvimento, por meio da reprodução. Ao analisar a Figura 43, é possível observar que nas concentrações mais elevadas (11 e 12 mg.L<sup>-1</sup>), a presença de LAS interferiu na reprodução desse organismo-teste, não possibilitando a observação de reprodução de descendentes no experimento. Nas concentrações 7, 8, 9 e 10 mg.L<sup>-1</sup>, *A. inaequalis* conseguiram se reproduzir em média de 2 organismos por concentração, entretanto, essa baixa reprodução de descendentes pode ser indício de efeitos tóxicos nessas concentrações.

Casellato e Negrisola (1989), realizaram estudo ecotoxicológico de toxicidade crônica com o surfactante LAS para verificar os efeitos dessa substância na reprodução de dois oligoquetos (*B. sowerlyi* e *L. hoffmeisteri*). Esses autores observaram que o LAS

dissolvido na água influenciou no comportamento reprodutivo desses organismos, e notaram que a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> de LAS acelerou a ovopostura desses oligoquetos, quando comparados ao controle. Resultados semelhantes foram observados nesta pesquisa, se compararmos as médias de reprodução do controle com a da concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 43), nota-se que o LAS alterou a reprodução do organismo-teste *A. inaequalis* (se reproduziu em menor tempo).

Figura 43 – Boxplot representando a reprodução do organismo-teste *A. inaequalis* em exposição ao LAS padrão por 10 dias

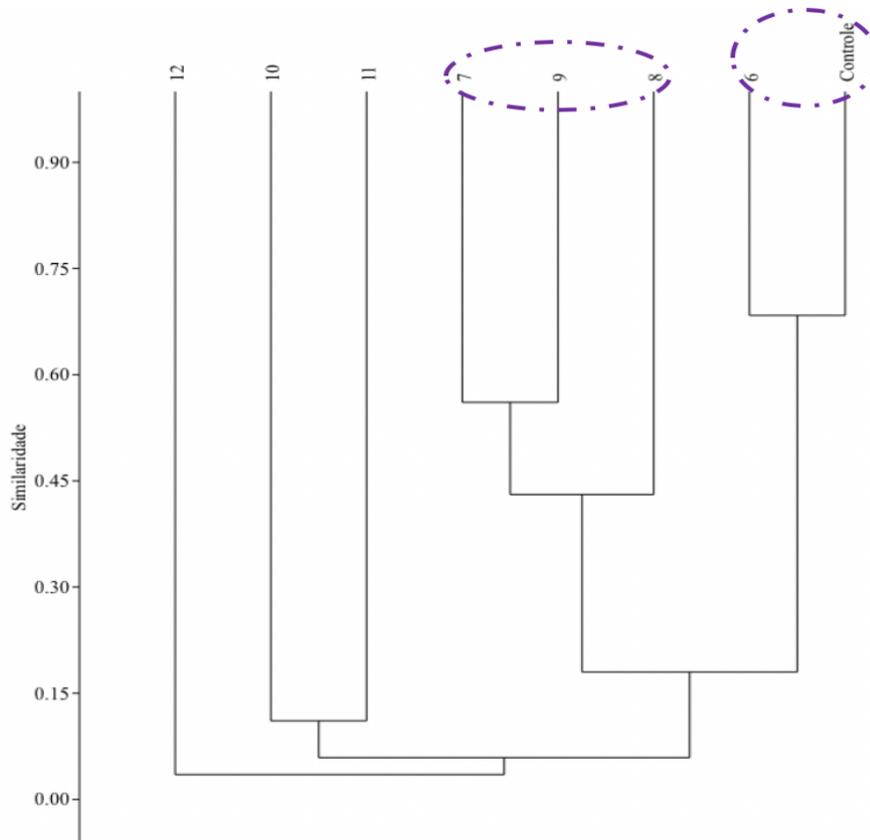


Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster apresenta coeficiente de correlação cofenética de 0,85 (Figura 44) e aponta similaridade entre as concentrações 7, 8 e 9 mg.L<sup>-1</sup> próxima a 45%. As concentrações mais elevadas (10, 11 e 12 mg.L<sup>-1</sup>) não apresentaram similaridades entre si, ou seja, o efeito tóxico do LAS nessas concentrações afeta de formas diferentes a reprodução dos *A. inaequalis*. Apesar de a média de reprodução do *A. inaequalis* ter sido maior na concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> de LAS, quando comparada ao controle, o agrupamento entre essas duas condições apresentam 65% de similaridade. Esse resultado pode ser

explicado pela grande variabilidade dos dados do controle, o qual apresentou de 0 a 24 organismos no final do teste.

Figura 44 – Análise de Cluster com similaridade entre as concentrações LAS padrão e a reprodução da espécie *A. inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

As análises descritivas (Boxplot e Cluster) foram confirmadas por meio da análise estatística ANOVA *one-way* ( $p < 0,05$ ) com teste *posteriori* de Tukey, evidenciando que o teste controle e a concentração de  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  não são diferentes estatisticamente. As demais concentrações apresentam diferença estatística entre si e ao controle.

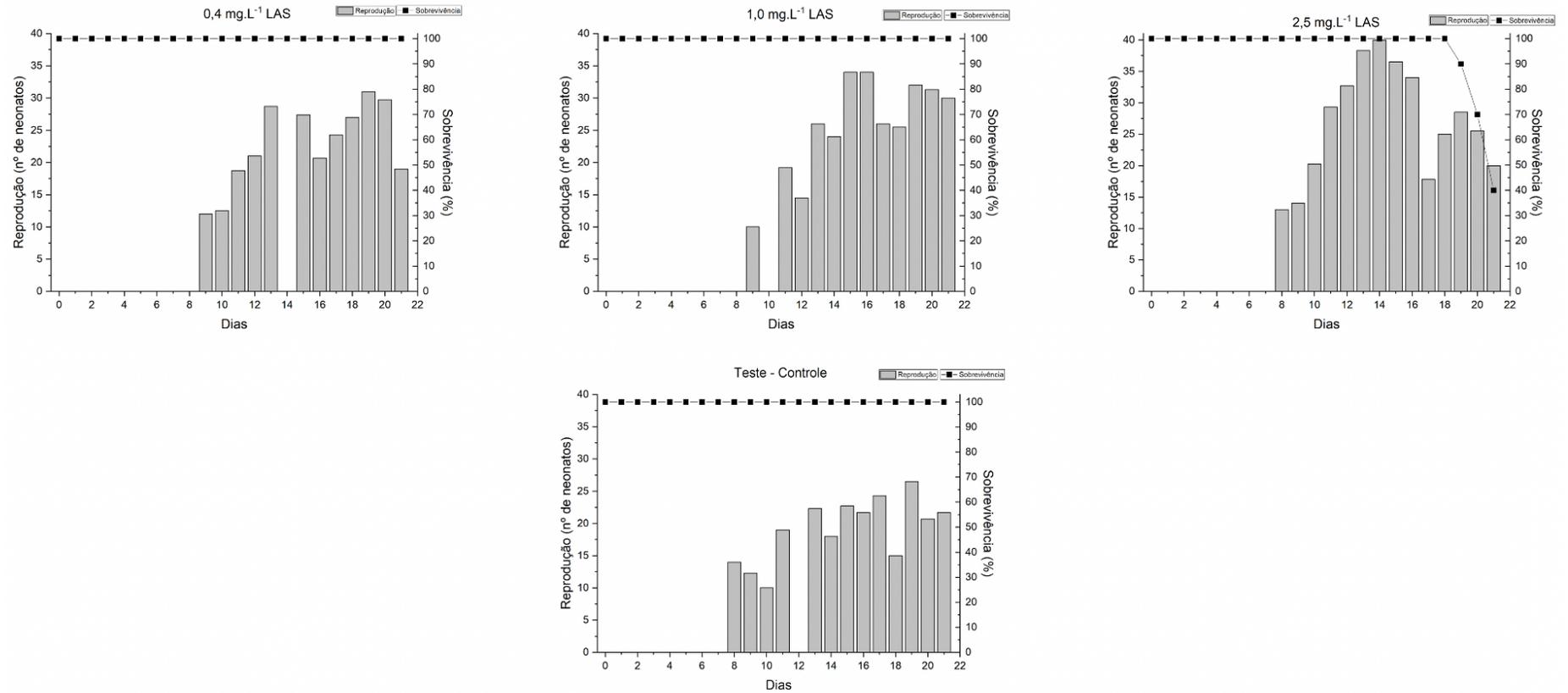
### 6.2.2.3 *Daphnia magna*

Os bioensaios de toxicidade crônica foram realizados com LAS padrão em concentrações letais e sub-letais para o organismo-teste *D. magna*, a duração desses testes foi de 21 dias, contemplado maior parte do ciclo de vida desse organismo. Os resultados dos testes de toxicidade crônica foram analisados individualmente, dia a dia, no qual, pode-se observar a sobrevivência e o comportamento reprodutivo dessa espécie em exposição ao LAS (Figuras 45 e 46).

No teste controle e na maioria das concentrações sub-letais do LAS (C<sub>12</sub>), não foram observadas mortalidade dos organismos-teste *D. magna*, apenas a concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> resultou em mortalidade do 18º ao 21º dia do teste com sobrevivência de apenas 40% dos organismos (Figura 45). A partir desses resultados, pode-se inferir que, mesmo em concentrações sub-letais descritas na literatura, o LAS apresenta toxicidade crônica ao organismo-teste.

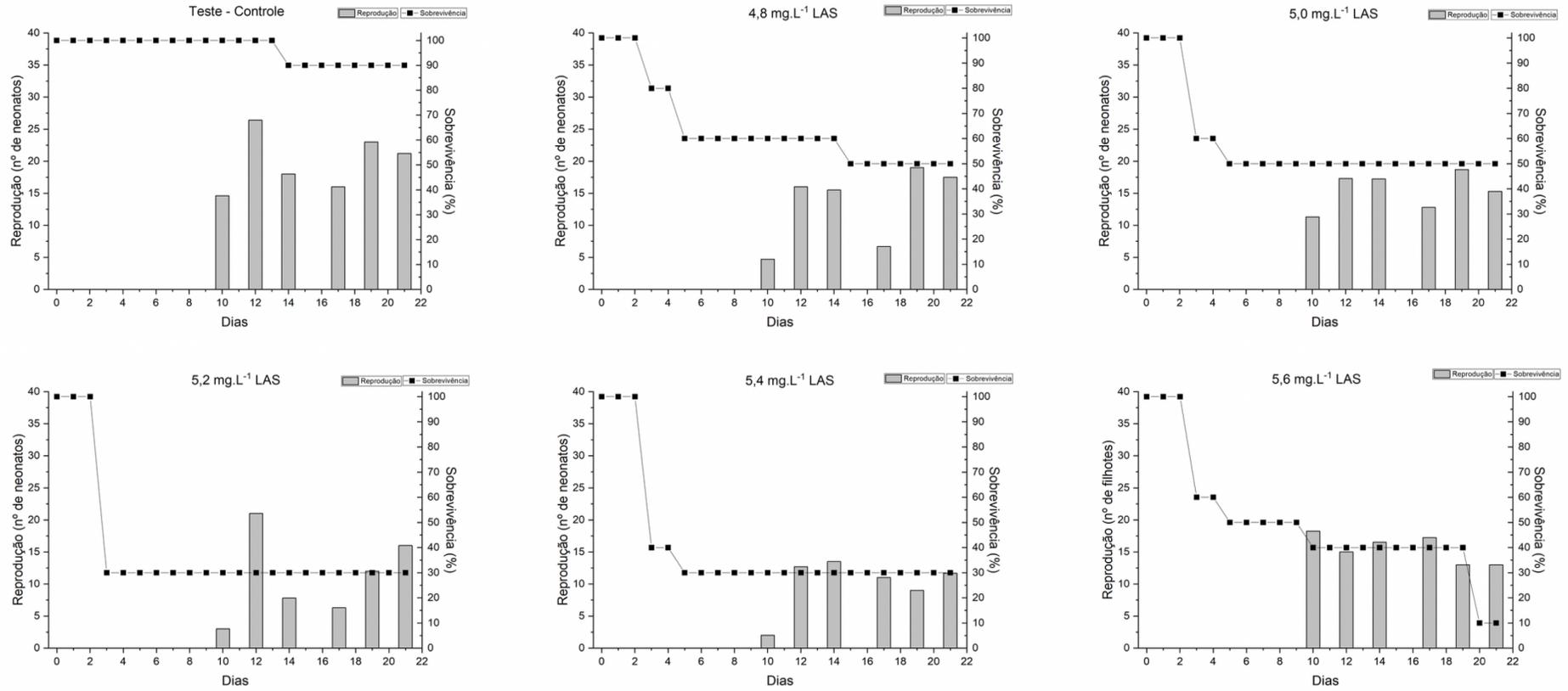
Na Figura 46, observa-se que o LAS, em concentrações mais elevadas, causa maior efeito tóxico para a espécie *D. magna*. A partir das concentrações de 5,0; 5,2 e 5,4 mg.L<sup>-1</sup> de LAS padrão, pode-se observar que a resposta de mortalidade dos *D. magna* não aponta variação após o 4º dia de teste, com sobrevivência entre 30 e 50% dos organismos. Já para as concentrações 4,8 e 5,6 mg.L<sup>-1</sup>, apresentam mortalidade para essa espécie ao longo de todo o teste. A concentração de 5,6 mg.L<sup>-1</sup> aponta maior efeito tóxico ao *D. magna*, nos últimos 3 dias de testes, demonstrando a importância de teste mais longos (21 dias).

Figura 45 – Efeitos do LAS (C<sub>12</sub>) em concentrações sub-letais na mortalidade e na reprodução do organismo-teste *D. magna*



Fonte: Elaborado pela Autora

Figura 46 – Efeitos do LAS (C<sub>12</sub>) em concentrações letais na mortalidade e na reprodução do organismo-teste *D. magna*



Fonte: Elaborado pela Autora

A hipótese nula ( $H_0$  - todas as concentrações de LAS padrão tem o mesmo efeito tóxico no microcrustáceo *D. magna*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), desta forma, utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn. Esse teste estatístico demonstra que as concentrações 0,4 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não são diferentes estatisticamente do controle.

A partir dos testes estatísticos pode-se determinar os CENO e CEO do LAS padrão na espécie *D. magna*, e o efeito de imobilidade a 50% desse organismos-teste, calculando-se o CE<sub>50</sub> (Tabela 14).

Tabela 14 – Concentrações CENO, CEO e CE<sub>50</sub> de LAS padrão para os organismos- teste *D. magna*

<b>Teste de Toxicidade</b>	<b>CENO</b>	<b>CEO</b>	<b>CE<sub>50-21dias</sub></b>
<b>Crônica</b>	<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>
<b><i>D. magna</i></b>	1,00	2,50	3,21 (1,94 – 4,48)

Fonte: Elaborado pela Autora

A concentração de efeito não observado (CENO), está evidenciada pelas análises descritivas e corroborada pelo teste estatístico de Dunn, no qual denota-se que a concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de LAS, não causa mortalidade nesse microcrustáceo, e a partir da concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de LAS esses efeitos já podem ser observados (CEO).

A concentração de efeito de imobilidade a 50% dos organismos (CE<sub>50</sub>), para o teste de toxicidade crônica, demonstra ser a metade do valor encontrado para o teste de toxicidade aguda com esse mesmo organismo, evidenciando a elevada toxicidade do LAS em exposição prolongada. A diferença entre as CE<sub>50</sub> dos testes de toxicidade aguda e crônica, encontrados nesta pesquisa, pode estar relacionada ao fator da biodisponibilidade desse surfactante no meio aquático (tempo de exposição), e pelo fato da *D. magna* ser um organismo-teste de hábito planctônico filtrador, a toxicidade pode também estar vinculada a sua alimentação (COMOTTO; KIMERLE; SWISHER, 1979; TAYLOR, 1985), em testes de toxicidade crônica foram fornecidos alimentos a esse organismo-teste.

Baixas concentrações de LAS ( $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), podem causar efeitos negativos para muitos invertebrados quando ocorrem prolongadas exposições (efeitos crônicos) (LEWIS, 1991). No entanto, poucos trabalhos avaliaram a exposição crônica do LAS nos organismos *D. magna*. Entre os dados disponíveis, Taylor (1985) realizou testes de toxicidade crônica utilizando LAS ( $C_{11,8}$ ) para o microcrustáceo *D. magna* em diferentes condições de alimentação, e obteve  $CE_{50-21\text{dias}}$  de 2,2 a  $4,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , e concentração de efeito não observado (CENO) de 1,7 a  $3,4 \text{ mg.L}^{-1}$ , enquanto Kimerle (1989) realizou testes de toxicidade crônica com *D. magna* variando os homólogos de LAS  $C_{10}$  e  $C_{14}$ , e observou CENO de 9,8 e  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se inferir que as CENO e  $CE_{50}$  estão nas mesmas faixas de concentrações encontradas na literatura para esta mesma espécie.

As mudanças ambientais podem causar efeitos aos Daphnidae em níveis populacionais, destacando-se a importância de estudar os efeitos de crescimento e reprodução do indivíduo (BRUIJNING; TEN BERGE; JONGEJANS, 2018; TANAKA et al., 2018). Desta forma, analisou-se a capacidade reprodutiva da espécie *D. magna* exposta ao LAS por 21 dias, em que o teste controle resultou na somatória de 70 neonatos por mãe, para todos os testes de toxicidade crônica (Figuras 45 e 46). Para as concentrações letais, o número médio de filhotes diminuiu conforme ocorreu o aumento da concentração do surfactante, e as concentrações 4,8; 5,0; 5,2 e  $5,4 \text{ mg.L}^{-1}$  reproduziram em média 30; 29; 21 e 13 neonatos, respectivamente. Com exceção da concentração mais elevada ( $5,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), no qual a reprodução média durante os 21 dias de teste aumentou, para 26 neonatos. Já para as concentrações sub-letais (0,4; 1,0 e  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) nota-se aumento na reprodução média, de 89, 86 e 96 neonatos, respectivamente. Por meio dos resultados obtidos com as concentrações sub-letais, pode-se inferir que o LAS padrão, por ser um disruptor endócrino (HARRIS et al., 2009; MATSUNAGA et al., 2003) alterou o desempenho reprodutivo dessa espécie, crescendo mais rápido.

A análise de reprodução do gênero *Daphnia* em contato com o contaminante LAS, é pouco descrito na literatura, e entre os trabalhos está de Canton e Sloof (1982), que analisaram diferentes homólogos de LAS e encontraram  $CE_{50}$  acima de  $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$  na reprodução de *D. magna*, e  $CE_{50}$  de  $18,0 \text{ mg.L}^{-1}$  para sua mortalidade. Tanaka e Nakanishi (2001), descobriram que a taxa de crescimento populacional de *Daphnia galeata*, exposta a  $2,50 \text{ mg.L}^{-1}$  de LAS, diminuiu em 50%. Pode-se observar por meio dos resultados

encontrados neste estudo, que as concentrações que causam efeitos à reprodução dos descendentes da espécie *D. magna* não se assemelham com as concentrações descritas na literatura para essa espécie.

A partir dos resultados encontrados nessa pesquisa, pode-se inferir que concentrações menores (0,4, 1,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>) podem afetar o ciclo de vida de *D. magna*, com o aumento da produção de descendentes. Distintamente, as concentrações mais altas (4,8; 5,0; 5,2; 5,4 e 5,6 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram redução na reprodução de filhotes.

Ecologicamente, a presença de um produto químico pode afetar tanto a quantidade quanto a qualidade da prole produzida de *Daphnia* (CAMPOS et al., 2016). As diferenças na produção de filhotes podem estar relacionadas não apenas ao tipo de contaminante, mas também na concentração química do mesmo. Além disso, o efeito do aumento do número de filhotes nas concentrações sub-letais, ocasiona alterações no ciclo de vida do *D. magna*. A alteração na estratégia de vida por interação intraespecífica pode impactar a dinâmica dos ecossistemas aquáticos produzindo efeito negativo sobre a população (CLEUVERS; GOSER; RATTE, 1997; GOSER; RATTE, 1994; PREUSS et al., 2009). Os efeitos dos poluentes em níveis de população, está relacionado ao crescimento populacional e a taxa intrínseca de aumento natural, resultando no efeito tóxico do poluente, como, por exemplo, a capacidade de incremento populacional (ALLAN; DANIELS, 1982; DANIELS; ALLAN, 1981). Nesse sentido, o efeito da reprodução de descendentes de *D. magna*, tanto para as concentrações sub-letais, quanto para as letais de LAS, podem ocasionar efeitos negativos sobre o meio ambiente aquático.

#### 6.2.2.4 Impacto à biota aquática

Ao analisar os resultados de CL<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub> dos testes de toxicidade crônica para os 3 organismos-teste utilizados nessa pesquisa, pode-se inferir que a espécie *D. magna*, seguida da espécie *A. inaequalis* são mais sensíveis ao LAS padrão que a espécie *C. sancticaroli*. Esse resultado pode estar associado a diversos fatores isolados ou combinados, como: a biodisponibilidade do contaminante e hábitos de vida de cada espécie, como por exemplo: a espécie *A. inaequalis* pode viver tanto na coluna d'água quanto no sedimento (ERSÉUS et al., 2017; VERDONSCHOT; SMIES; SEPERS, 1982), e o microcrustáceo *D. magna* realiza suas atividades na coluna d'água, por possuir hábito planctônico filtrador

(KOIVISTO, 1995), podendo tornar esses organismos mais susceptíveis aos contaminantes, por estarem mais biodisponíveis na coluna d'água.

Já o inseto *C. sancticaroli*, por possuir hábito bentônico, e colonizar diversos tipos de substratos no fundo dos ecossistemas aquáticos (areia, cascalho, entre outros), somado a produção de casulos e alimentação (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1982), pode proporcionar maior resistência ao LAS quando comparados a outras espécies.

Mäenpää e Kukkonen (2006) realizaram testes de toxicidade com LAS utilizando a espécie *C. riparius*, no qual enriqueceram sedimentos com LAS (C<sub>12</sub>), e observaram que em maiores concentrações de LAS, há redução da sobrevivência desse inseto, entretanto observaram diminuição da mortalidade quando essas larvas eram alimentadas com Tetramin® no início dos testes. As larvas alimentadas com Tetramin® podem ter iniciado o crescimento mais cedo e, conseqüentemente, se desenvolvido mais rapidamente. Nos testes de toxicidade aguda e crônica com LAS padrão, realizados nesta pesquisa, os organismos-teste *C. sancticaroli* foram alimentados com 5 mL (5g.L<sup>-1</sup> de Tetramin®), tal forma permite inferir que a alimentação fornecida pode ter influenciado no desenvolvimento das larvas e assim diminuindo sua sensibilidade ao surfactante.

Outra maneira de avaliar os resultados dos testes de toxicidade crônica em exposição ao LAS, para os 3 organismos-testes utilizados nesta pesquisa, é por meio da análise das concentrações que não causam efeitos tóxicos observados para os organismos-teste. Os valores de CENO disponíveis na literatura, bem como os observados neste trabalho, para o surfactante LAS, estão apresentados na Tabela 15.

A partir das concentrações de CENO são definidos os níveis máximos admissíveis em corpo hídricos, regulamentados por legislações vigentes ou adotados por diversas agências ambientais reguladoras. Como é o caso da OECD, que determina a faixa de CENO entre 0,25 a 6,10 mg.L<sup>-1</sup> LAS, para os organismos de água doce (OECD SIDS, 2005).

