UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

CAMILA GABRIELA ALEXANDRE GEROMEL COSTA

**Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir de adsorventes à
base de quitosana e celulose bacteriana e os seus efeitos na biota aquática**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2018

CAMILA GABRIELA ALEXANDRE GEROMEL COSTA

Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir de adsorventes à base de quitosana e celulose bacteriana e os seus efeitos na biota aquática

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

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi

São Carlos

2018

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).

G377a Geromel Costa, Camila Gabriela Alexandre
Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir
de adsorventes à base de quitosana e celulose
bacteriana e os seus efeitos na biota aquática / Camila
Gabriela Alexandre Geromel Costa; orientador Juliano
José Corbi. São Carlos, 2018.

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,
2018.

1. Testes ecotoxicológicos. 2. Ecotoxicologia
aquática. 3. Adsorção de metais. 4. Cinética de
adsorção. 5. Isotermas de adsorção. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **CAMILA GABRIELA ALEXANDRE GEROMEL COSTA**.

Título da tese: "Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir de adsorventes à base de quitosana e celulose e os seus efeitos na biota aquática".

Data da defesa: 08/03/2018.

Comissão Julgadora:

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

Prof. Associado **Sergio Paulo Campana Filho**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC-USP)

Prof. Dr. **Guilherme Rossi Gomi**
(Universidade de Araraquara/UNIARA)

Prof. Dr. **Wilton Rogerio Lustri**
(Universidade de Araraquara/UNIARA)

Dra. **Maria Edna Tenório Nunes**
(Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia/ECOTOX Brasil)

Resultado:

Aprovado

APROVADO

Aprovado

Aprovado

Aprovado

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

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiola**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luis Fernando Costa Alberto**

Dedico este trabalho à minha tia Valquíria e à minha avó Clarice (*in memoriam*), que mesmo distantes fisicamente, sempre me inspiraram bom ânimo para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a espiritualidade superior, pela oportunidade a mim concedida, pela missão a mim confiada, e por me confortar durante esta etapa tão importante da minha vida na qual sofri perdas irreparáveis.

Às professoras, Dra. Márcia Damianovic e Dra. Lyda Sabogal Paz, pela oportunidade de realizar a monitoria juntamente com vocês, e, posteriormente, com o querido professor Dr. Beneditinho. Agradeço especialmente à professora Márcia, por todos os conselhos e conversas que me ajudaram a aliviar os momentos de pressão.

Gostaria de agradecer ao meu querido amigo e orientador Professor Doutor Juliano José Corbi, uma pessoa tão jovem e tão madura. Por toda a sua paciência, compreensão, empatia e liderança perante um grupo tão grande de subordinados, por saber lidar com maestria e sabedoria para conosco, nos servindo de exemplo de como ser um chefe de uma maneira tão doce e humilde. Sou imensamente grata por todas as vezes que nós, alunos, fomos tomados por um certo sentimento de desânimo, suas palavras de suporte e motivação não nos deixaram sucumbir.

Ao meu querido amigo Sr. Júlio, que sempre me ajudou com as análises de metais, e claro, com as conversas e conselhos tão valiosos, e à Aline, ambos do laboratório de Saneamento. Agradeço também aos técnicos dos laboratórios do bloco didático Valter e Fernando, sempre prestativos quando eu precisei e ao Oscar, técnico do departamento de Geotecnia.

Ao professor Dr. Sérgio Paulo Campana Filho e toda a sua equipe do IQSC (Instituto de Química de São Carlos), meus queridos amigos Anderson Fiamingo, Andrea Bukzem e Danilo Santos, por toda a ajuda dispensada, pela companhia e pelas conversas.

Aos queridos professor Wilton Rogério Lustri e Silmara Lazarini, ambos do laboratório Quimmera da UNIARA, em Araraquara, por toda a ajuda durante o meu projeto e por serem tão prestativos sempre.

À querida professora Evelise Fragoso da Hidrobiologia da UFSCAR, por ser tão prestativa e receptiva.

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que fizeram parte do meu dia a dia nesta jornada, aos colegas de trabalho, Aline Bernegossi, Aline Dartora, Bárbara, Bruna, Carina, Daniel, Guilherme, Hugo, José, Lídia, Mara e Mayara, que se tornaram grandes

amigos. Sou grata por todo o suporte, a companhia e as conversas, os conselhos que ajudaram a manter a sanidade mental neste período tão conturbado.

Aos meus queridos amigos, Isabela Castro e Ariany Binda e Robson Costa, que sempre estiveram ao meu lado quando precisei, assim como o pessoal do centro espírita Luz e Caridade, sempre tão atenciosos. Agradeço especialmente aos queridos Caroline Palamin, Ariany, Robinho e Carina, por abrirem as portas de seus lares para me receber quando eu não tinha para onde ir.

A todos os funcionários da Pós-Graduação do SHS e aos professores e à CAPES por todo o auxílio financeiro a mim e à minha pesquisa.

Ao pessoal da segurança do Campus 2, por toda a atenção e cuidado comigo, assídua frequentadora do laboratório, especialmente aos meus amigos Diógenes, Padilha e Tchê. À minha querida amiga Daniela, que compartilhou comigo tardes de trabalho e o ombro amigo.

Por fim, agradeço à minha família por ser tão compreensiva durante este período em que estive tão ausente. Agradeço aos exemplos de abnegação, amor e resignação que eu tive dos meus familiares. Sou grata a todo o apoio que eu tive de cada um de vocês.

À minha mãe Míria e ao meu pai Luís por todas as palavras de apoio e motivação, à minha amada irmã Maria Clara por entender a distância e por me olhar com esses olhos de admiração que igualmente me motivam muito. E ao meu amado esposo Ricardo, por me incentivar a sempre correr em busca dos meus sonhos, mesmo que isso significasse caminhar por trilhas diferentes.

Ao apoio dos amigos de longa data, quando me mantive distante, especialmente minhas amigas Jaqueline e Creusa, pelas orações e boas energias.

Eu não estaria aqui sem a colaboração de cada um de vocês.

Agradeço à colaboração dos componentes da minha banca de defesa ao meu trabalho, a contribuição de vocês foi de grande valia para o enriquecimento do meu trabalho.

Peço desculpas se me esqueci de alguém, mas não significa que tenha uma menor importância na minha trajetória.

RESUMO

Geromel Costa, Camila Gabriela Alexandre. **Avaliação da remoção de cromo hexavalente a partir de adsorventes à base de quitosana e celulose bacteriana e os seus efeitos na biota aquática.** 2018. 161 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) –Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

As atividades antrópicas, tanto industriais quanto agrícolas, têm contribuído de forma considerável ao aporte de contaminantes nos recursos hídricos, sobretudo às concentrações de metais nestes corpos receptores. Deste modo, é imprescindível analisar o impacto contaminantes nesses ambientes, bem como os efeitos na biota aquática como forma de prevenir os danos ambientais a estes ecossistemas. O cromo hexavalente [Cr(VI)] foi estudado quanto às taxas de adsorção em pérolas de hidrogéis de quitosana ($\pm 5,5\%$) e membranas de celulose bacteriana sintetizadas por *Gluconacetobacter hansenii* (melaço como fonte de carbono). Os resultados de adsorção para os materiais de natureza polimérica avaliados, no tempo de equilíbrio (3 horas), a uma temperatura de 25 °C, foram ajustados ao modelo de Freundlich, com coeficientes de correlação de 95,02% e 98,28%, respectivamente, sugerindo que a adsorção ocorre em mais de uma camada. Quanto à cinética, o melhor ajuste para a quitosana foi ao modelo de pseudo-segunda ordem, o qual pressupõe que ocorra a quimiossorção, ao passo que para a celulose, a o modelo de pseudo-primeira ordem de Lagergren, o qual preconiza a predominância da adsorção por difusão. A adsorção de Cr(VI) em quitosana (5000 mg kg^{-1}) foi superior à adsorção em celulose (2200 mg kg^{-1}), para o tempo de contato de 80 horas e taxa de aplicação de adsorvente de $0,1 \text{ g L}^{-1}$. O Cr(VI) também foi aplicado em testes ecotoxicológicos, com a finalidade de se observar os efeitos da exposição em larvas de *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) e em *Allonais inaequalis* (Annelida, Oligochaeta). Posteriormente, os adsorventes foram aplicados nestes testes ecotoxicológicos, aplicados ao mesmo tempo que os organismos (tempo zero), com 24 horas de antecedência e com 48 horas de antecedência (T0; T24h; T48h), para que a toxicidade da concentração de Cr(VI) remanescente no líquido fosse avaliada. Na maior parte dos testes, os tempos de contato de 24h e 48h apresentaram maiores taxas de sobrevivência do que o tempo T0, indicando que a presença dos adsorventes, sobretudo para os maiores tempos de contato, reduziu a toxicidade do Cr(VI) devido à redução de sua disponibilidade no líquido, em função da adsorção. A aplicação dos adsorventes em amostras ambientais de sedimentos de córregos, localizados em áreas adjacentes ao cultivo de cana-de-açúcar, também foi avaliada. Foi detectada a adsorção de cádmio, cobre, cromo, manganês, zinco e magnésio não solubilizados no meio líquido comprovando as suas eficácias quando aplicados em ambientes naturais. Sobretudo à importância ambiental por sua não toxicidade e eficácia na remoção de contaminantes, os biopolímeros quitosana e celulose podem ser considerados potenciais adsorventes a serem aplicados em recuperação de contaminantes de ambientes naturais.

Palavras-chave: Testes ecotoxicológicos. Ecotoxicologia aquática. Adsorção de metais. Cinética de adsorção. Isotermas de adsorção.

ABSTRACT

Geromel Costa, Camila Gabriela Alexandre. **Evaluation of hexavalente chromium removal with chitosan and bacterial cellulose-based adsorbent application and its effects on aquatic biota.** 2018. 161 p. Thesis (Doctorate in Hydraulic Engineering and Sanitation) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Industrial and agricultural anthropogenic activities, have contributed considerably to the increasing of contaminants in water resources, especially to the concentrations of metals in these receptor bodies. In this way, analyze the impact of contaminants in these environments as well as the effects on aquatic biota is essential to prevent environmental damage to these ecosystems. The adsorption rates of hexavalent chromium [Cr(VI)] in chitosan hydrogels ($DA \approx 5,5\%$) and bacterial cellulose membranes synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* (molasses as carbon source) was studied. The adsorption results for the polymeric materials evaluated at equilibrium time (3 hours) and temperature of 25°C were adjusted to the Freundlich model, with correlation coefficients of 95.02% and 98.28%, respectively, suggesting that adsorption occurs in more than one layer. For adsorption kinetics, the best fit for chitosan was the pseudo-second order model, which assumes that chemisorption occurs, whereas for cellulose, Lagergren's pseudo first order model predicts the predominance of adsorption. The adsorption of Cr(VI) in chitosan (5000 mg kg^{-1}) was superior to the adsorption in cellulose (2200 mg kg^{-1}), for the contact time of 80 hours and adsorbent application rate of 0.1 g L^{-1} . Cr(VI) was also applied in ecotoxicological tests to observe the effects of exposure on larvae of *Chironomus sancticarloi* (Diptera, Chironomidae) and *Allonais inaequalis* (Annelida, Oligochaeta). The adsorbents were then applied in these ecotoxicological tests, inserted at the same time as the organisms (time zero), 24 hours in advance and 48 hours in advance (T0, T24h; T48h), so that the toxicity of Cr(VI) concentration remaining in the liquid was evaluated. In most tests, contact times of 24h and 48h had higher survival rates than T0, indicating that the presence of the adsorbents, especially for the longer contact times, reduced Cr(VI) toxicity due to reduction in liquid availability because of adsorption process. The adsorbents application in environmental samples of contaminated streams sediments, located in adjacent areas to the sugarcane cultivation, was also evaluated. The adsorption of cadmium, copper, chromium, manganese, zinc and magnesium were not solubilized in the liquid medium, proving their efficacy when applied in natural environments. Above all, due to its non-toxicity and efficacy in the removal of contaminants, chitosan and cellulose biopolymers can be considered as potential adsorbents to be applied in the recovery of contaminants from natural environments.