Van de Plassche et al. (1999) propuseram utilizar outro parâmetro para minimizar o risco ambiental, concentrações previstas sem efeito (PNEC), que deve ser igual ou menor ao valor de CENO para as espécies mais suscetíveis, no ambiente. Esses autores indicam um valor de PNEC igual a 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de LAS (C<sub>11,6</sub>) para organismos de água doce. Mesmo valor foi descrito pelo Projeto Europeu HERA (2013), o qual realiza a avaliação de risco para a indústria de produtos de limpeza e fornece informações de segurança avaliadas

sobre os ingredientes usados nesses produtos. A partir dos valores de  $CL_{50}/CE_{50}$  e CENO, determinados neste estudo e as concentrações de CENO estabelecidos pela literatura (Tabela 15), pode-se inferir que o valor PNEC sugerido de  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  é adequado para a proteção da biota aquática.

O relatório de 2018 da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) verificou efeitos adversos à vida aquática em 24 de 364 amostras, classificados como ruins/péssimos. Neste mesmo relatório, foi descrito que entre as substâncias que causam efeitos tóxicos, o surfactante LAS influenciou em 82% das amostras analisadas (CETESB, 2018). Esses resultados podem ser comprovados considerando a principal forma de poluição dos cursos d'água por surfactantes aniônicos que ocorrem por meio dos efluentes urbanos e industriais não tratados. Dessa forma, ressalta-se a importância do tratamento dos surfactantes, principalmente o LAS, por ser o tensoativo mais consumido no Brasil e no mundo (PENTEADO; EL SEOUD; CARVALHO, 2006; SILVA et al., 2017).

Dada a crescente preocupação sobre a presença de LAS no meio ambiente, e nas estações de tratamento de águas residuárias, esse estudo propôs a investigação dos efeitos tóxicos de amostras complexas, como água residuária de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico, contendo LAS, afim de verificar a diminuição dos efeitos negativos na biota aquática, após tratamento em reator de leito fluidificado (Hipótese B).

Tabela 15 – Concentrações de LAS que não causam efeito observado (CENO) em diferentes espécies da biota aquática

<b>Organismos-teste</b>	<b>CENO (mg.L<sup>-1</sup>LAS)</b>	<b>Homólogos LAS</b>	<b>Referências</b>
<b>Microalga</b>			
<i>Chlorella kessleri</i>	3,50	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	7,70	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)
<i>Selenastrum</i> sp.	3,80	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)
<b>Crustáceo</b>			
<i>Daphnia magna</i>	1,00	C <sub>12</sub>	Presente Estudo
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	1,00	C <sub>12</sub>	Da Silva Coelho e Rocha (2010)
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	2,50	C <sub>12</sub>	Da Silva Coelho e Rocha (2010)
<i>Daphnia galeata</i>	2,50	C <sub>12</sub>	Tanaka e Nakanishi (2001)
<b>Oligoqueto</b>			
<i>Allonais inaequalis</i>	6,00	C <sub>12</sub>	Presente Estudo
<i>Branchiura sowerlyi</i>	1,00	C <sub>12</sub>	Casellato e Negrisolo (1989)
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	0,25	C <sub>12</sub>	Casellato e Negrisolo (1989)
<b>Inseto</b>			
<i>Chironomus sancticaroli</i>	5,00	C <sub>12</sub>	Presente Estudo
<i>Chironomus riparius</i>	2,40	C <sub>11.8</sub>	Pittinger et al. (1989)
<b>Peixe</b>			
<i>Poecilia reticulata</i>	3,20	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,34	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)
<i>Tilapia mossambica</i>	0,25	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)
<i>Brachydanio rerio</i>	2,30	C <sub>11.6</sub>	Van de Plassche et al. (1999)

Fonte: Adaptado de Da Silva Coelho e Rocha (2010)

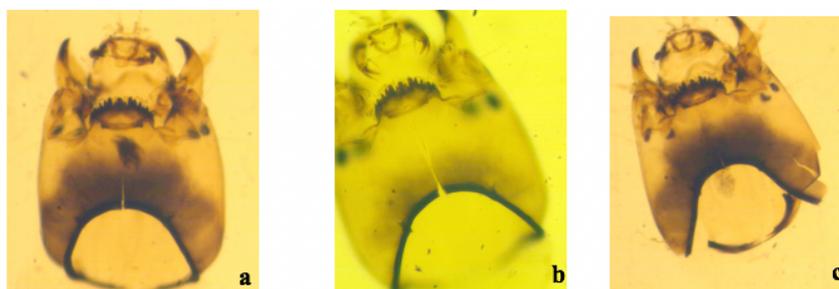
### 6.2.3 Teste de Toxicidade Crônica de Longa Duração – Teste de Gerações

O inseto *C. sancticaroli*, demonstrou ser o organismo-teste mais tolerante ao LAS que os demais organismos utilizados nessa pesquisa tanto para os testes de toxicidade aguda quanto crônica, dessa forma foi realizada uma investigação mais detalhada dos efeitos desse contaminante, a longo prazo, nas futuras gerações dessa espécie.

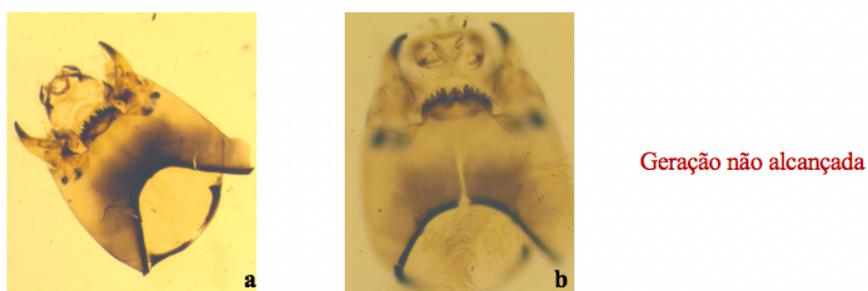
Apesar da ampla utilização da espécie em ensaios laboratoriais, ainda há carência na literatura de métodos para o desenvolvimento de ensaios mais longos (ensaios de longa duração), que buscam analisar outras medidas de toxicidade na espécie, especialmente os estudos que avaliam diferentes gerações. Dessa maneira, a nova metodologia proposta, evidencia diferentes resultados da toxicidade do LAS padrão quando comparada ao teste de toxicidade crônica clássico (testes de 10 dias) comumente utilizado em testes ecotoxicológicos (DI VEROLI et al., 2014; DORNFELD et al., 2006, 2019; FONSECA, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004a; NOVELLI et al., 2012; PRINTES; FERNANDES; ESPÍNDOLA, 2011; REBECHI; NAVARRO-SILVA, 2012; RICHARDI et al., 2013). E o uso de deformidades morfológicas em larvas de Chironomidae, na avaliação da qualidade ambiental, é quase inexistente e pouco registrado na literatura (BIASI; RESTELLO, 2010; CALLISTO; MARQUES; BARBOSA, 2000; KUHLMANN; HAYASHIDA; ARAÚJO, 2000).

Com o teste de toxicidade crônica de longa duração foram analisados, em média, 20 mentos por concentração e para o controle, para todas as gerações (Figura 47) e em nenhuma concentração de LAS foi identificada deformidade aparente nos dentes do mento das larvas dos *C. sancticaroli*. Com os resultados obtidos pode-se inferir que o surfactante LAS (C<sub>12</sub>) não é tóxico a ponto de modificar a dentição desse inseto, mesmo quando exposto continuamente a esse contaminante.

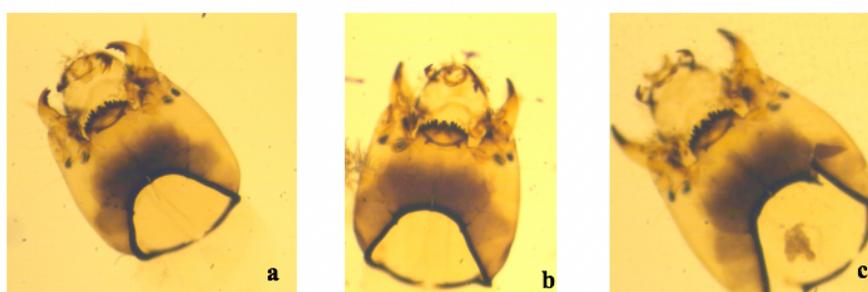
Figura 47 - Análise do mento das larvas dos *C. sancticaroli*; a) I geração b) II geração c) III geração



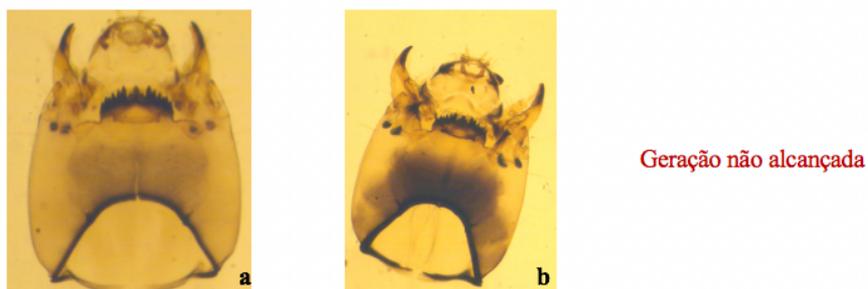
Teste Controle



Concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup>



Concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup>



Concentração de 15 mg.L<sup>-1</sup>

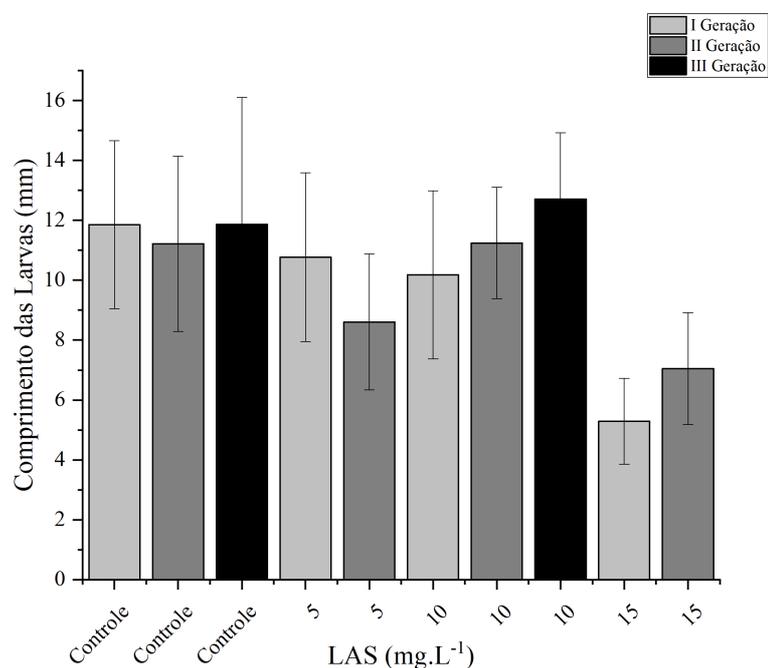
Fonte: Acervo pessoal

Os resultados de comprimento das larvas para as diferentes gerações expostas ao LAS (Figura 48) demonstram diferentes respostas dependendo da concentração do contaminante. Para o teste controle e a concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> foi observado diminuição no tamanho médio das larvas entre as gerações I e II. Já nas concentrações de 10 e 15 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu o aumento no tamanho entre as mesmas gerações. Com esses resultados, pode-se concluir que o aumento da concentração de LAS induz ao aumento no tamanho médio das larvas de II geração, quando comparadas a I geração.

Os organismos do teste controle e os expostos à concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> foram os únicos que atingiram a III geração. Entretanto, na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> nenhuma larva conseguiu alcançar a vida adulta (alada). Na III geração, os comprimentos das larvas para o teste controle e 10 mg.L<sup>-1</sup> LAS permaneceram na faixa de 9 a 13 e 11 a 14 mm, respectivamente. Pode-se assim inferir que na II geração, a presença de LAS não alterou o tamanho das larvas, mas provavelmente produziu algum efeito negativo nos organismos que não conseguiram emergir.

Por meio desses resultados, pode-se ressaltar a importância do teste de gerações por evidenciar as diferenças comportamentais em cada geração, com relação ao desenvolvimento do inseto *C. sancticaroli* quando exposto ao LAS. Essas diferenças podem estar relacionadas à influência desse surfactante no metabolismo das larvas, acelerando seu crescimento, e até mesmo ocasionando mortalidade das larvas antes de atingir a III geração.

Figura 48 – Comprimentos das larvas em diferentes gerações da espécie *C. sancticaroli* quando expostas ao LAS padrão



Fonte: Elaborado pela Autora

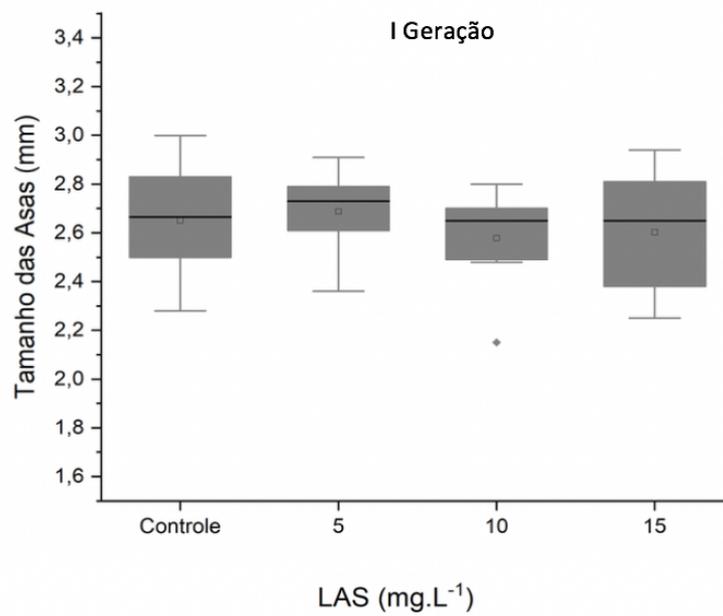
Para as análises do tamanho das asas do *C. sancticaroli*, em diferentes gerações, quando expostas ao LAS demonstram respostas dependendo da concentração do contaminante e do tempo de exposição. Na I geração, o valor médio do tamanho das asas do inseto tanto para o controle quanto para as concentrações de LAS, está próximo a 2,6 mm, evidenciando que não há diferenças entre os tamanhos das asas, na I geração, quando o contaminante é adicionado (Figura 49).

Na II geração, foram analisadas apenas o tamanho das asas do controle e da concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> (únicas condições na qual as larvas emergiram). A concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> apresentou diminuição no tamanho das asas entre a I e a II geração de 2,6 para 2,0 mm (Figura 50), resultado não reportado para o controle, no qual não ocorreu alterações do tamanho das asas entre as gerações.

Segundo McLachlano (1985) o comprimento das asas está associado tanto à fecundidade quanto à capacidade de dispersão nos insetos, podendo refletir em sua capacidade colonizadora em diferentes habitats. A partir dos resultados reportados nesse

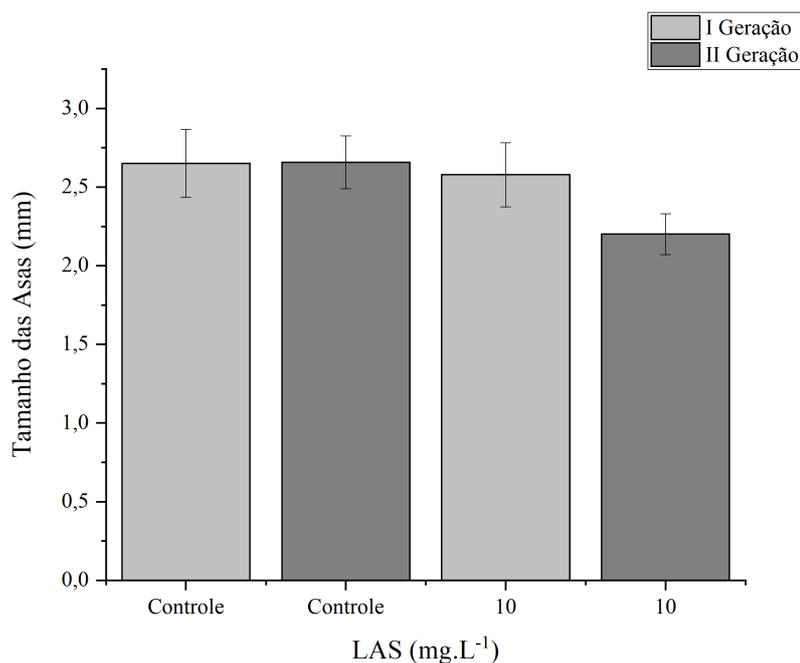
estudo, é possível inferir que o tempo de exposição é um fator importante na resposta do organismo-teste e, ainda, que o LAS em concentrações de 10 mg.L<sup>-1</sup> pode interferir no desenvolvimento do *C. sancticaroli* com a diminuição no tamanho médio da asa, podendo alterar sua capacidade de colonização.

Figura 49 – Boxplot representando o tamanho das asas de *C. sancticaroli* na I geração



Fonte: Elaborado pela Autora

Figura 50 – Tamanho das asas entre a I e a II geração



Fonte: Elaborado pela Autora

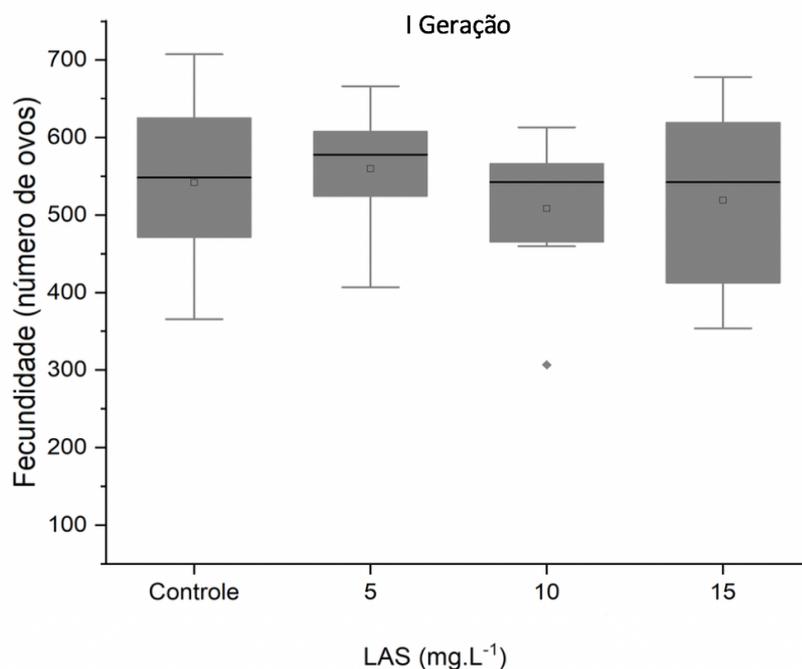
A fecundidade potencial foi estimada de acordo com o tamanho das asas, na I geração, a presença de LAS não interferiu na fecundidade potencial do *C. sancticaroli* apresentando valor médio de 500 ovos, tanto para as concentrações de LAS quanto para o controle (Figura 51). Para a II geração, resultado distinto foi observado, no valor médio de ovos do teste controle permanece próximo a 500 ovos, e a fecundidade dos organismos decresceu para a concentração de 10 mgL<sup>-1</sup>, variando entre 300 e 400 ovos (Figura 52). Para as demais concentrações, não foi possível fazer as análises de tamanho de asa e fecundidade potencial, por não haver fêmeas adultas para coletar, devido à mortalidade dos insetos.

Nolte (1993) afirma que a variação na produção de ovos das fêmeas desse inseto pode estar relacionada com o tempo de desenvolvimento do aparelho ovopositor na fase larval, permitindo salientar que fêmeas melhores desenvolvidas possuem a capacidade de maior produção de ovos. Assim, as fêmeas de *C. sancticaroli* expostas a 10 mg.L<sup>-1</sup> de LAS na II geração apresentaram diminuição na sua capacidade de reprodução, demonstrando que mesmo essa concentração não apresenta efeito tóxico na análise de tamanho de larvas, chegando a III geração, apresentou efeitos negativos para o tamanho de asas e,

consequentemente fecundidade. Esses resultados indicam que na fase larval o desenvolvimento do aparelho ovopositor pode ter sido comprometido pela presença de LAS.

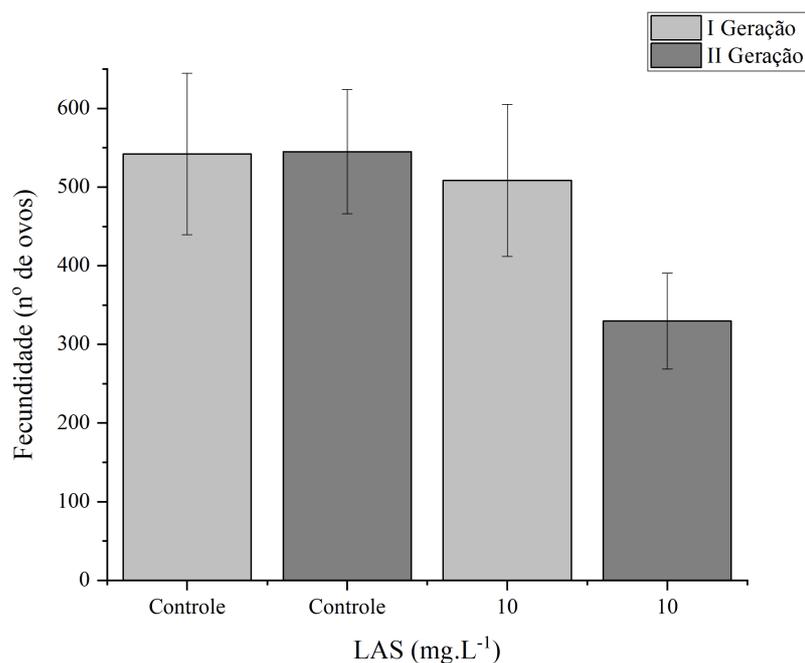
Variação nas taxas de reprodução pode impactar a dinâmica dos ecossistemas aquáticos produzindo efeito negativo sobre a população. A avaliação dos efeitos tóxicos dos poluentes sobre as populações podem fornecer uma base para a avaliação dos riscos ecológicos (NEWMAN, 2010). Os ecossistemas ou comunidades consistem em muitas espécies que se interagem, a extinção ou redução de determinadas populações podem desestabilizar comunidades ou destruir funções ecossistêmicas (TANAKA; NAKANISHI, 2001).

Figura 51 – Boxplot representando a fecundidade potencial para I geração de *C. sancticaroli*



Fonte: Elaborado pela Autora

Figura 52 – Fecundidade potencial entre a I e a II geração



Fonte: Elaborado pela Autora

A partir do teste estatístico ANOVA one-way com teste *posteriori* de Tukey, para verificação da interação entre as gerações, é possível observar que não há diferença estatística entre as gerações para o tamanho das larvas, entretanto evidenciam diferença estatística entre as gerações para o tamanho das asas das fêmeas e fecundidade potencial. Dessa maneira, pode-se inferir que esses organismos podem sofrer alterações fisiológicas quando a exposição ao contaminante é contínua.

Para determinar a correlação entre as concentrações e todas as gerações do organismo foram realizados testes estatísticos de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), e um teste a *posteriori* de Dunn. Em relação às concentrações de todas as gerações estudadas, tamanho das asas e fecundidade potencial, não há diferença estatística entre as concentrações de 5 mg.L<sup>-1</sup> e o teste controle.