Keywords: Ecotoxicological bioassays. Aquatic ecotoxicology. Metal adsorption. Adsorption kinetic. Adsorption isotherms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Chironomus sancticaroli</i> - (1) Desova; (2) Eclosão das larvas; (3) Larvas de I ínstar; (4) Larvas de III a IV ínstar; (5) Pupa; (6-A) Adulto Fêmea; (6-B) Adulto Macho	30
Figura 2 - <i>Allonais inaequalis</i> : a-região do prostômio, b-vista geral	33
Figura 3 - Estrutura química da quitina	36
Figura 4 - Representação da estrutura polimórfica da quitina	36
Figura 5 - Estrutura química da quitosana	39
Figura 6 - Estrutura química linear da celulose bacteriana	44
Figura 7 - Produção de pérolas de quitosana	52
Figura 8 - Pérolas de quitosana	52
Figura 9 - MEV das pérolas de quitosana com aumento de 85X (à esquerda) e de 5000X (à direita)	53
Figura 10 - MEV da parte interna das pérolas de quitosana com aumento de 500X (à esquerda) e de 1500X (à direita)	54
Figura 11 - 1) Pré-inóculo; 2) Meio de cultura à base de melaço; 3) Celulose produzida no pré-inóculo	55
Figura 12 - Preparação do inóculo para a produção de celulose bacteriana	56
Figura 13 - Frascos com inóculo para incubação	57
Figura 14 - MEV das placas de celulose com aumentos de 500X (à esquerda) e de 1500X (à direita)	57
Figura 15 - Membranas de celulose bacteriana	58
Figura 16 - Fluxograma da análise dos efeitos da concentração de Cr^{6+} na adsorção em quitosana e celulose	59
Figura 17 - Fluxograma da análise dos efeitos do tempo de contato na adsorção em quitosana e celulose	60
Figura 18 - Cultivos de <i>Chironomus sancticaroli</i>	65
Figura 19 - Cultivos de <i>Allonais inaequalis</i>	66
Figura 20 - Cultivos de <i>C. sancticaroli</i> para aplicação em testes agudos	67
Figura 21 - Fluxograma dos ensaios ecotoxicológicos e <i>endpoints</i> para <i>C. sancticaroli</i>	70
Figura 22 - Fluxograma dos ensaios ecotoxicológicos e <i>endpoints</i> para <i>A. inaequalis</i>	71
Figura 23 - Abertura de amostra da celulose (extração de metais)	73
Figura 24 - Adsorção de Cr(VI) em quitosana: Linha representa o ajuste à Isoterma de Langmuir e símbolos representam os dados	82
Figura 25 - Adsorção de Cr(VI) em quitosana: Linha representa o ajuste à Isoterma de Freundlich e símbolos representam os dados	83

Figura 26 - Adsorção de Cr(VI) em celulose: Linha representa o ajuste à Isoterma de Langmuir e símbolos representam os dados	85
Figura 27 - Adsorção de Cr(VI) em celulose: Linha representa o ajuste à Isoterma de Freundlich e símbolos representam os dados	86
Figura 28 - Cinética de adsorção de Cr(VI) em quitosana (mg kg^{-1}) a 30°C	87
Figura 29 - Cinética de adsorção de Cr(VI) em quitosana (mg kg^{-1}) a 25°C	88
Figura 30 - Plotagem linear do modelo de pseudo-segunda ordem da cinética de adsorção de Cr(VI) em quitosana	89
Figura 31 - Cinética de adsorção de Cr(VI) em celulose (mg kg^{-1}) a 25°C	90
Figura 32 - Plotagem linear do modelo de pseudo-primeira ordem da cinética de adsorção de Cr(VI) em celulose	91
Figura 33 - Ajuste à curva de mortalidade para <i>C. sancticaroli</i> em solução de KCl	93
Figura 34 - Curva de sobrevivência para <i>A. inaequalis</i> em solução de KCl	94
Figura 35 - Curva de mortalidade para <i>C. sancticaroli</i> em solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (96h)	96
Figura 36 - Curva de mortalidade para <i>C. sancticaroli</i> em solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (10 dias)	97
Figura 37 - Curva de mortalidade para <i>A. inaequalis</i> em solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (96h)	99
Figura 38 - Curva de mortalidade para <i>A. inaequalis</i> em solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (10 dias)	100
Figura 39 - Percentagem de sobrevivência de <i>C. sancticaroli</i> em presença de quitosana – Testes preliminares	101
Figura 40 - Taxa de remoção de Cr(VI) em presença de quitosana – Testes preliminares	102
Figura 41 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de <i>C. sancticaroli</i> em ensaios agudos em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) <i>versus</i> tempo de contato com o adsorvente	103
Figura 42 - Percentagem de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos agudos com <i>C. sancticaroli</i> em diferentes tempos de contato	105
Figura 43 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de <i>C. sancticaroli</i> em ensaios crônicos em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) <i>versus</i> tempo de contato com a quitosana	106
Figura 44 - Percentagem de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos crônicos com <i>C. sancticaroli</i> em diferentes tempos de contato	107
Figura 45 - Boxplot do comprimento das larvas de <i>C. sancticaroli</i> submetidas à exposição de longa duração ao Cr(VI)	108
Figura 46 - Boxplot do comprimento das larvas de <i>C. sancticaroli</i> submetidas à exposição de longa duração ao Cr(VI), em diferentes tempos de contato com a quitosana	108

Figura 47 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de <i>A. inaequalis</i> em ensaios agudos em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) <i>versus</i> tempo de contato com o adsorvente	110
Figura 48 - Percentagem de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos agudos com <i>A. inaequalis</i> em diferentes tempos de contato	110
Figura 49 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de <i>A. inaequalis</i> em ensaios crônico em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) <i>versus</i> tempo de contato com o adsorvente	111
Figura 50 - Percentagens de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos crônicos com <i>A. inaequalis</i> em diferentes tempos de contato	112
Figura 51 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de <i>C. sancticaroli</i> em ensaios agudos em presença de celulose - concentração inicial de Cr(VI) <i>versus</i> tempo de contato com a celulose	113
Figura 52 - Teor de matéria orgânica presente nos sedimentos contaminados	114
Figura 53 - Concentração de cádmio em sedimentos contaminados, em quitosana e celulose	116
Figura 54 - Concentração de cobre em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose	117
Figura 55 - Concentração de cromo em sedimentos contaminados, em quitosana e celulose	118
Figura 56 - Concentração de zinco em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose	119
Figura 57 - Concentração de manganês em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose	120
Figura 58 - Concentração de magnésio em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose	121
Figura 59 - Taxa de sobrevivência de larvas de <i>C. sancticaroli</i> (IV instar larval) expostas aos sedimentos contaminados	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ordem de afinidade de metais em quitosana	39
Tabela 2 - Graus de toxicidade de organismos expostos a contaminantes em função da taxa de mortalidade	64
Tabela 3 - Concentrações de KCl para elaboração da carta-controle	68
Tabela 4 - Concentrações de cromo hexavalente para determinação da CL ₅₀ para testes agudos	69
Tabela 5 - Concentrações de cromo hexavalente para determinação da CL ₅₀ para testes crônicos	69
Tabela 6 - Concentrações de cromo hexavalente testadas em <i>C. sancticaroli</i>	72
Tabela 7 - Concentrações de cromo hexavalente determinadas para <i>A. inaequalis</i>	73
Tabela 8 - Características dos córregos estudados	75
Tabela 9 - Metais avaliados e os respectivos métodos utilizados	77
Tabela 10 - Parâmetros para ajuste das isotermas de adsorção em quitosana	81
Tabela 11- Parâmetros das isotermas de adsorção de Cr(VI) em quitosana	83
Tabela 12 - Parâmetros para ajuste das isotermas de adsorção em celulose	84
Tabela 13 - Parâmetros das isotermas de adsorção de Cr(VI) em celulose	86
Tabela 14 - Parâmetros para determinação da cinética de adsorção em quitosana	89
Tabela 15 - Parâmetros para determinação da cinética de adsorção em celulose	91
Tabela 16 - Carta controle dos organismos <i>C. sancticaroli</i> para solução de KCl	93
Tabela 17 - Carta controle dos organismos <i>A. inaequalis</i> para solução de KCl	94
Tabela 18 - CL ₅₀ dos <i>C. sancticaroli</i> expostos a K ₂ Cr ₂ O ₇	95
Tabela 19 - CL ₅₀ das <i>A. inaequalis</i> expostas a K ₂ Cr ₂ O ₇	98
Tabela 20 - Granulometria dos sedimentos contaminados	115
Tabela 21 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de curta duração com <i>C. sancticaroli</i> com quitosana	155
Tabela 22 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de longa duração com <i>C. sancticaroli</i> com quitosana	156
Tabela 23 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de curta duração com <i>A. inaequalis</i> com quitosana	157
Tabela 24 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de longa duração com <i>A. inaequalis</i> com quitosana	158
Tabela 25 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de curta duração com <i>C. sancticaroli</i> com celulose	159

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1) – Capacidade de sorção (q_e)	60
Equação (2) – Modelo linearizado da Isoterma de Langmuir	61
Equação (3) – Fator de separação (Isoterma de Langmuir)	61
Equação (4) – Modelo linearizado da Isoterma de Freundlich	61
Equação (5) – Modelo de Lagergren de Pseudo-primeira ordem	62
Equação (6) – Modelo Linearizado de Pseudo-segunda ordem	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	- <i>American public health association</i>
BCF	- <i>Bioconcentration factor</i>
Cd	- Cádmio
CENO	- Concentração de efeito não-observado
CEO	- Concentração de efeito observado
CETESB	- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CL ₅₀	- Concentração Letal a 50% dos organismos expostos
CONAMA	- Conselho Nacional de Meio Ambiente
Cr	- Cromo
CrO ₂ ⁻	- Cromato
Cr(III)	- Cromo trivalente
Cr(VI)	- Cromo hexavalente
Cu	- Cobre
DL ₅₀	- Concentração Letal a 50% dos organismos expostos
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EESC - USP	- Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo
ETE	- Estação de Tratamento de Esgotos
FeO ₄	- Ferrato
$\overline{GD}$	- Grau médio de desacetilação
HCl	- Ácido clorídrico
Hg	- Mercúrio
H ₂ CrO ₄	- Ácido crômico
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
KCl	- Cloreto de potássio
K ₂ Cr ₂ O ₇	- Dicromato de potássio
KOH	- Hidróxido de potássio
LEAA	- Laboratório de Ecotoxicologia de Ambientes Aquáticos
MATC	- Concentração tóxica máxima aceitável
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
Mg	- Magnésio
Mn	- Manganês
mV	- Milivolt
Na ₂ Cr ₂ O ₇	- Dicromato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NBR	- Norma Brasileira
pH	- Potencial hidrogeniônico
pKa	- Constante de dissociação de um ácido
PO ₄ ²⁻	- Fosfato
SO ₄ ²⁻	- Sulfato
Zn	- Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos gerais	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	Ocorrência natural de cromo.....	22
3.2	Ocorrência antrópica de cromo.....	23
3.3	Toxicidade do cromo	24
3.4	Ensaio ecotoxicológico de ambientes de água doce	25
3.5	Organismos-teste.....	27
3.5.1	<i>Chironomus sancticarli</i> (Strixino e Strixino, 1981).....	29
3.5.2	<i>Allonais inaequalis</i> (Stephenson, 1911)	32
3.6	Adsorventes.....	34
3.6.1	Quitosana.....	35
3.6.2	Celulose bacteriana (CB).....	42
3.6.3	Isotermas de adsorção.....	45
3.6.4	Cinética de adsorção	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1	PARTE 1: Preparação dos adsorventes.....	51
4.1.1	Quitosana	51
4.1.2	Celulose bacteriana.....	54
4.2	PARTE 2: Avaliação da adsorção de Cr(VI).....	58
4.2.1	Isotermas de adsorção de Cr(VI).....	60
4.3	Cinética de adsorção de Cr(VI).....	62
4.4	PARTE 3: Bioensaios	63
4.4.1	Condições de cultivo das espécies estudadas	63