### 6.2.3.1 Impacto à biota aquática

Os teste de geração de *C. sancticaroli*, nos experimentos de toxicidade crônica de longa duração, apresentaram resultados distintos para cada geração desse inseto, demonstrando que o LAS afeta tanto o comprimento das asas quanto a fecundidade potencial desse inseto, a partir da II geração, podendo refletir em sua capacidade colonizadora para diferentes habitats e, por isso, essa análise pode ser considerada promissora. Em comparação com os testes de toxicidade crônica comuns, esses experimentos de longo prazo têm a capacidade de evidenciar resultados dos efeitos tóxicos do LAS nas gerações distintas do inseto *C. sancticaroli*. Desta forma, o novo método de análise ecotoxicológica para *C. sancticaroli* pode ajudar os pesquisadores a obter resultados mais detalhados em experimentos laboratoriais e também pode auxiliar os órgãos ambientais na implementação desses testes como análise mais detalhada dos efeitos tóxicos dos contaminantes à biota aquática.

### 6.3 Hipótese B

Nessa Hipótese avaliou-se a toxicidade do LAS presente em água de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico, antes e depois de passar por tratamento em reator de leito fluidificado, bem como os efeitos tóxicos dos compostos secundários produzidos nesse reator, por meio de ensaios ecotoxicológicos, respondendo se esse tipo de tratamento realmente diminui a toxicidade do efluente para a biota aquática.

#### 6.3.1 Teste de Toxicidade Aguda com Reator

Assim como nos testes de toxicidade aguda para o LAS padrão, os bioensaios de curta duração, entre 48 a 96 horas de exposição às soluções-teste (afluentes, efluentes, e diluições dos efluentes), estabelecem seus efeitos imediatos aos organismos-teste selecionados, ou seja, mortalidade ou imobilidade em 50% dos organismos ( $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ ). A porcentagem de mortalidade de cada réplica foi utilizada para a confecção dos gráficos Boxplot, bem como a análise descritiva de agrupamento hierárquico de Cluster, utilizando-se Bray-Curtis para determinar a similaridade de efeito letal entre as soluções-teste nos organismos.

Os bioensaios foram realizados nos mesmos dias das coletas dos afluentes e efluentes. As análises de pH foram realizadas ao início dos testes e apresentou baixa amplitude de variação, entre 6,40 a 7,80 para o afluente, e entre 7,40 a 8,15 para o efluente. Assim, pode-se inferir que o valor do pH não influenciou na mortalidade dos organismos-teste, por estar dentro da faixa de cultivo das espécies.

##### 6.3.1.1 *Chironomus sancticaroli*

Os testes de toxicidade aguda utilizando os afluentes e efluentes do reator para o inseto *C. sancticaroli* foram realizados nas fases I, II, III, IV e VI, com exceção apenas da fase V. Como a fase V foi operada na estação de inverno, os organismos-teste *C. sancticaroli* sofreram severa diminuição populacional nos cultivos com o efeito da sazonalidade climática, e portanto não se pode realizar teste com essa espécie, nessa fase de operação do reator.

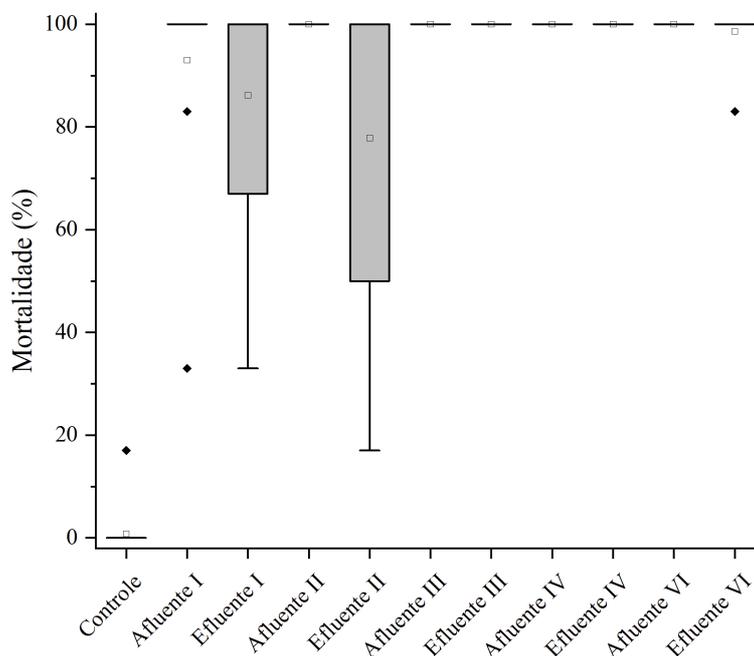
Os testes de toxicidade aguda com o inseto *C. sancticaroli*, resultaram em mortalidade de 100% no afluente de todas as fases do reator testadas, caracterizando assim uma toxicidade elevada para esse organismo, conforme a Figura 53.

As concentrações médias de LAS dos afluente e efluentes nas seis fases de operação do reator foram de 16,5 a 23,8 mg.L<sup>-1</sup> e de 7,7 a 13,3 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados demonstram a elevada toxicidade da água residuária de lavanderia combinada com esgoto doméstico, contendo LAS, mesmo após tratamento.

Os testes realizados previamente com LAS padrão na Hipótese A, deste trabalho, apresentam concentração CL<sub>50</sub> de 25,25 mg.L<sup>-1</sup> de LAS (C<sub>12</sub>) em teste de toxicidade aguda. Como a água residuária de lavanderia combinada com esgoto doméstico pode apresentar outros compostos orgânicos xenobióticos em sua composição (BRAGA; VARESCHE, 2014), a elevada toxicidade apresentada em todos os afluentes analisados pode ser explicada pela gama de componentes potencialmente tóxicos para organismos aquáticos, e não somente o LAS afluente.

A partir das análises utilizando os efluentes tratados, é possível observar diferentes efeitos tóxicos dependendo da fase analisada. Nos efluentes das fases I e II foi encontrada taxa de mortalidade média de 86% e 78%, respectivamente, já nas demais fases (II, IV e VI), os efluentes apresentaram toxicidade de 100% para as larvas do organismo-teste (Figura 53). Pode-se ressaltar as mudanças na operação do reator, como a introdução do bicarbonato de sódio (a partir da fase III) e a velocidade ascensional aplicada variou ao longo das etapas III, IV, V e VI. Com os resultados dos testes ecotoxicológicos para a espécie *C. sancticaroli*, foram elaboradas as seguintes hipóteses: a adição de bicarbonato de sódio juntamente com a variação da velocidade ascensional, no sistema, alterou as rotas metabólicas preferenciais no reator, o que resultou em uma provável produção de subprodutos mais tóxicos e/ou ocasionou rotas metabólicas incompletas que foram mais tóxicas para o organismo-teste *C. sancticaroli*.

Figura 53 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *C. sancticaroli* nas fases de operação do reator para os afluentes e efluentes



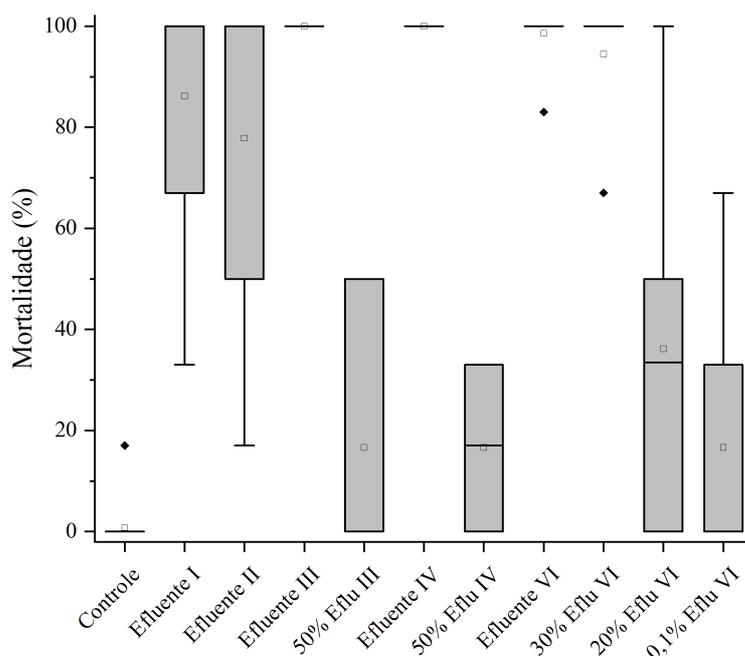
Fonte: Elaborado pela Autora

No decorrer dos bioensaios de toxicidade, foi identificada, nas primeiras fases de operação do reator, elevada toxicidade dos efluentes, com mortalidade próximas a 100% nos demais organismo-teste utilizados nesse estudo. Desta forma, a partir da fase III de operação, foram realizadas diluições dos efluentes, com o intuito de verificar a diluição ideal no lançamento desse efluente em corpo d'água. Com as diluições dos efluentes do reator para as larvas do inseto *C. sancticaroli* pode-se observar que, nas Fases III e IV, as diluições de 50% resultaram em taxa de mortalidade média de 17%, conforme mostrado na Figura 54.

Considerando a Fase VI, é possível observar diminuição da toxicidade do efluente somente a partir da diluição de 20%, evidenciando a elevada toxicidade do efluente do reator nessa fase de operação. Ainda na fase VI, a taxa de mortalidade média de 36% e 16% foram encontradas para as diluições de 20 e 0,1%, respectivamente. Com esses resultados, pode-se observar taxa de mortalidade semelhante na diluição de 50% nas fases III, IV e na diluição de 0,1% na fase VI, demonstrando que houve aumento da toxicidade do reator na

fase de operação VI para as larvas de *C. sancticaroli*.

Figura 54 – Boxplot representando a mortalidade do inseto *C. sancticaroli* nas fases de operação do reator com efluentes e suas diluições



Fonte: Elaborado pela Autora

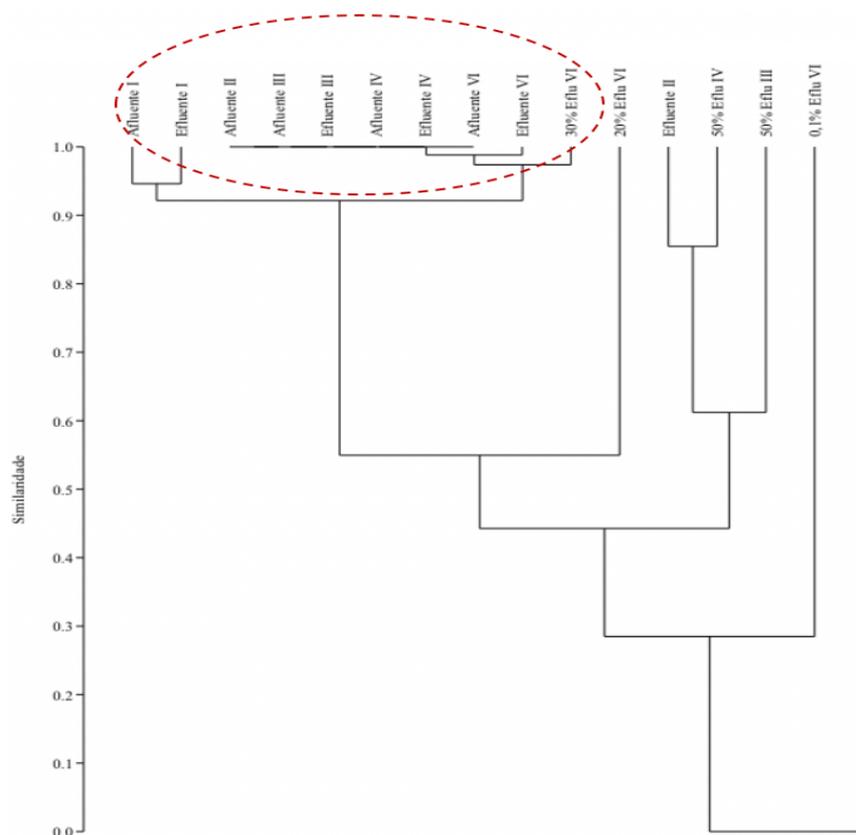
O Cluster foi compilado por meio dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda para as diferentes fases de operação do reator com organismo-teste *C. sancticaroli* (Figura 55), no qual, todos os afluentes e os efluentes brutos das fases I, II, III, IV e VI foram similares entre si com 90% de similaridade (agrupamento 1), demonstrando semelhantes efeitos tóxicos antes e depois do tratamento nas fases I, III, IV e VI de operação. O efluente bruto, na fase II, diferenciou-se do agrupamento 1, apresentando similaridade menor que 50%. Apesar desse efluente apresentar resultados próximos ao efluente I (Figura 54), a baixa similaridade por meio da análise de Cluster pode estar relacionada com a alta variabilidade dos efeitos tóxicos para o efluente II (de 20 a 100% de mortalidade).

O efluente II apresenta similaridade de 80% da diluição de 50% do efluente IV e 60% de similaridade da diluição de 50% do efluente III. A semelhança entre as diluições

de 50% dos efluentes III e IV com o efluente II pode estar relacionada com a ampla faixa de variação dos efeitos tóxicos do efluente II (de 20 a 100% de mortalidade do inseto *C. sancticaroli*). A variação da faixa de toxicidade da fase II de operação do reator pode estar associada à introdução de etanol (50 mg.L<sup>-1</sup>) como co-substrato metabólico, o qual favorece a eficiência de remoção de LAS e pode influenciar nas alterações das populações microbianas do reator (ANDRADE et al., 2017; MACEDO et al., 2015b, 2017; MOTTERAN et al., 2018) diminuindo a toxicidade, nessa fase, após a estabilização do reator.

Ainda observando a Figura 55, nota-se que o teste-controle se distancia de todas as amostras do reator, podendo-se inferir que os afluentes e efluentes tratados, mesmo com as diluições, continuam tóxicos para o organismo *C. sancticaroli*. A diluição de 0,1% do efluente, na fase VI de operação, demonstra baixa semelhança entre as demais diluições dos efluentes e afluentes e efluentes bruto, o que permite inferir que a diluição de 0,1% do efluente VI é menos tóxica aos *C. sancticaroli*.

Figura 55 – Análise de Cluster com similaridade de Bray-Curtis para *C. sancticaroli* nas fases de operação do reator



Fonte: Elaborado pela Autora

As análises estatísticas foram baseadas em hipóteses, e, como a hipótese nula ( $H_0$  - Afluentes, efluentes e as diluições dos efluentes nas 6 fases de operação do reator, têm o mesmo efeito tóxico no inseto *C. sancticaroli*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais amostras apresentam comportamentos distintos. O teste de Dunn, demonstrou que não há diferença estatística entre o teste controle e as diluições: 50% efluente III, 50% efluente IV, 20 e 0,1% efluente VI, evidenciando a elevada toxicidade do reator mesmo pós tratamento.

Na Fase VI de operação do reator, foram realizadas 3 diferentes diluições do efluente (30, 20 e 0,1 %), o que permitiu calcular a  $CL_{50-96h}$  e determinar os CENO e CEO a diluição do reator na espécie *C. sancticaroli*, observando-se qual diluição do reator que causa ou não causa efeito observado nas larvas do *C. sancticaroli*. Como 20 % de diluição do efluente do reator não é diferente do controle, determinou-se que o CENO, e a diluição de 30 % do efluente causam o efeito observado nessa espécie (Tabela 16). Com o resultado de  $CL_{50}$ , pode-se inferir que a diluição de 22,53 % do efluente, na VI fase de operação do reator, seria tóxica a 50 % dos organismos dessa espécie.

Tabela 16 – Diluições CENO, CEO e  $CL_{50}$  para a espécie *C. sancticaroli* na fase VI de operação do reator

Teste de toxicidade Aguda <i>C. sancticaroli</i>	$CL_{50-96h}$ Diluição (%) fase VI	CENO Diluição (%) fase VI	CEO Diluição (%) fase VI
		22,53 (21,04 – 24,02)	20

Fonte: Elaborado pela Autora

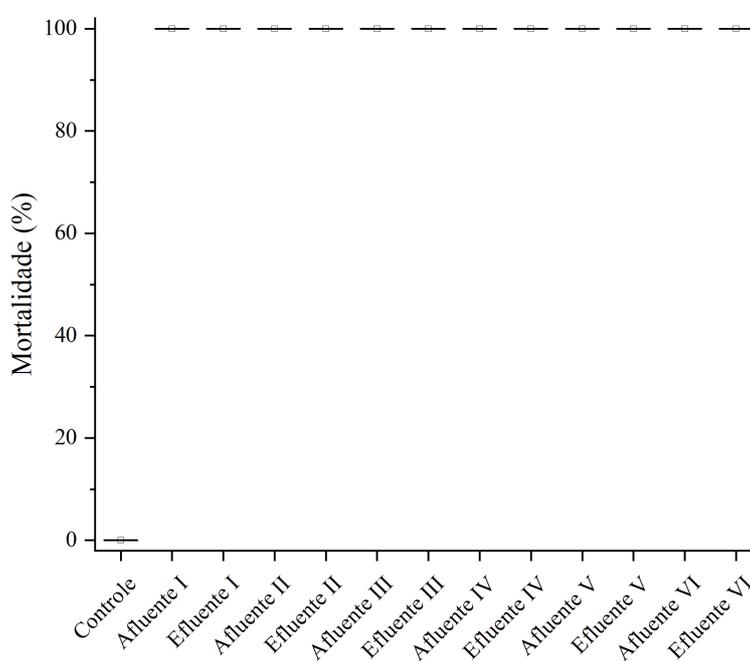
### 6.3.1.2 *Allonais inaequalis*

O oligoqueto *A. inaequalis* apresentou mortalidade de 100% para os afluentes e efluentes em todas as fases de operação do reator (Figura 56), com concentração média de LAS no afluente de 16,5 a 23,8  $mg.L^{-1}$  e nos efluentes de 7,7 a 13,3  $mg.L^{-1}$ . Esses resultados demonstram a elevada toxicidade da água residuária de lavanderia combinada com esgoto

doméstico, contendo LAS, mesmo após tratamento.

Os testes de toxicidade aguda realizados anteriormente com LAS padrão apresentaram mortalidade de 50% para *A. inaequalis*, em concentração  $CL_{50}$  de  $8,13 \text{ mg.L}^{-1}$  LAS padrão (Hipótese A). A partir dos resultados do teste de toxicidade aguda com amostras do reator, pode-se verificar que o LAS afluente foi um importante fator na toxicidade das amostras.

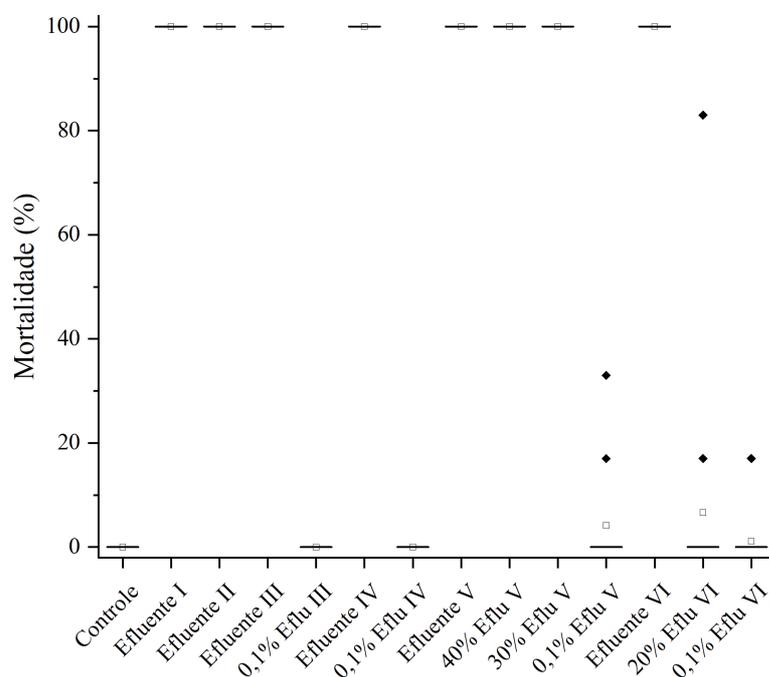
Figura 56 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *A. inaequalis* nas seis fases de operação do reator para os afluentes e efluentes



Fonte: Elaborado pela Autora

Ao analisar as diluições dos efluentes do reator é possível identificar que nas fases III, IV, V e VI a diluições de 0,1% dos efluentes resultaram na diminuição dos efeitos tóxicos em 100% para a espécie *A. inaequalis* (Figura 57). As diluições de 30 e 40% do efluente na fase V apontam elevada toxicidade a esse organismo-teste, com mortalidade de 100%, esse resultado pode estar associado a menores velocidades ascensional e adição  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  de etanol que favoreceram o acúmulo de ácidos no sistema na Fase V de operação do reator. Já na fase VI de operação, com a diluição de 20%, pode-se observar a redução dos efeitos tóxicos do reator, diminuindo a mortalidade dos organismos-teste.

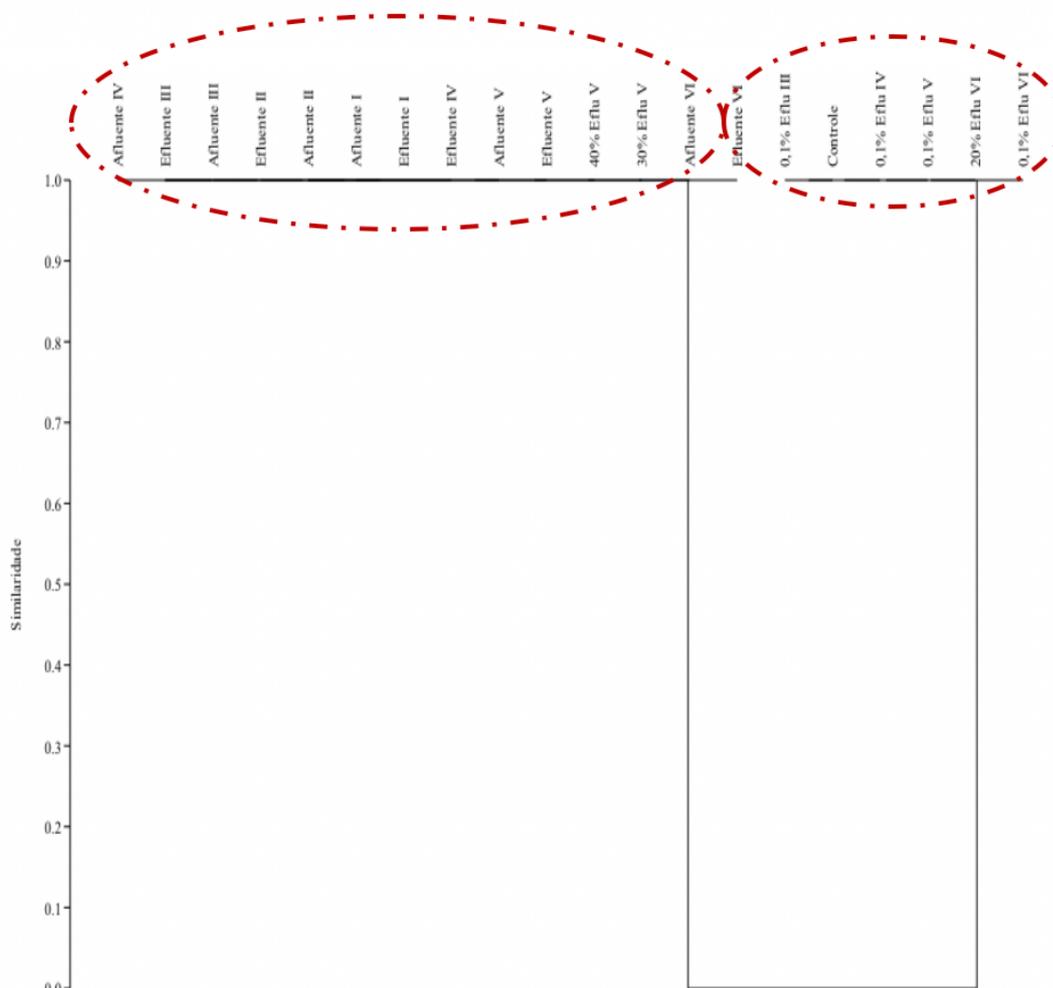
Figura 57 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *A. inaequalis* nas seis fases de operação do reator para os efluentes e suas diluições



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente cofenético de 0,99) diferenciou 2 grandes agrupamentos por similaridade (Figura 58). O primeiro agrupamento é composto pelo teste controle e as diluições de 0,1% dos efluentes, nas fases III, IV, V e VI, e a diluição de 20% do efluente na fase VI, com 100% de similaridade e diferenciando-se das demais amostras do reator, provavelmente por não causarem mortalidade ao *A. inaequalis*. O segundo agrupamento maior, inclui todos os afluentes e efluentes, para todas as fases de operação do reator, bem como as diluições de 40 e 30 % do efluentes na Fase V, o que evidencia elevada toxicidade desse composto mesmo após tratamento e diluição de 30 e 40%. As diluições de 20 e 0,1% do efluente da fase VI e a diluição de 0,1% da fase V de operação do reator apresentam dissimilaridade entre si, e com as demais fases de operação, indicando efeitos tóxicos do reator, mesmo na Fase VI de operação.