4.4.2	Carta-controle	66
4.4.3	Determinação de CL ₅₀	68
4.4.4	Testes ecotoxicológicos com adsorventes	69
4.4.5	Extração de metais	73
4.5	PARTE 4: Caracterização da área de estudo	74
4.5.1	Coleta das amostras e análises dos sedimentos	75
4.5.2	Tratamento estatístico dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos.....	77
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.1	Isotermas de adsorção	79
5.1.1	Quitosana	79
5.1.2	Celulose	83
5.2	Cinética de adsorção	86
5.3	Carta Controle	92
5.3.1	Carta controle <i>C. sancticaroli</i>	92
5.3.2	Carta controle <i>A. inaequalis</i>	93
5.4	CL ₅₀	95
5.4.1	CL ₅₀ <i>C. sancticaroli</i>	95
5.4.2	CL ₅₀ <i>A. inaequalis</i>	97
5.5	Testes ecotoxicológicos em presença de quitosana	100
5.5.1	Testes preliminares para a determinação da massa de adsorvente a ser aplicada.....	100
5.5.2	Ensaio ecotoxicológico com <i>C. sancticaroli</i>	102
5.5.3	Ensaio ecotoxicológico com <i>A. inaequalis</i>	109
5.6	Testes ecotoxicológicos em presença de celulose.....	112
5.7	Testes de adsorção em sedimento contaminado	113
6	CONCLUSÕES	124
7	SUGESTÕES.....	126

APÊNDICE A – Resultados dos ensaios ecotoxicológicos.....	155
APÊNDICE B – Produção bibliográfica	160

1 INTRODUÇÃO

O acelerado desenvolvimento tecnológico da sociedade, associado ao uso extensivo e intensivo de produtos químicos, culminou na liberação destes produtos no meio ambiente em grandes quantidades e ampla variedade de substâncias (mais de 100 mil tipos) (MUIR; HOWARD, 2006; PATWARDHAN; GHASKADBI, 2013). O uso e liberação inadequados de compostos químicos podem resultar em efeitos negativos, prejudiciais à saúde humana e aos ecossistemas (GUILLÉN et al., 2012).

Levando em consideração que os ecossistemas aquáticos consistem nos principais receptáculos de contaminantes (COSTA et al., 2008; PRITCHARD, 1993), sejam eles lançados na água (FERRARI et al., 2003; NAIDU et al., 2016), no ar (MEILI et al., 2003; PARDO et al., 2010; POSCH; VRIES, 2009) ou nos solos (REGITANO; LEAL, 2010; VANSTEELANT et al., 1997), os bioensaios ecotoxicológicos são fundamentais para a compreensão dos efeitos dos contaminantes, o estabelecimento de fatores de risco e técnicas de remediação em ecossistemas aquáticos (ABEL et al., 2017). O aporte de contaminantes nestes ambientes pode afetar a biota, seja ocasionando efeitos letais, como a mortalidade, seja causando efeitos subletais, como alterações comportamentais ou de crescimento dos organismos expostos, aumento dos riscos de predação, diminuição da fecundidade, ou até mesmo a ocorrência danos genéticos (CONNON; GEIST; WERNER, 2012; FLEEGER; CARMAN; NISBET, 2003).

Um contaminante muito usual no Brasil é o cromo, encontrado naturalmente nas formas de Cr(III), espécie estável, cuja presença em quantidades traço é necessária à saúde humana, e de Cr(VI), responsável por causar efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos em organismos vivos (MARSH; MCINERNEY, 2001; PADILLA; TAVANI, 1999; SANTOS et al., 2009; WHITACRE, 2015). A ocorrência natural do Cr(VI) em águas subterrâneas está associada a anomalias geoquímicas que, na presença de óxidos de manganês, ocorre a oxidação do Cr(III) a Cr(VI) (BOUROTTE et al., 2009). Ademais, a presença deste contaminante em ambientes aquáticos superficiais está associada, principalmente, à atividade de curtimento de peles bovinas e galvanoplastia (GOMES; TROIANI; NOZAKI, 2011; JORDÃO; PEREIRA; JHAM, 1997; TESTA, 2004). É comumente detectado nas proximidades dos pontos de lançamento de efluentes de curtumes, em concentrações superiores aos limites estipulados pela Resolução CONAMA nº 430 para

lançamento destes efluentes, a qual estabelece: para Cr(VI), 0,1 mg L⁻¹ (CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE, 2008), indicando a participação efetiva dos curtumes na poluição dos corpos receptores avaliados.

O cromo também está relacionado ao cultivo de cana-de-açúcar, consistindo em um componente dos agroquímicos empregados nestas culturas (ANGELOTTI-NETTO et al., 2004; ATAFAR et al., 2010) como fertilizantes fosfatados, calcário, fungicidas e inseticidas (ALLOWAY, 1995; TESTA, 2004), e na vinhaça aplicada no solo durante a fertirrigação (LIBONI; CEZARINO, 2012).

Quando associados às atividades de uso e ocupação do solo, os metais atingem os ambientes aquáticos por meio do escoamento superficial, representando riscos à biota aquática, sendo mais agravantes em locais onde há a supressão da vegetação ciliar (CORBI et al., 2006, 2010; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008a; GOVIND, 2014; OMWOMA, 2017).

Existem diversas técnicas que podem ser adotadas para a recuperação de ambientes contaminados, como a troca iônica, adsorção, precipitação e co-precipitação/adsorção (HEGAZI, 2013; PIRON; ACCOMINOTTI; DOMARD, 1997). Entre tais técnicas, a adsorção é geralmente considerada a mais apropriada por possuir capacidade de remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de águas naturais (GREM et al., 2013). Além disso, é a técnica mais indicada para baixas concentrações de metais em grandes volumes de líquidos (HUANG; CHUNG; LIOU, 1996). Apresenta, ainda, a vantagem da remoção do contaminante do ambiente aquático, impossibilitando que o mesmo, quando presente no sedimento, se torne biodisponível em casos de alterações das condições ambientais (DI NANNO; CURUTCHET; RATTO, 2007; KOMÁREK; ZEMAN, 2004).

Uma alternativa promissora quanto aos processos de adsorção refere-se à utilização de biopolímeros como adsorventes, os quais consistem em substâncias naturalmente produzidas por organismos vivos, consideradas sustentáveis (KANMANI et al., 2017). A quitosana, por exemplo, é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina (MAJEKODUNMI, 2016), um componente estrutural dos exoesqueletos de artrópodes e das paredes celulares de fungos e leveduras, sendo o polímero mais abundante na natureza, depois da celulose e do amido (RINAUDO, 2006). A celulose bacteriana, por sua vez, é um biopolímero sintetizado por bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Sarcina* (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A aplicação da quitosana e da celulose bacteriana na adsorção de íons metálicos em soluções tem sido amplamente estudada, seja em suas formas puras, seja na forma de compósitos (KRAJEWSKA, 2005; LU et al., 2014; MOHITE; PATIL, 2014; OSHIMA et al., 2008; SCHMUHL; KRIEG; KEIZER, 2001; SHETTY, 2006).

A ecotoxicologia tem o objetivo de avaliar os efeitos nocivos de uma determinada substância, assim como o de descrever em qual condição de exposição estes riscos são induzidos como ferramenta biológica baseada em espécies indicadoras para análises de toxicidade de contaminação ambiental (CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017; CONNON; GEIST; WERNER, 2012). Como forma de certificar-se da não toxicidade dos compostos a organismos aquáticos, é recomendável a sua aplicação prévia em testes ecotoxicológicos laboratoriais, os quais servem de respaldo à prevenção de efeitos adversos no meio (CONNON; GEIST; WERNER, 2012). No presente trabalho, optou-se pela aplicação de organismos-teste nativos da região, como sugerido por Elder (1989), uma vez que espécies nativas podem representar diferentes graus de sensibilidade dos organismos sugeridos em regulamentos para testes ecotoxicológicos (DO HONG; BECKER-VAN SLOOTEN; TARRADELLAS, 2004; FREITAS; ROCHA, 2012).

Os organismos-teste estudados no presente trabalho foram os macroinvertebrados aquáticos *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae) e *Allonais inaequalis* (Oligochaeta, Naididae). Primeiramente, foram observadas as mortalidades dos organismos expostos ao contaminante (íons de Cr(VI) – $K_2Cr_2O_7$) em exposições de curta e longa duração. Dessa forma, as massas adequadas de adsorventes a serem aplicadas nos testes foram determinadas em função dos resultados dos testes cinéticos e das isotermas de adsorção do metal Cromo (VI) para cada um dos adsorventes. Posteriormente, os ensaios ecotoxicológicos foram realizados em presença de cada um dos adsorventes, cujas adsorções foram avaliadas em diferentes tempos de contato ($t = 0$, $t = 24$ h e $t = 48$ h) entre os íons metálicos em solução e os adsorventes quitosana e celulose bacteriana aplicadas.

As investigações se estenderam a amostras naturais de sedimentos contaminados provenientes de áreas adjacentes às plantações de cana-de-açúcar. A aplicabilidade dos adsorventes foi avaliada em condições reais, quanto à adsorção de Cr, Cu, Cd, Mn, Zn e Mg, contidos em sedimentos contaminados de seis córregos próximos às áreas de plantio, comparados aos dados obtidos de córregos localizados em áreas preservadas, tomados como referências.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O principal propósito do trabalho foi o de avaliar a potencialidade de biopolímeros, como a celulose bacteriana e a quitosana, empregadas na remoção de cátions metálicos de Cr(VI) em soluções, na forma de $K_2Cr_2O_7$ (dicromato de potássio), com vistas à redução de mortalidade dos organismos expostos a este contaminante.

O trabalho também teve como objetivo estudar a aplicação dos adsorventes em amostras naturais, com a finalidade de avaliar a remoção de metais frente à pluralidade de compostos disponíveis na amostra e os reflexos na mortalidade de organismos aquáticos.

2.2 Objetivos específicos

Como forma de atingir os objetivos gerais, seguiu-se o seguinte escopo:

- Determinação dos modelos de isotermas de adsorção de Cr(VI) em quitosana e celulose bacteriana;
- Definição do modelo de cinética de adsorção de Cr(VI) em quitosana e celulose bacteriana;
- Determinação da CL_{50} (96 h) para os organismos avaliados (*Chironomus sancticaroli*, *Allonais inaequalis*) expostos a soluções de Cr(VI) em testes de curta e longa duração;
- Avaliação da mortalidade dos organismos expostos ao Cr(VI) (na forma de $K_2Cr_2O_7$) em testes agudos (curta duração - 96 h), em presença de quitosana e celulose bacteriana, nos tempos de contato de: 0 h, 24 h e 48 h, antes da inserção dos organismos;
- Avaliação da mortalidade dos organismos expostos ao Cr(VI) (na forma de $K_2Cr_2O_7$) em testes crônicos (longa duração - 10 dias), em presença de quitosana e celulose bacteriana, nos tempos de contato de: 0 h, 24 h e 48 h, antes da inserção dos organismos;

- Avaliação da adsorção de Cr, Cu, Cd, Mn, Zn e Mg em quitosana e celulose, a partir de amostras ambientais de sedimentos contaminados provenientes de córregos localizados nas proximidades de áreas de cultivo de cana-de-açúcar e áreas com presença de vegetação ciliar preservada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocorrência natural de cromo

A ocorrência de concentrações de cromo hexavalente em solos e águas subterrâneas deve-se à presença de Cr(III), principalmente nas formas de cromita e óxidos de ferro. O Cr(III) é oxidado a Cr(VI) na presença de óxidos de manganês, os únicos oxidantes naturais de Cr(III) (TESTA, 2004). As espécies Cr(III) e Cr(VI) ocorrem nos solos dentro de um intervalo de pH (3-11) e potencial redox (-300-700 mV) (HAN et al., 2004).