Figura 58 – Análise de Cluster com similaridade entre as VI Fases de operação do reator e seu efeito tóxico à espécie *A. inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

A hipótese nula ( $H_0$  - Afluentes, efluentes e as diluições dos efluentes nas VI fases de operação do reator têm o mesmo efeito tóxico no *A. inaequalis*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais amostras apresentam comportamentos distintos. O teste de Dunn, demonstra que não há diferença estatística entre o teste controle e as diluições de 0,1% dos efluentes, nas fases III, IV, V e VI, e a diluição 20% do efluente na fase VI. Com esses resultados, pode-se inferir que o reator não apresenta efeitos tóxicos aos *A. inaequalis*, quando os efluentes são diluídos em 0,1%. A concentração de 0,1% do efluente simula a entrada dessa amostra em

ambiente aquático real, dessa maneira, pode-se salientar a diminuição dos efeitos tóxicos à biota aquática, quando em contato com 0,1% de diluição dos efluentes.

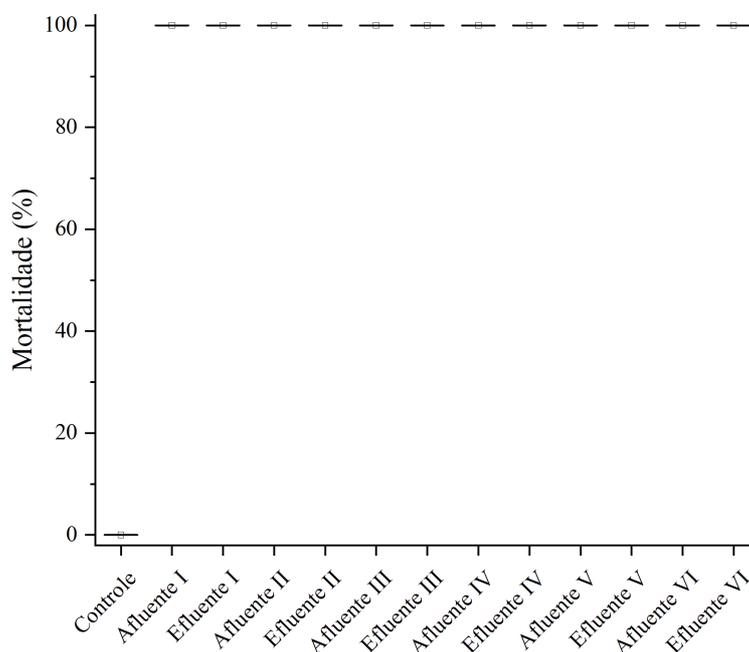
A  $CL_{50}$  para a diluição do efluente do reator para o organismo-teste *A. inaequalis*, não pode ser calculada para nenhuma fase de operação. Os resultados dos testes de toxicidade aguda demonstram mortalidade de 0 ou 100% dos organismos, não possibilitando a compilação da análise estatística de  $CL_{50}$ .

### 6.3.1.3 *Daphnia magna*

Os afluentes e efluentes de todas as fases de operação do reator (I a VI) causaram 100% de mortalidade no microcrustáceo *D. magna*, caracterizando elevada toxicidade para essa espécie (Figura 59).

O teste de toxicidade aguda, realizado anteriormente com LAS padrão na Hipótese A deste trabalho, apresentou concentração  $CE_{50}$  de 6,11  $mg.L^{-1}$  de LAS. Assim como no organismo-teste *A. inaequalis*, pode-se verificar a partir desses resultados que a mortalidade registrada dos organismos *D. magna*, provavelmente está vinculada ao LAS e demais xenobióticos presentes nas amostras de reatores, já que a concentração de LAS afluente foi de 16,5 a 23,8  $mg.L^{-1}$  e, nas amostras tratadas (efluente) a faixa de concentração foi de 7,7 a 13,3  $mg.L^{-1}$ . A partir dos resultados de toxicidade aguda com as amostras de reatores pode-se verificar que, mesmo pós tratamento, os efluentes continuam tóxicos para a biota aquática.

Figura 59 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *D. magna* nas seis fases de operação do reator para os afluentes e efluentes

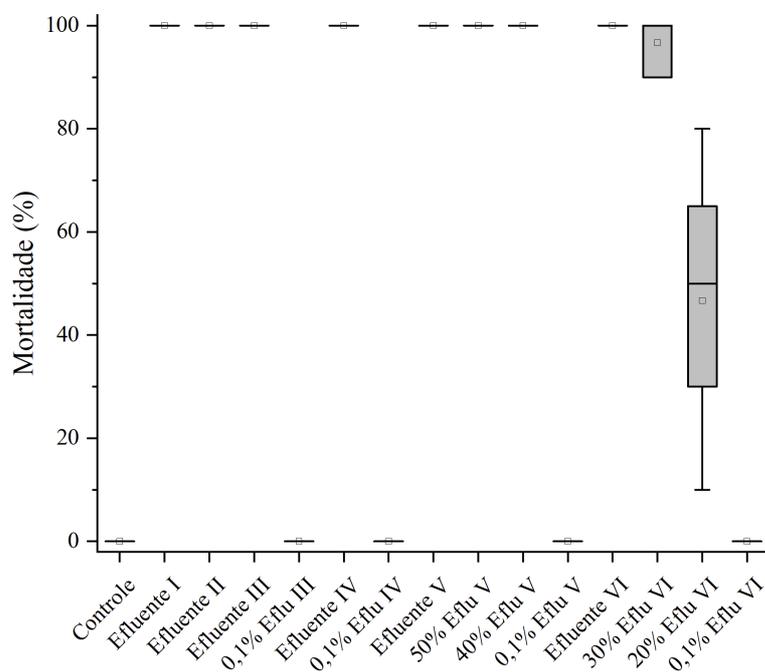


Fonte: Elaborado pela Autora

Ao se analisar o efeito das diluições dos efluentes do reator nas fases III, IV, V e VI, foi possível verificar diminuições da toxicidade para a espécie *D. magna* com o aumento das diluições dos efluentes do reator. A diluição de 0,1% do efluente nas Fases III, IV, V e VI, resultou em diminuição da taxa de mortalidade dessa espécie, próxima aos 100% (Figura 60).

Assim como para a espécie *A. inaequalis*, o efluente na Fase V também apresentou elevada toxicidade ao organismo-teste *D. magna*, mesmo utilizando suas diluições. A toxicidade do reator, nessa fase de operação (fase V), pode estar relacionada ao acúmulo de ácidos no sistema, devido à velocidade ascensional e à adição de 200 mg.L<sup>-1</sup> de etanol. Na Figura 60, observa-se que na fase VI ocorre diminuição da mortalidade dos *D. magna* quando os efluentes são foram diluídos em 30, 20 e 0,1%, sendo, mortalidade média de 97%, 46% e 0%, respectivamente. A partir desses resultados, pode-se inferir que, mesmo com as diluições dos efluentes do reator, as amostras apresentam-se tóxicas a esse microcrustáceo.

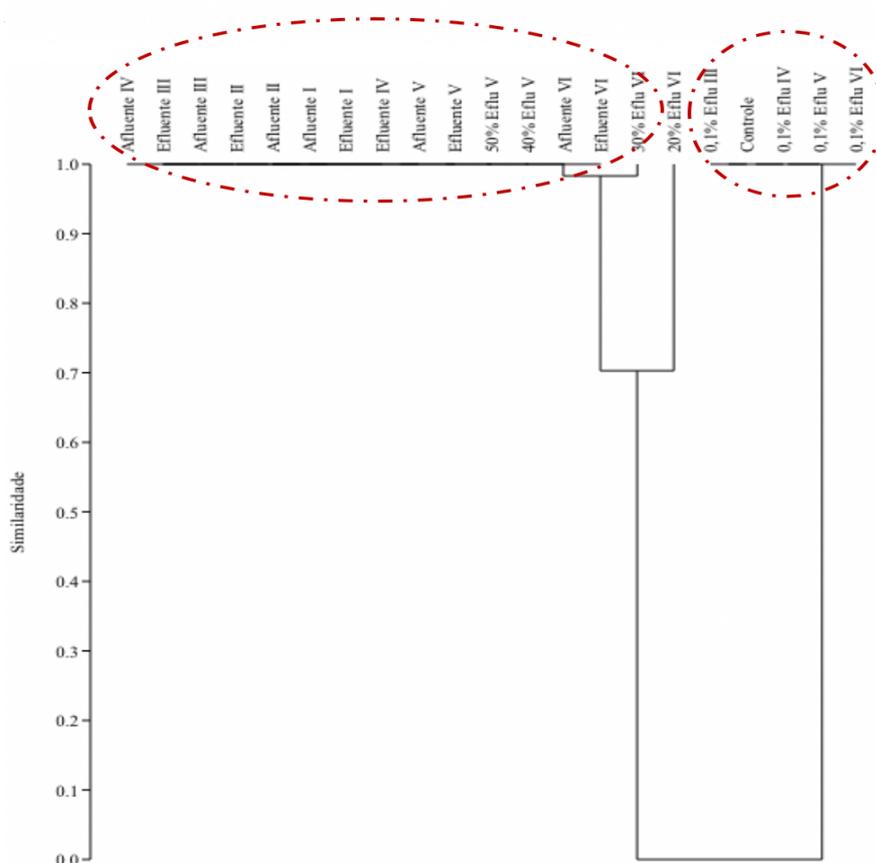
Figura 60 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *D. magna* nas seis fases de operação do reator para os Efluente e suas diluições



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente de correlação cofenético de 0,99) (Figura 61), aponta dois grandes agrupamentos por similaridade. O primeiro grande agrupamento inclui o teste controle e as diluições de 0,1% dos efluentes nas fases III, IV, V e VI, com similaridade de 100% é comprovada e nenhuma mortalidade à espécie *D. magna* foi registrada para essas amostras. O segundo agrupamento, contempla os afluentes e efluentes das seis fases de operação, assim como as diluições de 40 e 50% do efluente na fase V e a diluição de 30% do efluente na fase VI, o que evidencia elevada toxicidade desse composto, mesmo após tratamento, e diluição de 30, 40 e 50%. A diluição de 20% do efluente na fase VI se assemelha em 70% do agrupamento das amostras de maior efeito tóxico, isso pode ter acontecido pela ampla variação à resposta tóxica nessa diluição (mortalidade de 10 a 80% dos *D. magna*).

Figura 61 – Análise de Cluster para as seis fases de operação do reator com *D. magna*



Fonte: Elaborado pela Autora

Para realização de teste estatístico, as análises foram baseadas em hipóteses, e a hipótese nula ( $H_0$  - de que os afluentes, efluentes e as diluições dos efluentes nas VI fases de operação do reator têm o mesmo efeito tóxico no *D. magna*), após ser rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais amostras apresentam comportamentos distintos. O teste de Dunn, demonstra que não há diferença estatística entre o teste controle e as diluições de 0,1% dos efluentes nas fases III, IV, V e VI de operação do reator. Com esses resultados, pode-se inferir que os efluentes diluídos a 0,1% não causam efeitos tóxicos aos *D. magna*

Como a fase VI de operação do reator demonstrou variação na mortalidade do organismos-teste *D. magna*, entre as diluições de 0,1, 20 e 30% do efluente, possibilitou a análise das concentrações CENO, CEO e  $CE_{50}$  em 48 horas de exposição (Tabela 17).

Tabela 17 – Diluição CENO, CEO e CE<sub>50</sub> do reator na fase VI de operação para a espécie *D. magna*

Teste de toxicidade Aguda <i>D. magna</i>	CE <sub>50-48h</sub> Diluição (%) fase VI	CENO Diluição (%) fase VI	CEO Diluição (%) fase VI
		20,31 (19,68 – 20,95)	0,1

Fonte: Elaborado pela Autora

Assim como observado nas análises descritivas (Boxplot e Cluster), a análise estatística de diluição do efluente na fase VI de operação do reator (CE<sub>50-48h</sub>) evidencia que a diluição de 20% do efluente VI, causa efeito de imobilidade a 50% do organismo-teste *D. magna*, e a diluição do efluente que não causa efeito tóxico é a de 0,1%. A partir desses resultados, pode-se inferir que, mesmo com a diluição dos efluentes, as amostras apresentam-se tóxicas aos organismos-teste, e que a diminuição dos efeitos tóxicos à biota aquática é observada com a diluição de 0,1% dos efluentes.

Andrade et al. (2017), analisaram dois reatores de leito fluidificado, com capacidade de 1,2 L, operados em TDH de 8h (RLF1) e 12h (RLF2), ambos alimentados com a água residuária de lavanderia, diluída em meio sintético para que a concentração de LAS afluente, fosse mantida em torno de 20 mg.L<sup>-1</sup>, resultando em 77% de remoção do LAS. Para investigar a toxicidade de amostras afluentes e efluentes dos reatores de leito fluidificado, esses autores realizaram testes ecotoxicológicos de 96 horas de exposição, com o inseto *Chironomus xanthus*, o qual, resultou em 100% de mortalidade desse inseto quando exposto aos afluentes; já em relação aos efluentes dos reatores, os autores verificaram 10% e 30% de mortalidade desses organismos tanto para o efluente do RLF1 e RLF2.

As diferenças na toxicidade dos efluentes para os invertebrados utilizados nesse estudo, para os de Andrade et al. (2017), podem estar atreladas às configurações dos reatores, diferenciando-se por escala de bancada e escala aumentada, bem como sua alimentação. No caso desta pesquisa, foram utilizadas amostras mais complexas, por se tratar de água residual de lavanderia combinada com esgoto doméstico real. Dessa maneira, pode-se inferir que as amostras do reator, utilizadas nessa pesquisa, são mais tóxicas que

as encontradas na literatura.

#### 6.3.1.4 Impacto à biota aquática

Diferentes homólogos e isômeros de LAS podem estar presentes nos efluentes (domésticos e água de lavanderia) e sua toxicidade em ambientes aquáticos está associada diretamente ao comprimento da cadeia alquílica e à posição do grupo fenil (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1996; PRATS et al., 1993; RAND, 1995). A cadeia alquílica do LAS pode variar seu comprimento de C<sub>10</sub> a C<sub>14</sub>, com misturas de homólogos e isômeros, contendo um anel aromático ligado à cadeia de carbono e um grupo sulfonato na posição “*para*” (HENAU; MATHIJS; HOPPING, 1986). O grupo Fenil (anel aromático) do LAS pode ser ligado a quase todos os átomos de carbono da cadeia alquílica, exceto na posição de carbono 1 (grupo carbono-metila primário), e pode formar até 26 moléculas diferentes (DE WOLF; FEIJTEL, 1998). Observando tais informações, Versteeg e Rawling (2003) analisaram o efeito da bioacumulação do LAS (C<sub>12</sub>) em peixes, notaram que esses efeitos variavam conforme a posição do grupo fenil e concluíram que a concentração de bioacumulação tende a diminuir à medida que a posição do anel aromático se desloca para isômeros extremos (2- e 3-fenilo) e aumenta quando se liga a isômeros internos (5- e 6-fenilo).

Nota-se que nos bioensaios de toxicidade aguda para os 3 organismos-teste selecionados nesta pesquisa, evidenciaram alta toxicidade dos afluentes e efluentes, mesmo os efluentes diluídos a 0,1%, indicando a complexidade do tratamento do LAS, ainda mais em amostras com elevada diversidade em sua composição, como é o caso da água residual de lavanderia combinada com o esgoto doméstico.

Ademais, sabe-se que a degradação do LAS é complexa, desta forma, a utilização de co-substratos nos reatores de tratamento, como álcoois alifáticos, aldeídos e ácidos carboxílicos, são mecanismos importantes de reativação da atividade microbiana (biodigestão), uma vez que as bactérias podem sofrer com a toxicidade do LAS e assim perder a capacidade de oxidá-lo (MOTTERAN et al., 2018; NAIK; DUBEY, 2017).

Conforme descrito na metodologia (item 5), o reator foi operado pela doutoranda Thais Z. Macedo, no qual, utilizou-se de etanol como co-substrato; entretanto, foi notório

que altas concentrações desse co-substrato e menores velocidades ascensionais, favoreceu acidificação do sistema reacional, sobretudo ácido acético e propiônico (MACEDO et al., 2018), tornando o efluente mais tóxico para a biota aquática. Foi relatado pela Thais (doutoranda responsável em operar o reator de leito fluidificado), em suas análises, que não houve diferença significativa na eficiência de remoção de LAS ( $p < 0,05$ ) nas fases I à IV (de 30 a 52% de eficiência).

Ainda no efluente do reator de leito fluidificado, foram identificados 17 compostos recalcitrantes observados, em sua maioria, ftalatos. Os ftalatos são poluentes orgânicos amplamente utilizados como plastificantes e solventes em várias indústrias e podem ser encontrados em brinquedos, couro, produtos de higiene pessoal, detergentes e tintas (LI; YIN; ZHAO, 2016), são também considerados tóxicos aos organismos aquáticos (LATINI et al., 2003; LIU et al., 2016; WANG et al., 2018; XIANG et al., 2017). Assim como o LAS, os ftalatos são considerados disruptores endócrinos, que interrompem o metabolismo lipídico celular e alteram a composição fosfolipídica da membrana plasmática, interrompendo a integridade da membrana (LIN et al., 2017), isso pode acarretar diversos efeitos, entre eles a mortalidade do organismo.

Portanto, permite-se inferir que, por ser uma amostra muito complexa, a toxicidade dos efluentes do reator de leito fluidificado nos invertebrados aquáticos, testados nesta pesquisa, pode não necessariamente estar vinculada apenas à toxicidade do LAS. O que permite ressaltar a complexidade do tratamento dessas amostras contendo LAS, e a importância das análises ecotoxicológicas na avaliação do tratamento de efluentes, pela representação dos efeitos tóxicos à biota aquática.

### 6.3.2 Teste de Toxicidade Crônica com Reator

O teste de toxicidade crônica foi utilizado para analisar os efeitos de exposição prolongada das amostras complexas do reator aos organismos *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*. Por se tratar de teste com maior tempo de exposição (10 dias) pode-se verificar o efeito desse efluente no crescimento da larva do *C. sancticaroli*, bem, como a capacidade reprodutiva do *A. inaequalis*.

Assim como nos testes de toxicidade aguda com o reator, os bioensaios de toxicidade crônica também foram realizados nos mesmos dias das coletas dos afluentes e efluentes, bem como as análises de pH, o qual apresentou baixa amplitude de variação, entre 6,80 a 7,35 para o afluente, e entre 7,50 a 8,00 para o efluente. As variações do pH, assim como no teste de toxicidade aguda com reator, estão dentro da faixa de cultivo, salientando que a mortalidade desses organismos não está atrelada à variação do pH.

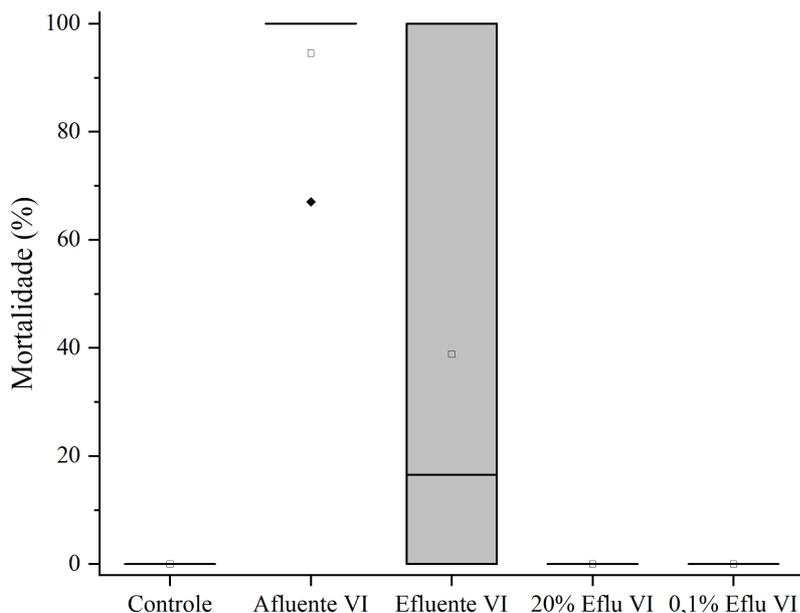
Na Fase VI<sub>b</sub> de operação do reator, com diminuição do LAS afluente para 6,3 mg.L<sup>-1</sup> e efluente com 2,8 mg.L<sup>-1</sup>, com a retirada do bicarbonato de sódio e a estabilização das rotas metabólicas do reator, pode-se perceber a diminuição da toxicidade no decorrer dos testes ecotoxicológicos durante a Fase VI<sub>b</sub>. Portanto, a partir desses resultados, foi possível analisar não somente a mortalidade dos organismos-teste, mas também seu desenvolvimento, por meio de teste de toxicidade crônica.

#### 6.3.2.1 *Chironomus sancticaroli*

Para as larvas do inseto *C. sancticaroli* foi calculada a mortalidade em torno de 100% no afluente do reator, demonstrando elevada toxicidade da água residuária de lavanderia combinada com esgoto doméstico, contendo LAS, mesmo após tratamento. Em contrapartida, o efluente apresentou mortalidade média resultante de 39%, porém pode-se observar variação quanto a seu efeito tóxico (de 0 a 100% de mortalidade), desta forma não se pode afirmar que resultou na diminuição da toxicidade do efluente na fase VI<sub>b</sub> para esse organismo (Figura 62). Avaliando as diluições de 20 e 0,1%, é possível identificar que essas amostras não apresentam mortalidade aos *C. sancticaroli*. A partir desses resultados, pode-

se inferir que as diluições de 20 e 0,1% do efluente da fase VI<sub>b</sub> reduziu os efeitos tóxicos do reator diminuindo a mortalidade dos organismos-teste.