Os íons Cr(VI) são completamente adsorvidos às partículas mais finas da matriz do solo, e, por fim, mobilizados durante o escoamento e infiltração ocorrentes durante eventos chuvosos (GARNIER et al., 2013; KAZAKIS et al., 2015).

Casos de existência de cromo hexavalente em água subterrânea (160 g L^{-1} e 75 g L^{-1}) e solo superficial como em Thiva, na Grécia, evidenciado no estudo de Panagiotakis et al. (2015), é de origem geogênica, devido à presença de Cr(VI) no solo superficial e na água subterrânea, juntamente com Ni e Mn dentro das plumas. Outros exemplos na Europa são o da bacia do Rio Douro, ao norte de Portugal (REIS; PARKER; ALENCOÃO, 2013), e o caso da planície costeira de Cecina, província de Livorno-Itália ($49 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (LELLI et al., 2014).

Há, também, relatos de ocorrência natural de cromo hexavalente no estado da Califórnia, nos Estados Unidos, no Condado de Santa Cruz, em concentrações próximas ao limite máximo permitido para águas de abastecimento ($50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), no aquífero arenoso Aromas Red ($5\text{-}39 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), cujo fator preponderante é a oxidação de depósitos de Cr(III) por óxidos de manganês presentes no aquífero (GONZALEZ; NDUNG'U; FLEGAL, 2005). Nesse mesmo país, há também a ocorrência natural desta espécie metálica em Sacramento Valley, ao sul do estado (MILLS et al., 2011), e em Paradise Valley, estado do Arizona, ($>0,05 \text{ mg L}^{-1}$) (ROBERTSON, 1975).

No Brasil, há a presença de anomalia de cromo nas águas subterrâneas de poços profundos e cacimbas da formação Adamantina do grupo Bauru, que se estende além dos limites municipais de Urânia-SP (região Noroeste do Estado de São Paulo) com padrões de distribuição espaço-temporal irregulares, atingindo outros municípios e distritos no noroeste paulista (ALMODOVAR; PACHECO, 1993).

Bertolo et al. (2011a) avaliaram águas subterrâneas de poços de monitoramento multiníveis, e as rochas de perfuração demonstraram uma anomalia geoquímica de cromo nos arenitos quartzíticos com concentrações médias de 221 ppm. O aporte de cromo advém da libertação de Cr(III) a partir de minerais cromo-dióxido e hidróxido de Cr-Fe (BERTOLO et al., 2011b), seguida pela oxidação a Cr(VI), relacionada à redução dos óxidos de manganês presentes no aquífero (BOUROTTE et al., 2009). Em seguida, há a permuta catiônica e dissolução de carbonatos, aumentando o pH das águas subterrâneas, resultando na dessorção e mobilização de Cr(VI) ocorrente no solo (YOLCUBAL; AKYOL, 2007).

3.2 Ocorrência antrópica de cromo

O cromo é um produto químico industrial amplamente utilizado em liga, elenco de aço ou ferro, tintas, revestimentos de metal e tratamento de madeira (STOHS; BAGCHI, 1995), bem como em galvanização, curtimento de couro, produção de celulose, moagem e refino de minério (STANIN, 2004).

O cromo proveniente de atividades antrópicas ocorre, predominantemente, em dois estados de valência: cromo hexavalente [Cr(VI)], cuja aplicação se dá em diversas indústrias, e cromo trivalente [Cr(III)], nas formas de cloreto de cromo, cromo ligado à niacina (III), ou polinicotinato de cromo e picolinato de cromo, que são utilizados como micronutrientes e suplementos dietéticos (BAGCHI et al., 2002).

As principais fontes antrópicas de contaminação de águas subterrâneas provêm da infiltração direta de lixiviados de deposição de resíduos, esgotos, ou chorume de resíduos sólidos em aterro; de resíduos de mineração; da infiltração de lagoas industriais e a partir de derramamentos e vazamentos de processamentos industriais de metal ou de instalações de preservação de madeira e outras operações industriais (ALCÂNTARA; CAMARGO, 2001; TESTA, 2004).

Alloway (1995) e Testa (2004) relatam que o consumo de cromo na agricultura é feito mediante a aplicação de: fertilizantes fosfatados no solo (30-300 mg Cr kg⁻¹); calcário para correção da acidez do solo (1-120 mg Cr kg⁻¹ rochas calcárias); fungicidas e inseticidas (H₂CrO₄); e, no tratamento de madeiras utilizadas para estacas (Na₂Cr₂O₇) na prevenção de danos causados por cupins. Consoante o caso de Bueno de Andrade-SP, descrito por Corbi et al. (2011), em que o aporte de cromo no sedimento de coleções hídricas ocorre por meio de

escoamento superficial de áreas ocupadas por práticas agrícolas (níveis de efeito limiar (NEL) e nível de efeito provável (NEP) são 37,3 e 90,0 mg kg⁻¹, respectivamente).

São reportados na literatura casos de contaminação ambiental por cromo resultante da atividade de curtimento de peles como descrito por Jordão, Pereira e Jham (1997), em rios na região Sudeste do estado de Minas Gerais/SP, os quais comportam 13 curtumes. As concentrações de Cr(VI) foram determinadas nos municípios de: Ipatinga (14,2-266 µg Cr⁶⁺ g⁻¹), Matias Barbosa (53 µg Cr⁶⁺ g⁻¹) e Dolores de Campos (90 µg Cr⁶⁺ g⁻¹), nos pontos amostrais à jusante do lançamento de efluentes dos curtumes locais (JORDÃO; PEREIRA; JHAM, 1997). Circunstâncias semelhantes foram evidenciadas por Gomes, Troiani e Nozaki (2011), no Ribeirão Cleópatra, Maringá/PR, que apresentou concentração média de Cr de 0,59 mg L⁻¹, indicando que o curtume existente nas adjacências tem participação efetiva na poluição deste corpo receptor.