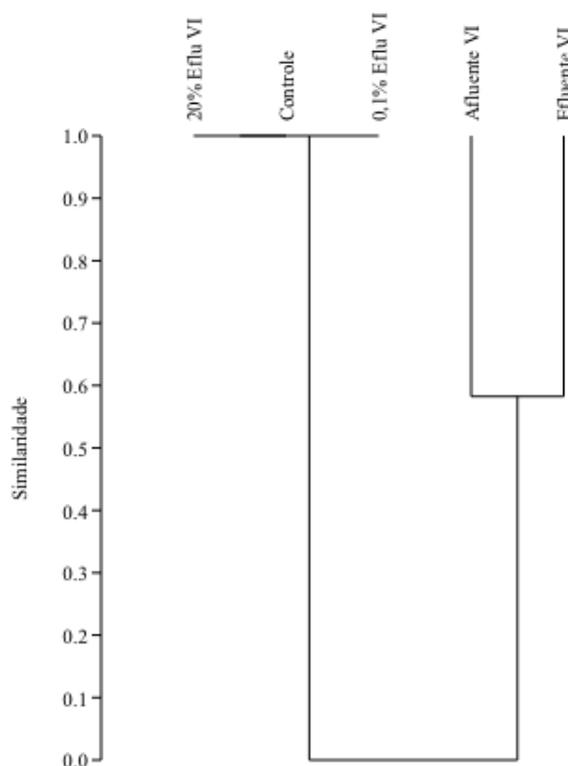
Figura 62 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *C. sancticaroli* na fase VI<sub>b</sub> da operação do reator



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente cofenético 1), apontou 2 agrupamentos por similaridade. O primeiro é composto pelo teste controle e as diluições de 20 e 0,1% do efluente VI<sub>b</sub> (Figura 63), podendo ressaltar que não ocorreram mortalidades do inseto. O segundo agrupamento, com 60% de similaridade, inclui o afluente e o efluente da fase VI<sub>b</sub>, esse agrupamento pode estar atrelado à variação do efeito tóxico do efluente, evidenciando elevada toxicidade ao *C. sancticaroli*.

Figura 63 – Análise de Cluster de similaridade entre os efeitos tóxicos do afluente, efluente e diluições da fase VI<sub>b</sub> de operação do reator para as larvas de *C. sancticaroli*



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise estatística foi baseada em hipóteses, e como a hipótese nula ( $H_0$  - afluente, efluente e as diluições de 20 e 0,1% do efluente na fase VI<sub>b</sub> de operação do reator tem o mesmo efeito tóxico no inseto *C. sancticaroli*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais amostras apresentam comportamentos distintos. O teste de Dunn, demonstra que não há diferença estatística entre o teste controle e as diluições de 20 e 0,1% do efluente VI<sub>b</sub>, evidenciando a elevada toxicidade do reator, mesmo pós tratamento.

A concentração CENO foi determinada após a confirmação de similaridade estatística (teste de Dunn) entre o controle e as amostras do efluente, determinando o valor de CENO como a diluição de 20% do efluente VI<sub>b</sub> e o CEO como o efluente bruto, sem diluição.

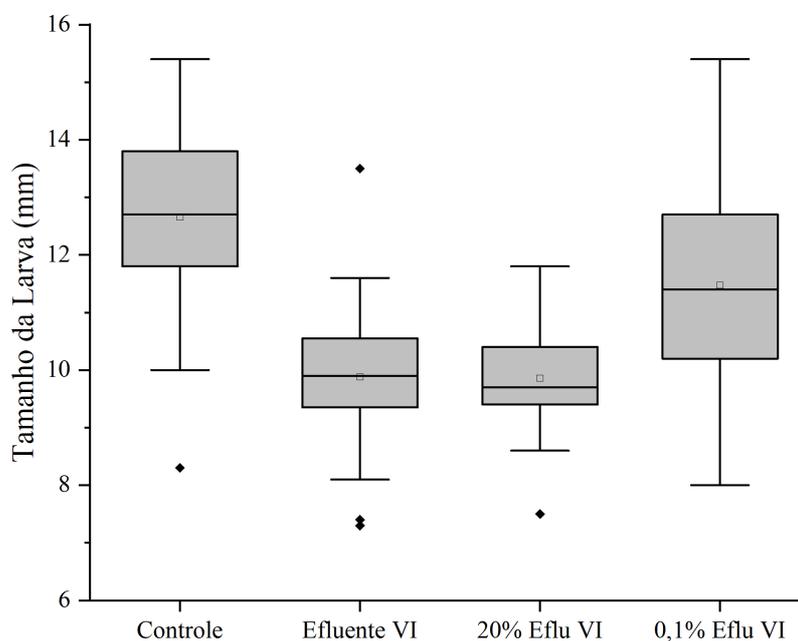
A concentração  $CL_{50}$  de diluição do efluente na fase VI<sub>b</sub> para o organismo *C. sancticaroli* não pode ser estabelecida, por conter apenas duas diluições nessa fase de operação do reator, e por ambas não apresentarem efeito letal.

O teste de toxicidade crônica para a espécie *C. sancticaroli* foi realizado com duração de 10 dias, sendo assim esses organismos foram estudados desde I instar (24 horas após a eclosão da desova) até quase completarem o ciclo de vida na fase larval (IV instar), analisando o crescimento dessas larvas (Figura 64).

As larvas foram avaliadas por meio do tamanho médio, que resultaram em  $12,54 \pm 1,61$  mm para teste-controle e  $11,92 \pm 1,66$  mm para diluição de 0,1% do efluente (Figura 64). A partir desses resultados, pode-se inferir que os tamanhos das larvas, encontrado no teste-controle e na diluição do efluente em 0,1%, são similares, ou seja, a diluição do efluente em 0,1% não é tóxica para as larvas a ponto de interferir no seu desenvolvimento.

Já o efluente e a diluição de 20% do efluente assemelham-se entre si, apresentando tamanho médio das larvas de  $9,88 \pm 1,35$  mm e  $9,86 \pm 0,96$  mm respectivamente, no qual nota-se que ocorreu interferência no desenvolvimento dessas larvas, caracterizando efeito toxicidade desse efluente para o crescimento do inseto *C. sancticaroli*.

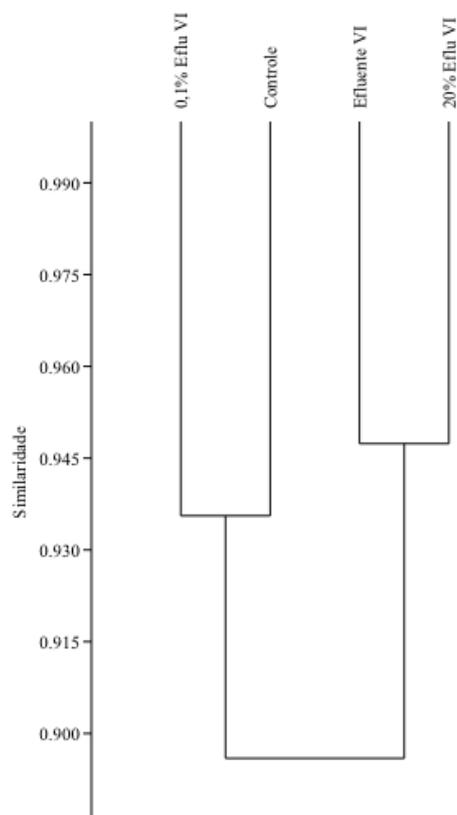
Figura 64 – Boxplot representando o crescimento em tamanho das larvas do inseto *C. sancticaroli* na fase VI<sub>b</sub> da operação do reator



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente cofenético 0,80) (Figura 65), aponta similaridade de 94% entre o controle e a diluição de 0,1% do efluente, podendo inferir que não há alteração no desenvolvimento das larvas do *C. sancticaroli* quando expostas ao efluente do reator diluído em 0,1%. Assim como, o agrupamento hierárquico aponta 95% de semelhança entre o efluente e 20% de diluição do efluente. Apesar da diluição de 20% do efluente não causar letalidade ao *C. sancticaroli*, sua exposição causa efeito ao tamanho corporal dos mesmos, podendo influenciar na sua fase adulta (alada).

Figura 65 – Análise de Cluster para o tamanho das larvas do *C. sancticaroli* na fase VI<sub>b</sub> de operação do reator



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise estatística ANOVA one-way, com teste *posteriori* de Tukey para comprimento das larvas do *C. sancticaroli*, aponta que não há diferença estatística entre o controle e a diluição de 0,1% do efluente nas fases VI<sub>b</sub>, e que não há diferença estatística entre o efluente e a diluição de 20%. A partir desses resultados, pode-se verificar que o efluente VI<sub>b</sub> e sua diluição de 20% causam efeitos deletérios no tamanho da larva de *C. sancticaroli*.

Os resultados dos bioensaios de toxicidade crônica com LAS padrão evidenciaram que esse surfactante não causa efeito no tamanho corporal das larvas do *C. sancticaroli*, permitindo inferir que a elevada complexidade do efluente do reator e sua diluição de 20% podem, entre seus efeitos tóxicos, ser causadores de interferências alimentares para esses organismos, a ponto de causar efeitos deletérios em seu crescimento larval. De acordo com

Zilli et al. (2008) o tamanho das larvas de *Chironomus* pode ser afetado por muitos fatores, entre eles, a variação de temperatura, estabilidade de habitat e a disposição de recursos. Segundo Trivinho-Strixino (1982), a quantidade de alimento disponível na fase larval dos Chironomidae está diretamente relacionada com o tempo de desenvolvimento até a fase adulta, podendo acarretar desequilíbrio ecológico com o atraso na emergência de adultos. Além do mais, sabe-se que os *Chironomus* constroem casulos em formatos de tubos, utilizando-se das glândulas salivares e das partículas do substrato (WALSHE, 1951), auxiliando na aquisição de alimento e oxigênio (BRACKENBURY, 2000), além de fornecer proteção contra predadores (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995) e substâncias tóxicas presentes na água. Desta maneira, observa-se, a partir dos resultados com as amostras do reator, que mesmo com a formação do casulo utilizada como proteção e alimentação, a elevada toxicidade do efluente VI<sub>b</sub>, e sua diluição de 20%, afetaram o tamanho das larvas de *C. sancticaroli*.

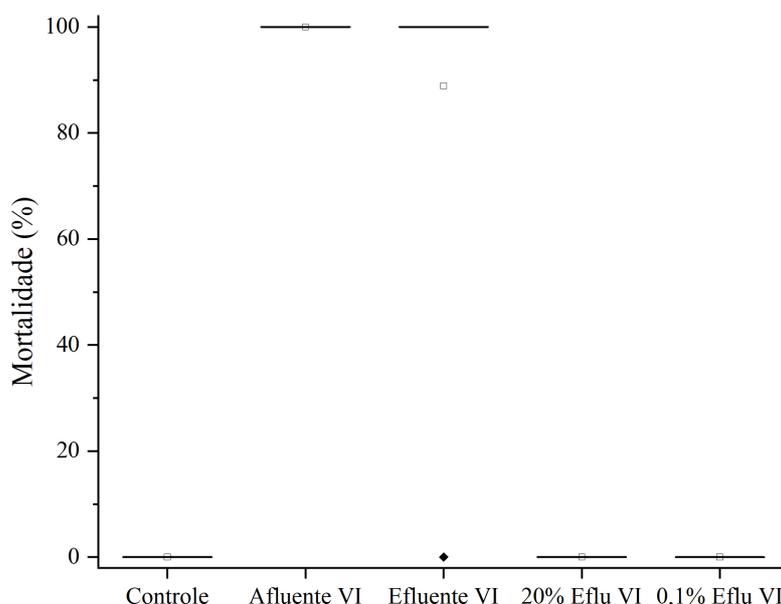
A partir dos resultados observados nesta pesquisa, pode-se verificar que o retardo no crescimento larval do inseto *C. sancticaroli* pode estar associado à variação de compostos nas amostras do efluente. Braga e Varesche (2014), ao caracterizar a água residuária de lavanderia, observaram a presença de metais, como ferro e zinco em elevadas concentrações. Dornfeld (2006) observou em seu estudo, que larvas de *Chironomus* expostas a sedimentos contendo altas concentrações de metais, atrasam o seu crescimento larval, há o aparecimento de deformidades bucais, há atraso na emergência de adultos e baixa capacidade reprodutiva. Esse mesmo autor afirma que a diminuição no crescimento e na reprodução são resultantes de ruptura bioquímica da membrana plasmática devido à exposição a contaminantes.

Pode-se ressaltar que, o atraso no desenvolvimento larval desse inseto pode ocasionar efeitos negativos para essa população. Nolte (1993), afirma que as fêmeas mais bem desenvolvidas podem produzir mais ovos, e que a variação na produção de ovos podem estar relacionada com o tempo de desenvolvimento do aparelho ovopositor na fase larval. Conseqüentemente, o retardo no desenvolvimento dessas larvas pode afetar o seu desenvolvimento adulto, ocasionando redução na fecundidade potencial das fêmeas.

### 6.3.2.2 *Allonais inaequalis*

Para a espécie *A. inaequalis*, o teste de toxicidade crônica, com duração de 10 dias, apresentou mortalidade de 100% no afluente, bem como no efluente do reator, caracterizando elevada toxicidade do reator para essa espécie (Figura 66). Ao utilizar as diluições do efluente do reator, pode-se notar que ocorreu diminuição da toxicidade, porém não foi observada mortalidade para os oligoquetos nas diluições de 20 e 0,1% do efluente.

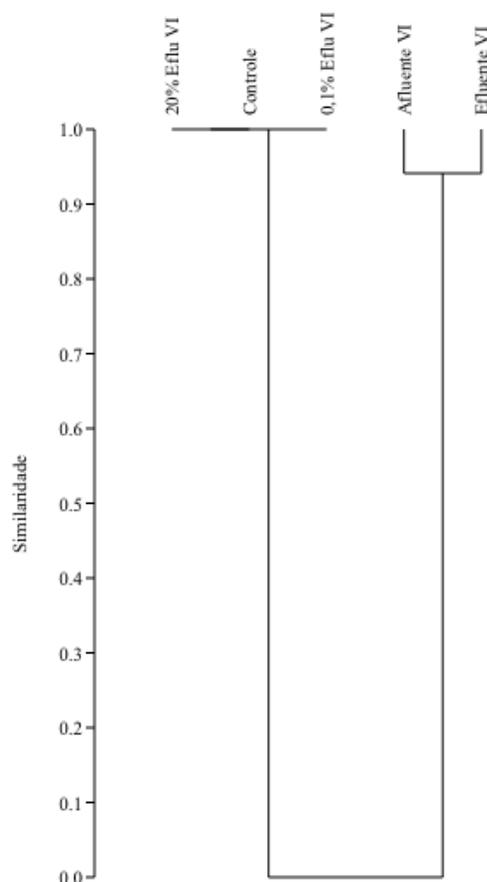
Figura 66 – Boxplot representando a mortalidade da espécie *A. inaequalis* na fase VI<sub>b</sub> da operação do reator



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise de Cluster (coeficiente cofenético 1), apontou similaridade entre o controle e as diluições de 20 e 0,1% do efluente na fase VI<sub>b</sub> de operação do reator (Figura 67), as diluições do efluente, bem como o controle não causaram efeito letal ao *A. inaequalis*. Já o afluente e o efluente do reator se assemelham em torno de 90%, inferindo-se elevada toxicidade do efluente, mesmo nessa fase de operação do reator, para o oligoqueto.

Figura 67 – Análise de Cluster para a fase VI<sub>b</sub> de operação do reator com *A. inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

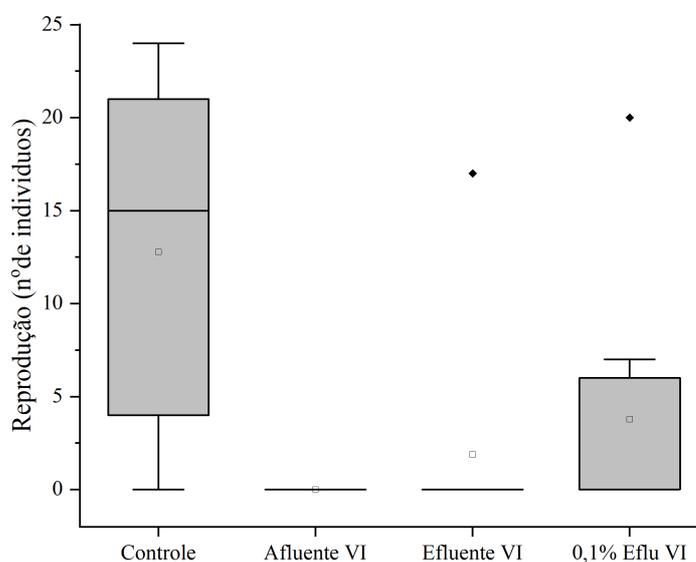
A hipótese nula ( $H_0$  - de que o afluente, efluente e as diluições de 20 e 0,1% do efluente na fase VI<sub>b</sub> de operação do reator têm o mesmo efeito tóxico ao *A. inaequalis*), foi rejeitada pela análise de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Assim, utilizou-se um teste *posteriori* de Dunn, para verificar quais amostras apresentam comportamentos distintos. O teste de Dunn, demonstrou que não há diferença estatística entre o teste controle e as diluições de 20 e 0,1% do efluente VI<sub>b</sub>. Evidenciando a elevada toxicidade do efluente VI<sub>b</sub>, mesmo pós-tratamento para o oligoqueto *A. inaequalis*.

A concentração CENO foi determinada após a confirmação de similaridade estatística (teste de Dunn) entre o controle e as amostras do efluente, determinando o valor de CENO como a diluição de 20% do efluente VI<sub>b</sub> e o CEO como o efluente bruto, sem diluição.

A concentração  $CL_{50}$  de diluição do efluente na fase  $VI_b$  para o organismo *A. inaequalis* não pode ser estabelecida, por conter apenas duas diluições nessa fase de operação do reator, e por ambas não apresentarem efeito letal.

A espécie *A. inaequalis* foi analisada por meio de sua reprodução média, por se tratar de um organismo que se reproduz rapidamente, em ambientes favoráveis. No teste-controle 12,71 organismos foram contabilizados, em média, no final de 10 dias. Para o afluente e o efluente, nenhum organismo foi observado, e na diluição de 0,1% do efluente 3,77 organismos foram contabilizados (Figura 68). A partir desses resultados pode-se observar que a reprodução dos *A. inaequalis* com 0,1% de diluição do efluente  $VI_b$ , evidencia elevada toxicidade quando comparada ao teste controle, mesmo apontando capacidade dessa espécie em se reproduzir em meio com 0,1% do efluente do reator.

Figura 68 – Boxplot representando a reprodução da espécie *A. inaequalis* na fase  $VI_b$  da operação do reator

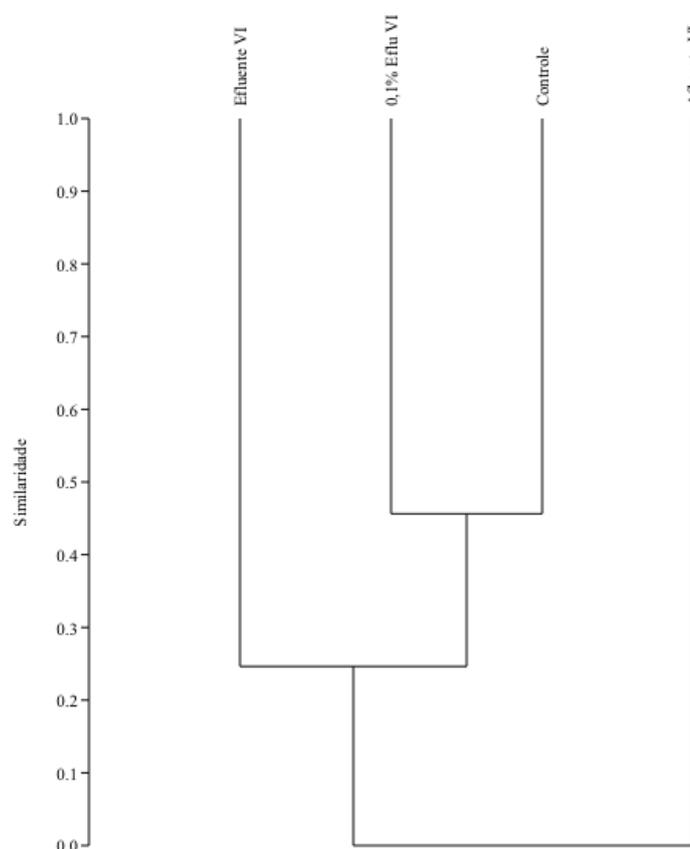


Fonte: Elaborado pela Autora

Observa-se na análise de Cluster (Coeficiente cofenético 0,99) (Figura 69), que a diluição de 0,1% do efluente apresenta efeitos tóxicos na reprodução dos *A. inaequalis* quando comparado ao controle, por esse fato a similaridade entre essas amostras é de 45%.

O efluente se assemelha em torno de 25% do controle, indicando que o reator ainda apresenta elevado efeito tóxico nessa fase de operação. Nota-se que o afluente do reator é extremamente tóxico à biota aquática, dessa forma não apresenta similaridade com as demais amostras.

Figura 69 – Análise de Cluster com similaridade entre a fase VI<sub>b</sub> de operação do reator na reprodução da espécie *A. inaequalis*



Fonte: Elaborado pela Autora

A análise estatística de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) para a reprodução do *A. inaequalis* demonstra que há diferença estatística entre o teste controle e as amostras do reator, evidenciando elevada toxicidade na fase VI<sub>b</sub> de operação do reator, na reprodução desse oligoqueto.

### 6.3.2.3 Impacto ambiental

A espécie de oligoqueto *A. inaequalis*, parece ser mais sensível que a espécie de inseto *C. sancticaroli*, tanto para o LAS padrão sob exposições aguda quanto crônica. Esse mesmo resultado foi observado em teste de toxicidade crônica para o efluente na fase VI<sub>b</sub> de operação do reator. Vários fatores podem estar atrelados a essa sensibilidade, como a complexidade da amostra do efluente e hábitos de vida das espécies testadas. E, ainda, a utilização de sedimento nos testes com *C. sancticaroli*, pode ter influenciado na variação da sensibilidade e biodisponibilidade aos contaminantes (CASELLATO; NEGRISOLO, 1989; FEDERLE; VENTULLO, 1990; MÄENPÄÄ; KUKKONEN, 2006; WESTALL et al., 1999).

Segundo Keizer et al. (1995), a toxicidade de uma substância é determinada pela capacidade de cada espécie em metabolizar esse produto, por diferentes vias, sendo de maneira mais ou menos tóxicas. Para Livingstone (1998), todos os animais possuem um conjunto de enzimas de biotransformação, geralmente presentes no fígado (vertebrados) ou tecidos associados ao processamento de alimentos (invertebrados). A principal função destas enzimas é converter xenobióticos em metabólitos excretáveis solúveis em água. A biotransformação afeta a disposição, o tempo de residência e a toxicidade (desintoxicação ou ativação) de um xenobiótico em um organismo. A partir dos resultados obtidos em sua pesquisa, Livingstone (1998), observou que organismos de espécies distintas apresentaram variações metabólicas a compostos xenobióticos, no qual aponta os insetos com maior capacidade de biotransformação quando comparados a crustáceos e moluscos. Verrengia Guerrero et al. (2002), realizaram testes de toxicidade aguda com oligoqueto, crustáceo e inseto, para verificar a capacidade de biotransformação desses organismos quando expostos aos contaminantes: 2,4-diclorofenol; 2,4,5-triclorofenol; pentaclorofenol; pireno; Fenpropidina e Trifluralina. Esses autores observaram que a larva da espécie *C. riparius*, mostrou uma notável capacidade de metabolizar todos os compostos que lhes foram apresentados, diferentemente do oligoqueto *L. variegatus* e do bivalve *S. corneum*, que apresentaram baixa capacidade de biotransformação desses contaminantes. Para o LAS, não há relatos na literatura a respeito da capacidade de biotransformação desse surfactante por invertebrados.

A diversidade dos compostos presentes nas amostras do reator, estudado nesta pesquisa, evidencia a dificuldade em determinar qual contaminante e/ou subprodutos

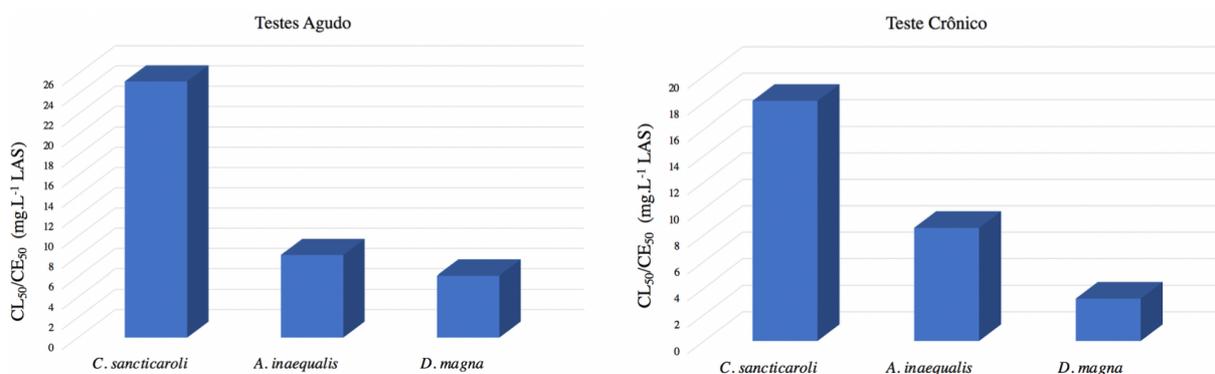
causam maiores efeitos tóxicos à biota aquática, ressaltando a importância no tratamento dos efluentes domésticos e industriais, e seus métodos de análises, pois, com essa pesquisa, fica claro que as análises ecotoxicológicas são de fundamental importância na avaliação do tratamento desses efluentes.

## 6.4 Considerações Finais

Os bioensaios de toxicidade, em sua maioria, são realizados em regiões temperadas, utilizando-se espécies e condições experimentais representativas dessas regiões, resultando incongruências nos resultados, quando comparados às regiões tropicais. Desta forma, muitos autores recomendam a utilização de espécies nativas em testes ecotoxicológicos sob condições representativas de regiões tropicais (BUCH et al., 2017; GAZONATO NETO et al., 2018; GHOSE et al., 2014; HOWE; REICHELTT-BRUSHETT; CLARK, 2014; MANSANO et al., 2018; ROCHA et al., 2018b; SILVANO; BEGOSSI, 2016). Para melhor representação dos resultados ecotoxicológicos, realizados nessa pesquisa, foram utilizados uma espécie de microcrustáceo *D. magna*, originária de região temperada do hemisfério norte, bem descrita na literatura mundial, e dois invertebrados nativos, *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*.

Os testes de toxicidade aguda e crônica com o LAS padrão apontaram que a espécie *C. sancticaroli* é mais tolerante às concentrações de LAS quando comparada às espécies *A. inaequalis* e *D. magna*. Os resultados evidenciaram que as concentrações  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  para organismos-teste, variam entre 25,25; 8,13 e 6,11  $mg.L^{-1}$  de LAS para os testes de toxicidade aguda e de 18,11; 8,56 e 3,21  $mg.L^{-1}$  de LAS para testes de toxicidade crônica (Figura 70). Essa variação de sensibilidade pode estar relacionada a diversos fatores, como: ciclo de vida do organismo, biodisponibilidade do contaminante, alimentação e estilo de vida da espécie. E com esses resultados, a Hipótese A foi comprovada, confirmando que o LAS padrão causa efeitos negativos à biota aquática.

Figura 70 –  $CL_{50}/CE_{50}$  dos testes de toxicidade aguda e crônica utilizando o LAS padrão.



Fonte: Elaborado pela Autora

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Resolução N° 357, complementada e alterada pela Resolução N° 430, preconiza limite máximo permissível de 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de LAS, em águas doces de Classe 1 (CONAMA, 2005, 2011). Considerando os valores de CL<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub> e CENO observados no presente estudo e os relatados na literatura, pode-se concluir que a concentração máxima permitida de surfactante LAS, estabelecida pelo CONAMA, é adequada para a proteção da biota de água doce. No entanto, de acordo com o Relatório Anual de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2017 (CETESB, 2018), em média, 14% das amostras da rede de corpos d'água monitorados pelo órgão estadual CETESB estão acima do valor permitido nessa norma. Valores recentes de concentrações de LAS, encontrados em estações de tratamento de esgoto, apontam variação de 1 a 18 mg.L<sup>-1</sup> (MUNGRAY; KUMAR, 2009).

Além disso, as lavanderias comerciais estão entre os segmentos com maior consumo de surfactante aniônico, e seus efluentes são comumente liberados diretamente no meio ambiente ou em estações de tratamento de efluentes. Braga e Varesche (2014) ao analisar os efluentes de lavanderia comercial encontraram concentrações de LAS variando 12 a 1024 mg.L<sup>-1</sup>. Faria et al. (2017), em seus estudos, observaram variações na concentração de LAS em água de lavanderia de 94,44 a 919,93 mg.L<sup>-1</sup>, e em esgoto doméstico da USP (*Campus 2*) no Município de São Carlos, de 1,4 a 8,7 mg.L<sup>-1</sup> LAS. Com essas variações na concentração de LAS encontradas na literatura, para estações de tratamento de efluentes, denota-se a importância no tratamento desse surfactante.

A partir dessa problemática, na Hipótese B desse trabalho, foi realizada a avaliação ecotoxicológica de amostras complexas de água residual de lavanderia comercial combinada com esgoto doméstico, contendo LAS, antes e depois de passar por tratamento em reator de leito fluidificado. Os resultados dos bioensaios de toxicidade aguda apontaram elevada toxicidade do efluente para os organismos-teste, em todas as fases de operação do reator. Por se tratar de amostra com alto teor de complexidade em sua composição, inferiu-se que não foi apenas o LAS que causou efeito tóxico para as espécies selecionadas. Para melhor compreensão dos resultados, foram feitas diluições dos efluentes a partir da III fase de operação, entretanto, os efluentes mesmo diluídos a 0,1% apresentaram-se tóxicos aos invertebrados. Apenas na fase VI<sub>b</sub> da operação do reator, observou-se menor mortalidade dos organismos-teste quando expostos aos efluentes diluídos, evidenciando a complexidade do tratamento dessas amostras contendo LAS, e a importância das análises ecotoxicológicas na avaliação do tratamento de efluentes, pela representação dos efeitos

tóxicos à biota aquática. A partir desses resultados, é possível refutar a Hipótese B por não diminuir o impacto ambiental das amostras do reator pós tratamento para a biota aquática.

## 7 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que as cartas-controle seguiram um padrão nas faixas de sensibilidade para as substâncias de referência, permitindo a comparação dos resultados com a literatura.

A partir dos resultados obtidos com LAS padrão (Hipótese A), fica evidente a toxicidade aguda para as três espécies utilizadas como organismos-teste, embora cada espécie tenha diferido em sua suscetibilidade a esse agente tóxico. As espécies *C. sancticaroli* e *A. inaequalis* foram menos sensíveis ao LAS do que a espécie *D. magna*.

A toxicidade crônica do LAS padrão afetou a reprodução da espécie *D. magna*. Em concentrações sub-letais, o efeito de indução na reprodução de neonatos ficou evidente, e o oposto aconteceu para concentrações mais elevadas desse surfactante. Para o organismo *A. inaequalis* o efeito de inibição na reprodução ocorreu em concentrações elevadas do LAS. O desenvolvimento das larvas de *C. sancticaroli* não teve alteração em exposição crônica desse surfactante.

O teste de longa duração, utilizando a espécie *C. sancticaroli*, permitiu a verificação detalhada na toxicidade do LAS em três gerações desse organismo. Conclui-se que não há diferença estatística entre as gerações quanto ao tamanho das larvas, entretanto evidencia a diferença estatística entre as gerações para o tamanho das asas das fêmeas, indicando que esses organismos podem sofrer alterações fisiológicas quando a exposição ao contaminante é contínua.

Com os resultados obtidos em relação a Hipótese B, foi possível concluir que mesmo com tratamento das amostras complexas, contendo LAS, o efluente do reator continuada sendo tóxico para a biota aquática, desta forma essa hipótese foi refutada.

As mudanças das fases de operação do reator analisadas influenciaram na toxicidade para os diferentes organismos-teste. Essa toxicidade ocorre dependente das condições metabólicas, levando à elaboração de três hipóteses: as rotas metabólicas do reator produziram subprodutos tóxicos; a degradação incompleta de compostos, em algumas fases, pode ter interrompido a rota metabólica em compostos secundários mais tóxicos; e o afluente utilizado (água residuária de lavanderia comercial combinada com

esgoto doméstico) é de alta complexidade, pois já possui, em sua composição, compostos tóxicos além do LAS.

Cada organismo-teste apresentou respostas diferentes, principalmente em experimentos utilizando as diluições dos efluentes. Para *A. inaequalis* e *D. magna* foi possível observar mortalidade de 100% para todos afluentes e efluentes, demonstrando alta toxicidade. Uma exceção pôde ser observada para os *C. sancticaroli*, o qual apresentou menor mortalidade, nas primeiras fases de operação do reator, descrevendo assim sua capacidade de sobrevivência em ambientes tóxicos. Em geral, foi possível avaliar a diferença de toxicidade, nas diferentes fases de funcionamento do reator, por meio das diluições dos compostos, em que as fases menos tóxicas, com diminuição na mortalidade, foram observadas a partir de diluição de 50%, e para as fases mais tóxicas, a partir de 20%. É possível ainda concluir que a fase VI<sub>b</sub> apresentou diminuição da mortalidade dos organismos-teste possibilitando a realização de testes mais longos, avaliando o desenvolvimento das espécies. Entretanto, ao se analisar os testes de toxicidade crônica, observa-se que o efluente dos reatores, mesmo após o tratamento, ainda causa efeito negativo nos organismos-teste avaliados.

Além disso, conclui-se que os bioensaios ecotoxicológicos são uma importante ferramenta na complementação das análises de monitoramento de reatores, e que os invertebrados *Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis* e *Daphnia magna* apresentam sensibilidade aguda e crônica ao LAS padrão e às amostras do reator, e podem ser recomendados como organismos-teste em bioensaios de no monitoramento.

## 8 SUGESTÕES

- Utilização de testes ecotoxicológicos para complementar as análises de monitoramento de reatores;
- Avaliação da remoção do LAS, em amostras complexas, em outros reatores (anaeróbios e aeróbios), e outras técnicas de tratamento de efluentes (lagoas, lodos ativados, entre outros), utilizando bioensaios de toxicidade como análise complementar;
- Utilização de 5 organismos-teste de diferentes funções tróficas da cadeia alimentar, para obter resultados mais precisos de efeitos tóxicos específicos e aumentar a probabilidade de respostas tóxicas a organismos-teste de diferentes sensibilidades.

**REFERÊNCIAS**

ABEL, P. D. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. **Journal of Fish Biology**, v. 6, n. 3, p. 279–298, 1974.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com algas (Chlophyceae). p. 1–33, 2018.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). p. 1–33, 2016.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12716** Água - Ensaio de toxicidade aguda com peixes - Parte III - Sistema de fluxo contínuo Método. p. 1–17, 1993.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). p. 1–26, 2017.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). p. 1–31, 2016.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15469** Ecotoxicologia — Coleta, preservação e preparo de amostras. p. 1–22, 2015.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com peixes. p. 1–29, 2016.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15537** Ecotoxicologia terrestre — Toxicidade aguda — Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). p. 1–17, 2004.

AHMED, I.; HAFIZ, M. N. I.; DHAMA, K. Enzyme-Based Biodegradation of Hazardous Pollutants – An Overview. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 5, n. 4, p. 402–411, 2017.

ALLAN, J. D.; DANIELS, R. E. Life table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to Kepone. **Marine Biology**, v. 66, n. 2, p. 179–184, 1982.

ALLEE, W. C.; EMERSON, A. E.; PARK, O.; et al. **Principles of Animal Ecology**. London, 1949.

ÁLVAREZ-MANZANEDA, I.; RAMOS-RODRÍGUEZ, E.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M. J.; et al. Acute and chronic effects of magnetic microparticles potentially used in lake restoration on *Daphnia magna* and *Chironomus* sp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, p. 437–444, 2017.

ALVES, R. G.; MARCHESE, M. R.; ESCARPINATI, S. C. Oligochaeta (Annelida, Clitellata) in lotic environments in the state of São Paulo, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 96, n. 4, p. 431–435, 2006.

AMORIM, A. C. F.; CASTILLO, A. R. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores da qualidade da água do baixo rio Perequê, Cubatão, São Paulo, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, v. 7, n. 1, p. 16–22, 2009.

ANDRADE, M. V. F.; SAKAMOTO, I. K.; CORBI, J. J.; et al. Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 246–254, 2017.

AQUILINO, M.; SÁNCHEZ-ARGÜELLO, P.; MARTÍNEZ-GUITARTE, J. L. Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **Environmental Pollution**, v. 232, p. 563–570, 2018.

ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 55–64, 2005.

ARENZON, A.; PEREIRA NETO, T. J.; GERBER, W. **Manual Sobre Toxicidade em Efluentes Industriais**. Porto Alegre, 2011.

ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges. **The Chironomidae**, p. 194–224, 1995.

BARBER, L. B.; LOYO-ROSALES, J. E.; RICE, C. P.; et al. Endocrine disrupting alkylphenolic chemicals and other contaminants in wastewater treatment plant effluents, urban streams, and fish in the Great Lakes and Upper Mississippi River Regions. **Science of The Total Environment**, v. 517, p. 195–206, 2015.

BARBIERI, E. Efeito dos Surfactantes DSS e LAS-C12 sobre o Camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensi*, Pérez-Farfante, 1967). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, n. January 2008, p. 35–40, 2008.

BARRIOS-ESTRADA, C.; DE JESÚS ROSTRO-ALANIS, M.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, B. D.; et al. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516–1531, 2018.

BASTOS, D. N. **Toxicidade do Herbicida Glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***, 2013. 39f. Dissertação (Mestrado) - Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.

BAUN, A.; KLØFT, L.; BJERG, P. L.; et al. Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with landfill leachate. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 2046, 1999.

BAYNE, B L; CLARKE, K R; GRAY, J S. Background and rationale to a practical workshop on biological effects of pollutants. **Marine Ecology Progress Series**, v. 46, n. 4, p. 1–5, 1988.

BELY, A. E.; SIKES, J. M. Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 4, p. 1464–1469, 2010.

BELY, A. E.; WRAY, G. A. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression. **Development** (Cambridge, England), v. 128, n. 14, p. 2781–2791, 2001.

BELY, A. E.; WRAY, G. A. Molecular phylogeny of nauidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 1, p. 50–63, 2004.

BERGÉ, A.; WIEST, L.; BAUDOT, R.; et al. Occurrence of multi-class surfactants in urban wastewater: contribution of a healthcare facility to the pollution transported into the sewerage system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 10, p. 9219–9229, 2018.

BERNA, J. L.; CASSANI, G.; HAGER, C.D.; et al. Anaerobic Biodegradation of Surfactants – Scientific Review. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 44, n. 6, p. 312–347, 2007.

BERNEGOSSI, A. C.; CARDOSO, B. N. P.; FELIPE, M. C.; et al. *Chironomus sancticaroli* generation test: A new methodology with a Brazilian endemic insect. **MethodsX**, v. 6, p. 92–97, 2019.

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. **CETESB** - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, p. 44, 2013.

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

BIGARDI, T. A. Russo; NUNES, A. J. Tezotto; CARRA, L. P.; et al. Destino de surfactantes aniônicos em ETE do tipo lagoa aerada seguida de lagoa de decantação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 45–48, 2003.

BILAL, M.; ASGHER, M.; HAFIZ, M. N. I; et al. Bio-based degradation of emerging endocrine-disrupting and dye-based pollutants using cross-linked enzyme aggregates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7035–7041, 2017.

BILAL, M.; ASGHER, M.; HAFIZ, M. N. I; et al. Bio-catalytic performance and dye-based industrial pollutants degradation potential of agarose-immobilized MnP using a Packed Bed Reactor System. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 582–590, 2017.

BILAL, M.; ASGHER, M.; PARRA-SALDIVAR, R.; et al. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review. **Science of The Total Environment**, v. 576, p. 646–659, 2017.

BILAL, M.; HAFIZ, M. N. I; HU, H.; et al. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. **Journal of Environmental Management**, v. 188, p. 137–143, 2017.

BIRGE, W. J.; BLACK, J. A.; WESTERMAN, A. G. Short-term fish and amphibian embryo-larval tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents: Complex mixtures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 807–821, 1985.

BITTENCOURT, S.; AISSE, M. M.; SERRAT, B. M.; et al. Sorção de poluentes orgânicos emergentes em lodo de esgoto. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 43–53, 2016.

BONANI, F. **Avaliação de Deformidades Morfológicas em Larvas de *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) na Bacia do Rio Piracicaba e Sua Aplicação no Biomonitoramento**, 2010. 82f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

BORSATO, D.; GALÃO, O. F.; MOREIRA, I. **Detergentes naturais e sintéticos: um guia técnico**. Londrina: Editora UEL, 1999.

BRACK, W.; DULIO, V.; SLOBODNIK, J. The NORMAN Network and its activities on emerging environmental substances with a focus on effect-directed analysis of complex environmental contamination. **Environmental Sciences Europe**, v. 24, n. 1, p. 29, 2012.

BRACKENBURY, J. Locomotory modes in the larva and pupa of *Chironomus plumosus* (Diptera, Chironomidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 12, p. 1517–1527, 2000.

BRAGA, J. K. **Caracterização microbiana e degradação de surfactante aniônico em reator anaeróbio de leito fluidificado com água residuária de lavanderia**, 2014. 257f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2014.

BRAGA, J. K.; VARESCHE, M B A. Commercial Laundry Water Characterisation. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 05, n. 01, p. 8–16, 2014.

BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. Wiley, Ecological Society of America. **Ecological Monographs**, v. 27, p. 325–349, 1957.

BRUIJNING, M.; TEN BERGE, A. C. M.; JONGEJANS, E. Population-level responses to temperature, density and clonal differences in *Daphnia magna* as revealed by integral projection modelling. **Functional Ecology**, v. 32, n. 10, p. 2407–2422, 2018.

BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; CORREIA, M. E. F.; et al. Ecotoxicology of mercury in tropical forest soils: Impact on earthworms. **Science of The Total Environment**, v. 589, p. 222–231, 2017.

CALLISTO, M.; MARQUES, M. M.; BARBOSA, F. A. R. Deformities in larval *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) from the Piracicaba River, southeast Brazil. **SIL Proceedings**, 1922-2010, v. 27, n. 5, p. 2699–2702, 2000.

CAMPOS, B.; JORDÃO, R.; RIVETTI, C.; 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, 2016.

CANTEIRO, R. de C. S. A.; ALBERTONI, E. F. Growth of immature *Chironomus calligraphus* (Diptera, Chironomidae) in laboratory conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1279–1286, 2011.

CANTON, J. H.; SLOOFF, W. Substitutes for Phosphate containing washing products: Their toxicity and biodegradability in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 11, n. 9, p. 891–907, 1982.

CAROSIA, M. F.; OKADA, D. Y.; SAKAMOTO, I. K.; et al. Microbial characterization and degradation of linear alkylbenzene sulfonate in an anaerobic reactor treating wastewater containing soap powder. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 316–323, 2014.

CASELLATO, S.; NEGRISOLO, P. Acute and Chronic effects of an anionic surfactant on some freshwater tubificid species. **Hydrobiologia**, v. 180, p. 243–252, 1989.

CESAR, D. A. S.; HENRY, R. Is similar the distribution of Chironomidae (Diptera) and Oligochaeta (Annelida, Clitellata) in a river and a lateral fluvial area? **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 29, 2017.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DO SÃO PAULO. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo**. p. 1–374, 2014.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DO SÃO PAULO. **Relatório Anual de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 2017**. p. 303, 2018.

CHAPMAN, P. M. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in Ecological Risk Assessment. **Hydrobiologia**, v. 463, p. 149–169, 2001.

CHATHA, S. A. S.; ASGHER, M.; HAFIZ, M. N. I. Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 16, p. 14005–14018, 2017.

CLETO FILHO, S. E. N.; WALKER, I. Efeitos da ocupação urbana sobre a macrofauna. **Acta Amazonica**, v. 31, p. 69–89, 2001.

CLEUVERS, M.; GOSER, B.; RATTE, H-T. Life-strategy shift by intraspecific interaction in *Daphnia magna*: change in reproduction from quantity to quality. **Oecologia**, v. 110, n. 3, p. 337–345, 1997.

COMOTTO, R. M.; KIMERLE, R. A.; SWISHER, R. D. Bioconcentration and Metabolism of Linear Alkylbenzene Sulfonate by Daphnids and Fathead Minnows. In: **Aquatic Toxicology: Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology**, p. 232–250, 1979.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA n 357. Brasil, 2005.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA n 430/2011. Brasil, 2011.

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

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

CORBI, J. J.; SAMPAIO, E. V.; DE RIBEIRO, V. R.; et al. Levantamento preliminar da entomofauna aquática do Centro Nacional de Pesquisa de peixes tropicais. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 13, p. 71–83, 2000.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; SANTOS, A.; et al. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 61–65, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomid species are sensitive to sugarcane cultivation. **Hydrobiologia**, v. 785, n. 1, p. 91–99, 2017.

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, 2008.

CORCORAN, E.; NELLEMAN, C.; BAKER, E.; et al. **Sick Water: The Central Role of Wastewater Management in Sustainable development**. p. 87, 2010.

CORTELEZZI, A.; PAGGI, A. C.; RODRÍGUEZ, M.; et al. Taxonomic and nontaxonomic responses to ecological changes in an urban lowland stream through the use of Chironomidae (Diptera) larvae. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 7, p. 1344–1350, 2011.

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

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

COWGILL, U.M. Critical analysis of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. **Water Research**, v. 21, n. 12, p. 1453–1462, 1987.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**, v. 28, n. 5, p. 337–348, 2002.

DA COSTA, J. B.; RODGHER, S.; DANIEL, L. A.; 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.

DA SILVA COELHO, K.; ROCHA, O. Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 4, p. 812–818, 2010.

DANIELS, R. E.; ALLAN, J. D. Life Table Evaluation of Chronic Exposure to a Pesticide. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 38, n. 5, p. 485–494, 1981.

DANKS, H. V. Some effects of photoperiod, temperature, and food on emergence in three species of Chironomidae (diptera). **The Canadian Entomologist**, v. 110, n. 03, p. 289–300, 1978.

DAUGHTON, C. G. Non-regulated water contaminants: emerging research. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, n. 7–8, p. 711–732, 2004.

DE BISTHOVEN, L. J.; NUYTS, P.; GODDEERIS, B.; et al. Sublethal parameters in morphologically deformed *Chironomus* larvae: clues to understanding their bioindicator value. **Freshwater Biology**, v. 39, n. 1, p. 179–191, 1998.

DE SOUZA BEGHELLI, F. G.; LOPEZ-DOVÁL, J. C.; ROSA, A. H.; et al. Lethal and sublethal effects of metal-polluted sediments on *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino, 1981. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 286–299, 2018.

DE WOLF, W.; FEIJTEL, T. Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. **Chemosphere**, v. 36, n. 6, p. 1319–1343, 1998.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011.

DELFORNO, T. P.; LACERDA, G. V.; SIERRA-GARCIA, I. N.; et al. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 587–588, p. 389–398, 2017.

DELFORNO, T. P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; et al. Effect of biomass adaptation to the degradation of anionic surfactants in laundry wastewater using EGSB reactors. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 114–121, 2014.

DELL'ACQUA, Marcelo Marques. **Efeito do hormônio 17 $\alpha$ -etinilestradiol sobre a biologia de *Chironomus sancticaroli* (Chironomidae, Diptera)**. 2017, 73f, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2017.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; et al. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549–1558, 1998.

DI VEROLI, A.; SANTORO, F.; PALLOTTINI, M.; et al. Deformities of chironomid larvae and heavy metal pollution : From laboratory to field studies. **Chemosphere**, v. 112, p. 9–17, 2014.

DI VEROLI, A.; SELVAGGI, R.; PELLEGRINO, R. M.; et al. Sediment toxicity and deformities of chironomid larvae in Lake Piediluco (Central Italy). **Chemosphere**, v. 79, n. 1, p. 33–39, 2010.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1st. ed. São Carlos, p. 153–184, 2006.

DORNFELD, C. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FRACÁCIO, R.; et al. Comparação de Bioensaios Laboratoriais e “in situ” Utilizando *Chironomus xanthus* na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 2, p. 161–166, 2006.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais**. Dissertação de mestrado, 2006, 239f, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2006.

DORNFELD, C. B.; RODGHER, S.; NEGRI, R. G.; et al. *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) as a Sensitive Tropical Test Species in Laboratory Bioassays Evaluating Metals (Copper and Cadmium) and Field Testing. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 1, p. 42–50, 2019.

DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, L. L.; MAYOR, M .S.; et al. Degradation of detergent (linear alkylbenzene sulfonate) in an anaerobic stirred sequencing-batch reactor containing granular biomass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 2, p. 129–134, 2010.

EBERT, D. **Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia***. Universidad Basel, Switzerland, 2005.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. **EFSA Journal**, v. 11, n. 7, p. 268, 2013.

EICHHORN, P.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W.; et al. Incomplete degradation of linear alkylbenzene sulfonate surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters. **Science of The Total Environment**, v. 284, n. 1–3, p. 123–134, 2002.

ELDER, J. F. **Applicability of ambient toxicity testing to national or regional water-quality assessment**. Madison, 1989.

ENVALL, I.; KÄLLERSJÖ, M.; ERSÉUS, C. Molecular evidence for the non-monophyletic status of Naidinae (Annelida, Clitellata, Tubificidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 2, p. 570–584, 2006.

ENVIRONMENT AGENCY. **Endocrine-disrupting substances in the environment: What should be done?**, 1998.

ERICKSON, B. E. Analyzing the Ignored Environmental Contaminants. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 7, p. 140–145, 2002.

ERSÉUS, C.; ENVALL, I.; DE WIT, P.; et al. Molecular data reveal a tropical freshwater origin of Naidinae (Annelida, Clitellata, Naididae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 115, p. 115–127, 2017.

EUROPEAN UNION. Commission Recommendation concerning good environmental practice for household laundry detergents **480EC**, 1998.

EUROPEAN UNION. Commission Recommendation for the labelling of detergents and cleaning products **542EEC**, 1989.

EUROPEAN UNION. Directive 2000/60/EC DECISION No **2455/2001/EC** of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001, 2001.

FARIA, C. V.; DELFORNO, T. P.; OKADA, D. Y.; et al. Evaluation of anionic surfactant removal by anaerobic degradation of commercial laundry wastewater and domestic sewage. **Environmental Technology**, p. 1–9, 2017.

FEDERLE, T. W.; VENTULLO, R. M. Mineralization of surfactants by the microbiota of submerged plant detritus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 333–339, 1990.

FEIJTEL, T. C. J.; VAN DE PLASSCHE, E. J. Environmental risk characterization of major surfactants used in the Netherlands. **Dutch Soap Association**, 1995.

FERREIRA, F. V. **Influência do Co-Substrato na Remoção de Sabão em Pó de Uso Doméstico e na Diversidade Microbiana de Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado**, 2012, 89f, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2012.

FILHO, R. W. R.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283–288, 2007.

FONSECA, A. L. **Avaliação da Qualidade da Água do Rio Piracicaba/SP Através de Testes de Toxicidade com Invertebrados**, 1997, 220f, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 1997.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 4, p. 319–328, 2004.

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

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute Toxicity Tests with the Tropical Cladoceran *Pseudosida ramosa*: The Importance of Using Native Species as Test Organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 241–249, 2011.

GAGO-FERRERO, P.; ALONSO, M. B.; BERTOZZI, C. P.; et al. First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 11, p. 5619–5625, 2013.

GAZONATO NETO, A. J.; MOREIRA, R. A.; LIMA, J. C. S.; et al. Freshwater neotropical oligochaetes as native test species for the toxicity evaluation of cadmium, mercury and their mixtures. **Ecotoxicology**, 2018.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015.

GEROMEL-COSTA, C. G. Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir de adsorventes à base de quitosana e celulose e os seus efeitos na biota aquática, 2018, 154f, Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2018.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.; et al. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. **CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**, p. 17, 1990.

GHOSE, S. L.; DONNELLY, M. A.; KERBY, J.; et al. Acute toxicity tests and meta-analysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2114–2119, 2014.

GIESY, J. P.; HOKE, R. A. Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection and Test Design. **Journal of Great Lakes Research**, v. 15, n. 4, p. 539–569, 1989.

GONÇALVES, R. F.; CHERNICHARO, C. A. De L.; ONOFRE, C.; et al. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme. **PROSAB**, p. 171–278, 2001.

GORNI, G. R.; ALVES, R. da G. Naididae (Annelida, Oligochaeta) associated with *Pomacea bridgesii* (Reeve) (Gastropoda, Ampullaridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1059–1061, 2006.

GOSER, B.; RATTE, H. T. Experimental evidence of negative interference in *Daphnia magna*. **Oecologia**, v. 98, n. 3–4, p. 354–361, 1994.

GRANATTO, C. F.; MACEDO, T. Z.; GEROSA, L. E.; et al. Scale-up evaluation of anaerobic degradation of linear alkylbenzene sulfonate from sanitary sewage in expanded

granular sludge bed reactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 138, p. 23–32, 2019.

HAIGH, S. D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Science of The Total Environment**, v. 185, n. 1–3, p. 161–170, 1996.

HAMMER; H., DAT; R., P. D. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. p. 9, 2001.

HAMPEL, M.; MAUFFRET, A.; PAZDRO, K.; et al. Anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sediments from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic Sea, Poland) and its environmental implications. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 10, p. 6013–6023, 2012.

HAQ, I.; RAJ, A. Endocrine-Disrupting Pollutants in Industrial Wastewater and Their Degradation and Detoxification Approaches. In: *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*. **Singapore: Springer Singapore**, p. 121–142, 2019.

HARRIS, C. A.; BRIAN, J. V.; POJANA, Giulio; et al. The influence of a surfactant, linear alkylbenzene sulfonate, on the estrogenic response to a mixture of (xeno) estrogens in vitro and in vivo. **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 95–98, 2009.

HARRIS, K. D. M.; BARTLETT, N. J.; LLOYD, V. K. *Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism. **Genetics Research International**, v. 2012, p. 1–8, 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.

HEBERT, P. D. N. The population biology of *daphnia* (crustacea, daphnidae). **Biological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 387–426, 1978.

HENAU, H. De; MATHIJS, E.; HOPPING, W. D. Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS) in Sewage Sludges, Soils and Sediments: Analytical Determination and Environmental Safety Considerations. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3–4, p. 279–293, 1986.

HERA - Human and Environmental Risk Assessment on Ingredients of Household Cleaning Products. **Linear Alkylbenzene Sulphonate**, 2013.

HIGASHI, E. S. **Bioensaios de toxicidade da água do efluente de Biofiltros em areia como ferramenta de avaliação da qualidade da água para fins de consumo**, 2016, 79f, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2016.

HODGES, G.; ROBERTS, D. W.; MARSHALL, S. J.; et al. The aquatic toxicity of anionic surfactants to *Daphnia magna*-A comparative QSAR study of linear alkylbenzene sulphonates and ester sulphonates. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1443–1450, 2006.

HOLT, M. S.; WATERS, J.; COMBER, M. H. I.; et al. AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulphonate (LAS). **Water Research**, v. 29, n. 9, p. 2063–2070, 1995.

HOUSE, W. A.; FARR, I. S. Adsorption of sulphonates from detergent mixtures on potassium kaolinite. **Colloids and Surfaces**, v. 40, p. 167–180, 1989.

HOWE, P. L.; REICHEL-TBRUSHETT, A. J.; CLARK, M. W. Investigating lethal and sublethal effects of the trace metals cadmium, cobalt, lead, nickel and zinc on the anemone *Aiptasia pulchella*, a cnidarian representative for ecotoxicology in tropical marine environments. **Marine and Freshwater Research**, v. 65, n. 6, p. 551, 2014.

HUDSON, L. A.; CIBOROWSKI, J. J. H. Spatial and taxonomic variation in incidence of mouthpart deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae: Chironomini). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 53, n. 2, p. 297–304, 1996.

HUERTA, B.; JAKIMSKA, A.; LLORCA, M.; et al. Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. **Talanta**, v. 132, p. 373–381, 2015.

HWANG, H.; FISHER, S. W.; KIM, K.; et al. Assessing the toxicity of dodecylbenzene sulfonate to the midge *Chironomus riparius* using body residues as the dose metric. **Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC**, v. 22, n. 2, p. 302–12, 2003.

IANNACONE, J.; ALVARIÑO, L. Efecto del detergente doméstico alquil aril sulfonato de sodio lineal (LAS) sobre la mortalidad de tres caracoles dulceacuícolas en el Perú. **Ecología Aplicada**, v. 1, n. 1–2, p. 81, 2002.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Linear alkylbenzene sulfonates and related compounds**. 169. ed. Genova, 1996.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the Environment. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 61, n. 1, 2010.

JARDIM, W. F. A contaminação dos recursos hídricos por esgoto doméstico e industrial. **Química Nova**, v. 15, p. 144–146, 1992.

JONUSAITE, S.; KELLY, S. P.; DONINI, A. The physiological response of larval *Chironomus riparius* (Meigen) to abrupt brackish water exposure. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 3, p. 343–352, 2011.

KEIZER, J.; D'AGOSTINO, G.; NAGEL, R.; et al. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. **Science of The Total Environment**, v. 171, n. 1–3, p. 213–220, 1995.

KIMERLE, R. A. Aquatic and terrestrial ecotoxicology of linear alkylbenzene sulfonate. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 26, n. 2, p. 169–176, 1989.

KOIVISTO, S. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? **Environmental Pollution**, v. 90, n. 2, p. 263–267, 1995.

KUHLMANN, M. L.; HAYASHIDA, C.Y.; ARAÚJO, R. P. A. Using *Chironomus* (Chironomidae: Diptera) mentum deformities in environmental assessment. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 12, p. 55–61, 2000.

KWAK, I.-S.; LEE, W. Mouthpart Deformity and Developmental Retardation Exposure of *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) to Tebufenozide. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 5, p. 859–865, 2005.

LARRAS, F.; BOUCHEZ, A.; RIMET, F.; et al. Using Bioassays and Species Sensitivity Distributions to Assess Herbicide Toxicity towards Benthic Diatoms. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 444 – 458, 2012.

LATINI, G.; DE FELICE, C.; PRESTA, G.; et al. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 14, p. 1783–1785, 2003.

LEE, B. K. H. The effect of anionic and nonionic detergents on soil microfungi. **Canadian Journal of Botany**, v. 48, n. 3, p. 583–589, 1970.

LEVIN, S. A.; HARWELL, M. A.; KELLY, J. R.; et al. Ecotoxicology: Problems and Approaches. In: Ecotoxicology: Problems and Approaches. New York, NY: **Springer New York**, p. 3–7, 1989.

LEWIS, M. A. Chronic Toxicities of Surfactants and Detergent Builders to Algae: A Review and Risk Assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 1964, p. 123–140, 1990.

LEWIS, M. A. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: A review and risk assessment. **Water Research**, v. 25, n. 1, p. 101–113, 1991.

LEWIS, M. A. The effects of mixtures and other environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to freshwater and marine life. **Water Research**, v. 26, n. 8, p. 1013–1023, 1992.

LI, H.-Q.; SCHRÖDER, H. F. Surfactants – standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 7–8, p. 391–398, 2000.

LI, X.; YIN, P.; ZHAO, L. Phthalate esters in water and surface sediments of the Pearl River Estuary: distribution, ecological, and human health risks. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 19341–19349, 2016.

LIN, C. Y.; CHEN, P. C.; HSIEH, C. J.; et al. Positive Association between Urinary Concentration of Phthalate Metabolites and Oxidation of DNA and Lipid in Adolescents and Young Adults. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44318, 2017.

LIU, J.; WANG, W. X. Reduced cadmium accumulation and toxicity in *Daphnia magna* under carbon nanotube exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 12, p. 2824–2832, 2015.

LIU, N.; WANG, Y.; YANG, Q.; et al. Probabilistic assessment of risks of diethylhexyl phthalate (DEHP) in surface waters of China on reproduction of fish. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 482–488, 2016.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p. 43–49, 1998.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; MONTAGNER, C. C.; DE ALBURQUERQUE, A. F.; et al. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 1307–1324, 2017.

LOPEZ DE ALDA, M. J.; DÍAZ-CRUZ, S.; PETROVIC, M.; et al. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 503–526, 2003.

LÜCHMANN, K. H.; CLARK, M. S.; BAINY, A. C. D.; et al. Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. **Aquatic Toxicology**, v. 166, p. 10–20, 2015.

MACEDO, T. Z.; DELFORNO, T. P.; BRAGA, J. K.; et al. Robustness and Microbial Diversity of a Fluidized Bed Reactor Employed for the Removal and Degradation of an Anionic Surfactant from Laundry Wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, v. 143, n. 9, p. 04017062, 2017.

MACEDO, T. Z.; OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; et al. The comparative advantages of ethanol and sucrose as co-substrates in the degradation of an anionic surfactant: microbial community selection. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 10, p. 1835–1844, 2015.

MACEDO, T. Z.; JORGE, G. G. F.; MARQUES, A. L. V.; et al. Co-digestão de água residuária de lavanderia comercial e esgoto doméstico: otimização das condições operacionais em reator de leito fluidificado (RLF). In: **Temático FAPESP (Processo 15/06246-7): Aplicação do conceito de Biorrefinaria a Estações de Tratamento Biológico**

de Águas Residuárias: o Controle da Poluição Ambiental aliado à Recuperação de Matéria e Energia, 2018.

MACKEY, A. P. Growth and Development of Larval Chironomidae. **Oikos**, v. 28, n. 2/3, p. 270, 1977.

MÄENPÄÄ, K.; KUKKONEN, J. V. K. Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 329–338, 2006.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, 2008.

MAKI, A. W.; BISHOP, W. E. Acute toxicity studies of surfactants to *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, n. 5, p. 599–612, 1979.

MALTBY, L.; BLAKE, N.; BROCK, T. C. M.; et al. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 379, 2005.

MALTBY, L.; BROCK, T. C. M.; VAN DEN BRINK, P. J. Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 19, p. 7556–7563, 2009.

MANSANO, A. S.; DE OLIVEIRA, L. L. D.; ROCHA, O. Avaliação da toxicidade aguda do antibiótico ciprofloxacina aos cladóceros *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii*. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 12, p. 76–88, 2012.

MANSANO, A. S.; MOREIRA, R. A.; DORNFELD, H. C.; et al. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13335–13346, 2018.

MARTÍN, J.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; HIDALGO, F.; et al. Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry an. **Talanta**, v. 166, p. 336–348, 2017.

MARTINS, S. E.; BIANCHINI, A. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 7, p. 1866, 2011.

MATSUNAGA, T.; UEKI, F.; OBATA, K.; et al. Fully automated immunoassay system of endocrine disrupting chemicals using monoclonal antibodies chemically conjugated to bacterial magnetic particles. **Analytica Chimica Acta**, v. 475, n. 1–2, p. 75–83, 2003.

MAUL, J. D.; FARRIS, J. L.; LYDY, M. J. Interaction of chemical cues from fish tissues and organophosphorous pesticides on *Ceriodaphnia dubia* survival. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 1, p. 90–97, 2006.

MCLACHLAN, A. The Relationship between Habitat Predictability and Wing Length in Midges (Chironomidae). **Oikos**, v. 44, n. 3, p. 391, 1985.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**. 5th. ed. New York, 2016.

MICHIE, M. G. Use of the Bray-Curtis similarity measure in cluster analysis of foraminiferal data. **Journal of the International Association for Mathematical Geology**, v. 14, n. 6, p. 661–667, 1982.

MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera)**, 2016, 110f, Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2016.

MOORE, M. N.; LIVINGSTONE, D. R.; WIDDOWS, J.; et al. Molecular, Cellular and Physiological Effects of Oil-Derived Hydrocarbons on Molluscs and Their Use in Impact Assessment. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 316, n. 1181, p. 603–623, 1987.

MORAIS, G. S.; PESENTI, E. C.; CESTARI, M. M.; et al. Genotoxic effect of Phenanthrene on *Chironomus sanctiparoli* (Diptera: Chironomidae). **Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 323–328, 2014.

MORAIS, S S; MOLOZZI, J; VIANA, a L; et al. Diversity of larvae of littoral Chironomidae (Diptera: Insecta) and their role as bioindicators in urban reservoirs of different trophic levels. **Brazilian journal of biology**, v. 70, n. 4, p. 995–1004, 2010.

MOREIRA, R. A.; MANSANO, A. S.; SILVA, L. C.; et al. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2014.

MORIARTY, F. Ecotoxicology. **Human Toxicology**, v. 7, n. 5, p. 437–441, 1988.

MOTTERAN, F.; NADAI, B. M.; BRAGA, J. K.; et al. Metabolic routes involved in the removal of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) employing linear alcohol ethoxylated and ethanol as co-substrates in enlarged scale fluidized bed reactor. **Science of The Total Environment**, v. 640–641, p. 1411–1423, 2018.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 981–987, 2009.

NADDY, R. B.; COHEN, A. S.; STUBBLEFIELD, W. A. The interactive toxicity of cadmium, copper, and zinc to *Ceriodaphnia dubia* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 809–815, 2015.

NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Marine Pollution and Microbial Remediation. **Singapore: Springer Singapore**, 2017.

NESEMANN, H.; SHARMA, S.; SINHA, R. K. Aquatic Annelida (Polychaeta, Oligochaeta, Hirudinea) of the Ganga River and adjacent water bodies in Patna (India: Bihar), with description of a new leech species (Family Salifidae). **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Serie B**, v. 105, p. 139–187, 2004

NEWMAN, M. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 3rd. ed. New York, 2010.

NHRIEC- NATIONAL HYDROLOGY RESEARCH INSTITUTE ENVIRONMENT CANADA. **The use of Morphological Deformities in Chiomid Larvae for Biological Effects Monitoring**, 1990.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NOLTE, U. Egg masses of Chironomidae (Diptera). A review including new observations and a preliminary key. **Entomologica Scandinavica Supplement**, v. 43, p. 75, 1993.

NOVELLI, A.; VIEIRA, B. H.; CORDEIRO, D.; et al. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 201**: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, p. 1–25, 2011.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 203**: Fish, Acute Toxicity Test. p. 1–10, 1992.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 211**: *Daphnia magna* Reproduction Test, p. 1–25, 2012.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 235**: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test. p. 1–17, 2011.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No.202: *Daphnia* sp.** Acute Immobilisation Test, p. 1–12, 2004.

OECD SIDS – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)**. SIDS Initial Assessment Report, p. 1–357, 2005.

OKADA, D. Y.; DELFORNO, T. P.; ESTEVES, A. S.; et al. Optimization of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) degradation in UASB reactors by varying bioavailability of LAS, hydraulic retention time and specific organic load rate. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 125–133, 2013.

OLIVEIRA, L. L.; COSTA, R. B.; SAKAMOTO, I. K.; et al. Las degradation in a fluidized bed reactor and phylogenetic characterization of the biofilm. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 3, p. 521–529, 2013.

OLIVEIRA, L. L. D. E. **Remoção de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) e Caracterização Microbiana em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado**, 2010, 178f, Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidades de São Paulo, São Carlos, 2010.

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

OLMSTEAD, A. W.; LEBLANC, G. A. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 2107–2113, 2000.

OYA, M.; ORITO, S.; ISHIKAWA, Y.; et al. Effects of Water Hardness and Existence of Adsorbent on Toxic Surface Tension of Surfactants for Aquatic Species. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 5, p. 237–243, 2007.

PARK, K.; PARK, J.; KIM, J.; et al. Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 439–446, 2010.

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno Sulfonato Linear: uma abordagem ambiental e analítica. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1038–1046, 2006.

PERALES, J. A.; MANZANO, M. A.; SALES, D.; et al. Biodegradation kinetics of LAS in river water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 43, n. 4, p. 155–160, 1999.

PETERS, R. W.; MONTEMAGNO, C. D.; SHEM, L.; et al. Surfactant Screening of Diesel-Contaminated Soil. **Hazardous Waste and Hazardous Materials**, v. 9, n. 2, p. 113–136, 1992.

PIMENTA, S. M.; BOAVENTURA, G. R.; PEÑA, A. P.; et al. Estudo da qualidade da água por meio de bioindicadores bentônicos em córregos da área rural e urbana. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 1, 2016.

PITTINGER, C. A.; WOLTERING, D. M.; MASTERS, J. A. Bioavailability of sediment-sorbed and aqueous surfactants to *Chironomus riparius* (midge). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1023–1033, 1989.

PRATS, D.; RUIZ, F.; VAZQUEZ, B.; et al. LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: Ecological implications. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 1599–1608, 1993.

PREUSS, T. G.; HAMMERS-WIRTZ, M.; HOMMEN, U.; et al. Development and validation of an individual based *Daphnia magna* population model: The influence of crowding on population dynamics. **Ecological Modelling**, v. 220, n. 3, p. 310–329, 2009.

PRINTES, L. B.; FERNANDES, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 424–430, 2011.

RAGHAV, M.; EDEN, S.; MITCHELL, K.; et al. Contaminants of Emerging Concern in Water. **Water Resources Research Center**, p. 1–12, 2013.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2nd. ed. Washington, 1995.

REBECHI, D. **Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao Malathion**. 2012, 85f, Dissertação (Mestrado) – Entomologia, Universidades Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

REBECHI, D. **Padrão ontogenético da cápsula cefálica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino-Strixino, 1981 (Chironomidae: diptera) sob condições de laboratório**, 2009, 40f, Monografia – Ciências Biológicas, Universidades Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

REBECHI, D.; NAVARRO-SILVA, M. A. Setting the reference for the use of *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) as bioindicator: Ontogenetic pattern of larval head structures. **Zoologia**, 2012.

RENO, U.; DOYLE, S. R.; MOMO, F. R.; et al. Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 784–793, 2018.

REYNOLDS, S. K; BENKE, A. C. Temperature-dependent growth rates of larval midges (Diptera: Chironomidae) from a southeastern U.S. stream. **Hydrobiologia**, v. 544, n. 1, p. 69–75, 2005.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 12, n. 4, p. 283–294, 1997.

RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; MORAIS, G. 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.

RICHARDI, V. S.; REBECHI, D.; ARANHA, J. M. R.; et al. Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. **Liver**, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RICHARDI, V. S.; VICENTINI, M.; REBECHI, D.; et al. Morpho-histological characterization of immature of the bioindicator midge *Chironomus sancticaroli* Strixino and Strixino (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, n. 3, p. 240–250, 2015.

ROBERT MICHAUD, M.; BENOIT, J. B.; LOPEZ-MARTINEZ, G.; et al. Metabolomics reveals unique and shared metabolic changes in response to heat shock, freezing and desiccation in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 4, p. 645–655, 2008.

ROCHA, A. C.; CAMACHO, C.; ELJARRAT, E.; et al. Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Environmental Research**, v. 161, p. 354–363, 2018.

ROCHA, O. **The influence of food-temperature combinations on the duration of development, body size, growth and fecundity of *Daphnia* species**. University of London, 1983.

ROCHA, O.; GAZONATO-NETO, A. J.; LIMA, J. C. S.; et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 834–844, 2018.

ROQUE, F. O.; CORREIA, L. C. S.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; et al. A review of chironomidae studies in lentic systems in the state of São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1–19, 2004.

RUHÍ, A.; ACUÑA, V.; BARCELÓ, D.; et al. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 250–259, 2016.

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

RUXTON, G. D.; BEAUCHAMP, G. Time for some a priori thinking about post hoc testing. **Behavioral Ecology**, v. 19, n. 3, p. 690–693, 2008.

SÁNCHEZ-ORTÍZ, J. R.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Comparative population growth of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 45, n. 1, p. 37–41, 2010.

SANTOS, V. S. V.; CAMPOS, C. F.; DE CAMPOS JÚNIOR, E. O.; et al. Acute ecotoxicity bioassay using *Dendrocephalus brasiliensis*: alternative test species for monitoring of contaminants in tropical and subtropical freshwaters. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 635–640, 2018.

SANZ, I.; FDZ-POLANCO, F. Low temperature treatment of municipal sewage in anaerobic fluidized bed reactors. **Water Research**, v. 24, n. 4, p. 463–469, 1990.

SAPONE, A.; CANISTRO, D.; VIVARELLI, F.; et al. Perturbation of xenobiotic metabolism in *Dreissena polymorpha* model exposed in situ to surface water (Lake Trasimene) purified with various disinfectants. **Chemosphere**, v. 144, p. 548–554, 2016.

SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Review of Recent Ecotoxicological Studies on Cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 41, n. 8, p. 1417–1430, 2006.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 15, 2014.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações Agudas**. 4. ed. São Paulo, 1991.

SEEDHER, N. In vitro study of the effect of paracetamol on drug-protein interactions. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 512–515, 2001.

SHCHERBAKOVA, V. A.; LAURINAVICHUS, K. S.; AKIMENKO, V. K. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. **Chemosphere**, v. 39, n. 11, p. 1861–1870, 1999.

SHUHAIMI-O, M.; NADZIFAH, Y.; UMIRAH, N.S.; et al. Toxicity of Metals to an Aquatic Worm, *Nais elinguis* (Oligochaeta, Naididae). **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 122–132, 2012.

SIGMA - ALDRICH®. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos**, 2016.

SILVA, J. S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; et al. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v. 23, n. 2, p. 409–418, 2015.

SILVA, L. G.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; et al. Quantificação de Alquilbenzeno Linear Sulfonato em estação de tratamento de efluentes e rios por cromatografia líquida de alta eficiência e extração em fase sólida. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 334–341, 2017.

SILVA, S. V.; DIAS, A. H. C.; DUTRA, E. S.; et al. The impact of water pollution on fish species in southeast region of Goiás, Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 79, n. 1, p. 8–16, 2016.

SILVANO, R. A. M.; BEGOSSI, A. From Ethnobiology to Ecotoxicology: Fishers' Knowledge on Trophic Levels as Indicator of Bioaccumulation in Tropical Marine and Freshwater Fishes. **Ecosystems**, v. 19, n. 7, p. 1310–1324, 2016.

SIQUEIRA, G. W.; BRAGA, E. S. Avaliação na dinâmica e biodisponibilidade para biota de ZN, NI, CO e PB em sedimentos da plataforma continental do amapá, nordeste da amazônia. In: **Ecotoxicologia perspectivas para o século XXI**. Rima. São Carlos, p. 115–126, 2000.

SMITH, D. P.; KENNEDY, J. H.; DICKSON, K. L. An evaluation of a nauidid oligochaete as a toxicity test organism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 1459–1465, 1991.

SOPILNIAK, A.; ELKAYAM, R.; ROSSIN, A. V.; et al. Emerging organic pollutants in the vadose zone of a soil aquifer treatment system: Pore water extraction using positive displacement. **Chemosphere**, v. 190, p. 383–392, 2018.

SOUZA, J. P.; VENTURINI, F. P.; SANTOS, F.; et al. Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. **Chemosphere**, v. 190, p. 218–224, 2018.

SPIES, M.; REISS, F. **Catalog and bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera)**. München, 1996.

STOLLEWERK, A. The water flea *Daphnia* - a “new” model system for ecology and evolution? **Journal of Biology**, v. 9, n. 2, p. 21, 2010.

STRIXINO, G.; TRIVINHO-STRIXINO, S. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 28, n. 4, p. 177–180, 1985.

STRUEWING, K. A.; LAZORCHAK, J. M.; WEAVER, P. C.; et al. Part 2: Sensitivity comparisons of the mayfly *Centroptilum triangulifer* to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* using standard reference toxicants; NaCl, KCl and CuSO<sub>4</sub>. **Chemosphere**, v. 139, p. 597–603, 2015.

SUCAHYO, D.; VAN STRAALLEN, N. M.; KRAVE, A.; et al. Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, n. 3, p. 421–427, 2008.

SUEITT, A. P. E.; YAMADA-FERRAZ, T. M.; OLIVEIRA, A. F.; 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, 2015.

SWARTJES, F. A.; RUTGERS, M.; LIJZEN, J. P. A.; et al. State of the art of contaminated site management in The Netherlands: Policy framework and risk assessment tools. **Science of The Total Environment**, v. 427–428, p. 1–10, 2012.

SWEDMARK, M.; BRAATEN, B.; EMANUELSSON, E.; et al. Biological effects of surface active agents on marine animals. **Marine Biology**, v. 9, n. 3, p. 183–201, 1971.

TANAKA, Y.; NAKANISHI, J. Effect of linear Alkylbenzene Sulfonate on population growth of *Daphnia galeata*: A life table evaluation. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 344–348, 2001.

TANAKA, Y.; NAKAMURA, K.; ODA, S.; et al. Estimation of population-level effect of the endocrine disruptor pyriproxyfen in *Daphnia magna* by using changes in sex ratio and reproductive output. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 463–475, 2018.

TATARAZAKO, N.; ODA, S. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 197–203, 2007.

TAYLOR, M. J. Effect of diet on the sensitivity of *Daphnia magna* to Linear Alkylbenzene Sulfonate. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium**. ASTM International, p. 53–72, 1985.

THE SOAP AND DETERGENT ASSOCIATION. **Linear Alkylbenzene Sulfonate**. New York, 1996.

TOYOTA, K.; MIYAKAWA, H.; HIRUTA, C.; et al. Methyl farnesoate synthesis is necessary for the environmental sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. **Journal of Insect Physiology**, v. 80, p. 22–30, 2015.

TRIPATHY, D. B.; MISHRA, A.; CLARK, J.; et al. Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 2, p. 112–130, 2018.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; CORREIA, L. C. S.; SONODA, K. Phytophilous Chironomidae (Diptera) and other macroinvertebrates in the ox-bow Infernão Lake (Jataí Ecological Station, Luiz Antônio, SP, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 3, p. 527–535, 2000.

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. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae)**. Universidade de São Paulo, 1980.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Chironomidae (Diptera) do Rio Ribeira (divisa dos Estados de São Paulo e Paraná) numa avaliação ambiental faunística. **Entomología y Vectores**, v. 12, n. 2, p. 243–253, 2005.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, p. 183–189, 1982.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151–173, 1977.

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

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, 2002.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates**. p. 1–9, 2000.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. OCSPP 850.1010: **Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids**. p. 1–17, 2016.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. OCSPP 850.1300: **Daphnid Chronic Toxicity Test**. p. 1–24, 2016.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Technical support document for water quality-based toxic control**. p. 1–344, 1991.

VAN DE PLASSCHE, E. J.; DE BRUIJN, J. H. M.; STEPHENSON, R. R.; et al. Predicted no-effect concentrations and risk characterization of four surfactants: Linear Alkyl Benzene Sulfonate, alcohol ethoxylates, alcohol ethoxylated sulfates, and soap. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 2653–2663, 1999.

VAN LEEUWEN, C. J. **Risk Assessment of Chemicals**. 2nd. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

VANOVERBEKE, J.; DE GELAS, K.; DE MEESTER, L. Habitat size and the genetic structure of a cyclical parthenogen, *Daphnia magna*. **Heredity**, v. 98, n. 6, p. 419–426, 2007.

VERDONSCHOT, P. F. M.; SMIES, M.; SEPERS, A. B. J. The distribution of aquatic oligochaetes in brackish inland waters in the SW Netherlands. **Hydrobiologia**, v. 89, n. 1, p. 29–38, 1982.

VERGE, C.; MORENO, A.; BRAVO, J.; et al. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS). **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1749–1757, 2001.

VERRENGIA GUERRERO, N.R.; TAYLOR, M.G.; DAVIES, N.A.; et al. Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 117, n. 3, p. 523–530, 2002.

VERSTEEG, D. J.; RAWLINGS, J. M. Bioconcentration and toxicity of dodecylbenzene sulfonate (C12 LAS) to aquatic organisms exposed in experimental streams. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 237–246, 2003.

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticarloi* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento, 2012, 91f, Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidades de São Paulo, São Paulo, 2012.

VYSTAVNA, Y.; FRKOVA, Z.; CELLE-JEANTON, H.; et al. Priority substances and emerging pollutants in urban rivers in Ukraine: Occurrence, fluxes and loading to transboundary European Union watersheds. **Science of The Total Environment**, v. 637–638, p. 1358–1362, 2018.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; et al. **Principles of Ecotoxicology**. 4th. ed. New York, 2012.

WALSHE, B. M. The Feeding habits of certain Chironomid larvae (subfamily Tendipedinae). **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 121, p. 63–79, 1951.

WANG, K. S.; LU, C. Y.; CHANG, S. H. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by *Daphnia magna* embryo assay. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 520–528, 2011.

WANG, Q.; CHEN, M.; SHAN, G.; et al. Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. **Science of The Total Environment**, v. 598, p. 814–820, 2017.

WANG, Y.; WANG, T.; BAN, Y.; et al. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Modulates Antioxidant Enzyme Activity and Gene Expression in Juvenile and Adult *Daphnia magna*.

**Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 145–156, 2018.

WARNE, M. S. J.; SCHIFKO, A. D. Toxicity of Laundry Detergent Components to a Freshwater Cladoceran and Their Contribution to Detergent Toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 2, p. 196–206, 1999.

WEBER, R. Sistemas Costeiros e Oceânicos. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 137–143, 1992.

WESTALL, J. C.; CHEN, H.; ZHANG, W.; et al. Sorption of Linear Alkylbenzene Sulfonates on sediment materials. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 18, p. 3110–3118, 1999.

WINTERSEN, A. M.; VAN VLAARDINGEN, P.; TRAAS, T. A. **A Program to Calculate Hazardous Concentrations and Fraction Affected, Based on Normally Distributed Toxicity Data**. 2004.

WOODBURN, K. B.; SESTON, R. M.; KIM, J.; et al. Benthic invertebrate exposure and chronic toxicity risk analysis for cyclic volatile methylsiloxanes: Comparison of hazard quotient and probabilistic risk assessment approaches. **Chemosphere**, v. 192, p. 337–347, 2018.

XIANG, N.; ZHAO, C.; DIAO, X.; et al. Dynamic responses of antioxidant enzymes in pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 184–190, 2017.

YING, G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**, v. 32, n. 3, p. 417–431, 2006.

YUSHMANOV, V. E.; PERUSSI, J. R.; IMASATO, H.; et al. Interaction of papaverine with micelles of surfactants with different charge studied by <sup>1</sup>H-NMR. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1189, n. 1, p. 74–80, 1994.

ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, 2006.

ZILLI, F. L.; MONTALTO, L.; PAGGI, A. C.; et al. Biometry and life cycle of *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera, Chironomidae) in laboratory conditions. **Interciencia**, v. 33, n. 10, p. 767–770, 2008.

## APÊNDICE A – Composição Química de Vitaminas e Alimento

### Tetramin® – peixes tropicais

O alimento preparado Tetramin®, foi utilizado na alimentação dos organismos-teste. Esse alimento foi macerado (Figura 71) e depois oferecido nas proporções 5g.L<sup>-1</sup> para *C. sancticaroli* e 2g.L<sup>-1</sup> para *A. inaequalis*.

Figura 71 – Alimento Tetramin® macerado em gral com pistilo de porcelana



Fonte: Acervo pessoal

O alimento Tetramin® é composto por: Farinha de peixe, levedura seca de cana, arroz integral, farinha de camarão, Glúten de trigo, farelo de aveia, óleo de peixe refinado, proteína de batata, farelo de soja, óleo de soja refinado, algas marinhas calcárias, sorbitol, lecitina de soja, fosfato monocálcico, vitamina C, etoxiquin, beta caroteno, bixina, corantes artificiais amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, azul indigotina e vermelho eritrozina.

**Fishtamin® Sera**

Alimento complementar para o cultivo de *D. magna*, fornecido na concentração de 1 gota por Litro (Tabela 18).

Tabela 18 – Composição química do Fishtamin®

Vitamina	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
A	545.000
B1	2.000
B2	1.500
B6	2.000
B12	2
C	55.000
D3	100.000
E	4.700
K	510
D-pantotenato de Cálcio	5.000
Ácido fólico	480
Nicotinamida	10.000

## APÊNDICE B – Composição e Modo de preparação da Água reconstituída de Elevada Dureza

A água reconstituída utilizada como meio para o cultivo de *Daphnia magna* e para o preparo das soluções-teste (água de diluição) é de dureza elevada, e de moderada basicidade, com valores entre 175 e 225 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e pH entre 7,6 e 8,0.

Para o preparo de 1L da água reconstituída são utilizadas 4 soluções, nos seguintes volumes:

- Solução 1: 3,2mL
- Solução 2: 0,8mL
- Solução 3: 0,8mL
- Solução 4: 0,8mL
- Água destilada: completar para 1L, ou seja, 994,4mL

As soluções são preparadas da seguinte forma:

- Solução 1: 73,5g de CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O

Dissolver e diluir completando para 1000mL com água destilada

- Solução 2: 123,3g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

Dissolver e diluir completando para 1000mL com água destilada

- Solução 3: 5,8g de KCl

Dissolver e diluir completando para 1000 mL com água destilada

- Solução 4: 64,8g NaHCO<sub>3</sub>

Dissolver e diluir completando para 1000 mL com água destilada

Antes da sua utilização, a água deve ficar em aeração por, no mínimo, 12 horas, para a solubilização dos sais, estabilização do pH e saturação do oxigênio dissolvido. Se o pH não estiver dentro da faixa aceita, deve-se ajustá-lo com as soluções de ácido clorídrico (HCl) – para diminuir o pH – ou de hidróxido de sódio (NaOH) – para aumentar o pH.

### APÊNDICE C – Meio Oligo – Cultivo de alga

Para o cultivo da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi utilizado o meio Oligo (ABNT, 2018), preparado da seguinte forma:

Solução 1	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4g	Dissolver em 100 mL de água destilada
Solução 2	KNO <sub>3</sub>	10g	
Solução 3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3g	
Solução 4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4g	
Solução 5	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,03g	Dissolver em 1000 mL de água destilada
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,06g	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,06g	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,06g	
	Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,06g	
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,06g	
Solução 6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06g	
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,625g	
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,625g	
Solução 6	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,625g	
	NaHCO <sub>3</sub>	15g	

As soluções foram guardadas em frascos de vidro âmbar na geladeira.

Para preparar 1 L de meio de cultura, colocar 500 mL de água destilada em um balão volumétrico de 1000 mL e adicionar as soluções na seguinte ordem e quantidades:

- Solução 1: 1,0 mL
- Solução 2: 1,0 mL
- Solução 3: 1,0 mL
- Solução 4: 1,0 mL
- Solução 5: 0,5 mL
- Solução 6: 0,5 ml
- Solução 7: 1,0 mL

Completar com água destilada para 1000 mL. Medir o pH, que deve ficar na faixa de 6,0 e 8,0. Agitar por 1 hora e autoclavar por 15 minutos a 121 °C. Antes de inocular a alga, deixar o meio de cultivo esfriar.

## APÊNDICE D – Procedimento de Inoculação da alga

Para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o procedimento de inoculação será realizado após o meio de cultivo (descrito no apêndice B) esfriar (12 horas). No preparo de 2 L de meio de cultivo, deve-se dividir em 2 erlenmeyers de 2L (colocando-se  $\pm$  850 mL do meio de cultivo em cada erlenmeyer) e dois erlenmeyers pequenos de 250 mL (colocando-se  $\pm$  150 mL do meio de cultivo em cada erlenmeyer), que serão devidamente tapados com tampões feito de gaze e algodão, com a boca dos erlenmeyers posteriormente envolvidas com papel alumínio e estes colocados para esterilizar em autoclave na temperatura de 120°C, pressão de 1,0 atmosfera, por 15 minutos. Duas pipetas graduadas de 20mL também deverão ser autoclavadas.

Para a realização do procedimento de inoculação, o local utilizado para tal, deve estar esterilizado com álcool 70%. A manipulação das vidrarias durante a inoculação deve ser feita próximo ao bico de Bunsen, na área estéril. Após o meio esfriar, inocular a alga, introduzindo 40 mL do inóculo (que consiste em uma suspensão desta espécie de alga na concentração aproximada de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>) nos erlenmeyers maiores e 20 mL do inóculo nos pequenos (os quais ficarão crescendo para se tornarem novos inóculos). Serão introduzidos, nos frascos maiores, no meio do tampão, com uma pipeta esterilizada (esta será ligada no aerador). Anotar a data de inoculação. Manter os erlenmeyers maiores sob aeração constante e fotoperíodo 16h claro:8 horas escuro, por 7 dias (fase exponencial de crescimento) (Figura 72). Os frascos menores são deixados sem aeração sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo que os frascos grandes, sendo apenas manualmente agitados 2 ou 3 vezes ao dia.

Figura 72 – Cultivo de alga *P. subcapitata* em fase exponencial de crescimento, em sala climatizada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , aeração constante e fotoperíodo 16h claro:8h escuro.



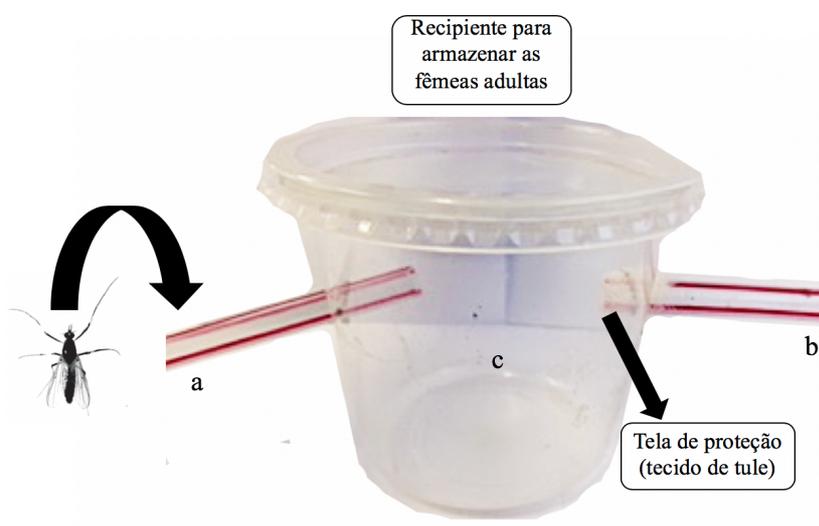
Fonte: Acervo pessoal

Decorridos os 7 dias de crescimento da *Pseudokirchneriella subcapitata*, é necessário que as algas nos erlenmeyers de 2L decantem por algumas horas, após deve-se centrifugar os volumes necessários em 3000 rpm durante 10 minutos, descartar o sobrenadante e ressuspender as algas sedimentadas em água deionizada em um frasco com tampa e homogeneizar por meio de agitação. Para contagem das células, será necessária a retirada de uma alíquota e realizar a contagem das células na câmara de Neubauer. Somente depois desse processo, a espécie *D. magna* será alimentada.

### APÊNDICE E – Sugador (Teste de Gerações)

Sugador simples utilizado para capturar as fêmeas do inseto *C. sancticaroli* no teste de gerações (Figura 73).

Figura 73 – Coletor das fêmeas adultas da espécie *C. sancticaroli*; **a)** Entrada do inseto por sucção exercida pelo lado **b**; **b)** Pressão exercida para a sucção dos organismos; **c)** Recipiente plástico para armazenar as fêmeas adultas.



Fonte: Elaborado pela Autora

**APÊNDICE F – Concentrações de LAS que causam efeito de toxicidade aguda às espécies aquáticas**

As CL<sub>50</sub> descritos na literatura, para ensaios de toxicidade aguda com LAS, para as espécies aquáticas estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - CL<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub> de LAS para espécies aquáticas disponíveis na literatura

Organismos-teste	LC <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> LAS)	Homólogos LAS	Referências
<b>Crustáceo</b>			
<i>Daphnia magna</i>	6,11	C <sub>12</sub>	Presente Estudo
<i>Daphnia similis</i>	14,17	C <sub>12</sub>	Da Silva Coelho e Rocha (2010)
<i>Daphnia galeata</i>	4,60	C <sub>12</sub>	Tanaka e Nakanishi (2001)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	11,84	C <sub>12</sub>	Da Silva Coelho e Rocha (2010)
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	13,52	C <sub>12</sub>	Da Silva Coelho e Rocha (2010)
<i>Hyalella azteca</i>	3,10	C <sub>12</sub>	Versteeg e Rawlings (2003)
<b>Molusco</b>			
<i>Melanoides tuberculata</i>	201,97	C <sub>11.8</sub>	Iannacone e Alvariño (2002)
<i>Physa venustula</i>	71,41	C <sub>11.8</sub>	Iannacone e Alvariño (2002)
<i>Heleobia cumingii</i>	82,93	C <sub>11.8</sub>	Iannacone e Alvariño (2002)
<i>Corbicula fluminea</i>	3,00	C <sub>12</sub>	Versteeg e Rawlings (2003)
<i>Elimia</i> sp.	3,00	C <sub>12</sub>	Versteeg e Rawlings (2003)
<b>Oligoqueto</b>			
<i>Allonais inaequalis</i>	8,13	C <sub>12</sub>	Presente Estudo

Organismos-teste	LC <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> LAS)	Homólogos LAS	Referências
<i>Lumbriculus variegatus</i>	5,65	C <sub>12</sub>	Mäenpää e Kukkonen (2006)
<b>Inseto</b>			
<i>Chironomus sancticaroli</i>	25,25	C <sub>12</sub>	Presente Estudo
<i>Chironomus riparius</i>	2,65	C <sub>12</sub>	Mäenpää e Kukkonen (2006)
<b>Peixe</b>			
<i>Oryzias latipes</i>	13,00	C <sub>10-14</sub>	van de Plassche et al. (1999)
<i>Poecilia reticulata</i>	3,80	C <sub>10-14</sub>	van de Plassche et al. (1999)
<i>Pimephales promelas</i>	1,70	C <sub>12</sub>	Versteeg e Rawlings (2003)
<i>Ictalurus punctatus</i>	1,70	C <sub>12</sub>	Versteeg e Rawlings (2003)

Fonte: Adaptado de Da Silva Coelho e Rocha (2010)