As características físicas e químicas dos ecossistemas – potencial redox, pH e temperatura –, assim como da presença de outras moléculas orgânicas e inorgânicas, determinam os estados de valência e a solubilidade relativa do cromo predominantes no meio (MARSH; MCINERNEY, 2001; MOORE; RAMAMOORTHY, 1984). Estas características determinam a biodisponibilidade dos íons metálicos, evidenciando a necessidade da determinação quantitativa e qualitativa dos metais no ambiente (KATZ, 1991).

A alta solubilidade do Cr(VI) o torna perigoso quando lançado em águas superficiais, devido a seu alto potencial oxidante, o qual é responsável por causar efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos em organismos vivos (MARSH; MCINERNEY, 2001; WHITACRE, 2015).

3.3 Toxicidade do cromo

O Cr(VI) é reconhecidamente mais tóxico que o Cr(III), sendo nocivo às bactérias, plantas, animais e seres humanos, o qual pode causar câncer de pulmão, bem como danos nos rins, fígado e gástrico (KOZLOWSKI; WALKOWIAK, 2002; URBANO; RODRIGUES; ALPOIM, 2008). Considerando sua toxicidade e o potencial de exposição relativo ao metal, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) classificou o cromo, bem como seus compostos, dentre os dezessete produtos químicos que representam maior risco à saúde humana (MARSH; MCINERNEY, 2001). Em contrapartida, o Cr(III) consiste

em um metal-traço essencial, que, em baixas concentrações, é ambientalmente ubíquo e vital para vários processos biológicos importantes (GUY et al., 1999).

Quanto à mutagenicidade, o Cr(VI) não interage diretamente com o DNA, uma vez que sua genotoxicidade é atribuída à sua redução intracelular em Cr(III) via intermediários reativos, resultando em: (1) Danos oxidativos no DNA; e, (2) Interações do Cr(III) com o DNA (SOBOL; SCHIESTL, 2012).

Enquanto as espécies reduzidas de cromo [Cr(VI) e Cr(III)] são impermeáveis à membrana celular, em sua forma tetraédrica (cromato - CrO_4^{2-}), forma análoga a ânions fisiológicos como SO_4^{2-} e PO_4^{2-} , pode ser difundida através da membrana plasmática (ARSLAN; BELTRAME; TOMASI, 1987; BRETON; SURDIN-KERJAN, 1977; SOBOL; SCHIESTL, 2012; WHITACRE, 2015), sendo transportada para dentro dos glóbulos vermelhos do sangue dos organismos expostos, por meio de um transportador de ânion fisiológico (proteína banda-3) (WIEGAND; OTTENWÄLDER; BOLT, 1985).

Uma vez dentro das células, o cromo se converte em espécies não difusas, mantendo a concentração intracelular do metal baixa, favorecendo a difusão dos íons extracelulares para dentro da célula ao longo do gradiente de concentração (ARSLAN; BELTRAME; TOMASI, 1987).

Os organismos vertebrados como os peixes são menos suscetíveis aos efeitos tóxicos resultantes da exposição a concentrações subletais de cromo, comparativamente aos organismos invertebrados, os quais, por sua vez, são contaminados mediante absorção por meio da alimentação (MATSUMOTO et al., 2006; MOORE; RAMAMOORTHY, 1984).

3.4 Ensaios ecotoxicológicos de ambientes de água doce

Tendo em vista que os corpos hídricos constituem depósitos finais de muitos dos produtos químicos produzidos e utilizados pelo homem (PRITCHARD, 1993), suas qualidades são fortemente influenciadas pelas atividades biológicas resultantes da composição e do funcionamento de um ecossistema (ELDER, 1989).

Comumente, os organismos podem ser tolerantes a exposições a baixas concentrações de substâncias potencialmente tóxicas. Nesse sentido, a mera presença de um produto químico potencialmente tóxico em um ambiente é referida como contaminação,

todavia, o termo poluição é empregado caso haja uma resposta biológica ou ecológica prejudicial à biota exposta (FREEDMAN, 2016).

É pertinente frisar que os efeitos de substâncias químicas na biota aquática dependem da concentração, toxicidade, solubilidade, biodisponibilidade e duração da exposição, bem como a sensibilidade dos organismos expostos (CONNON; GEIST; WERNER, 2012). Deste modo, os ensaios ecotoxicológicos são instrumentos substanciais ao fornecimento de informações complementares aos parâmetros físicos e químicos, levando a descrições mais detalhadas das condições da qualidade da água e ao entendimento de seus processos causadores (DE VLAMING et al., 2000; ELDER, 1989).

O estudo de fatores ambientais fundamenta o entendimento das influências que afetam, ou eventualmente controlam, os atributos estruturais e funcionais dos ecossistemas e seus componentes, sendo importante a seleção de medidas para a resolução de problemas ambientais (FREEDMAN, 2016). Um exemplo prático é a utilização de testes ecotoxicológicos como uma ferramenta biológica baseada em espécies indicadoras, como forma de detectar riscos ambientais, assim como sua contribuição à determinação da qualidade da água, voltada à proteção da saúde ambiental (CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017; CONNON; GEIST; WERNER, 2012).

Os testes ecotoxicológicos têm por objetivo avaliar o efeito de substâncias químicas, cujas manifestações podem ocorrer em diferentes níveis de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades em organismos representativos do ecossistema aquático, de modo a avaliar o impacto destas substâncias em ecossistemas naturais e prognosticar fatores de risco (COSTA et al., 2008; KLAASSEN, 2013; WAGNER; LØKKE, 1991).

Os ensaios ecotoxicológicos dependem dos objetivos investigativos, de modo que os microcosmos, mesocosmos e estudos de campo melhor representam as condições ambientais naturais para a avaliação dos efeitos de contaminante nas comunidades, consistindo em testes mais representativos dos ecossistemas estudados, em condições naturais (CONNON; GEIST; WERNER, 2012; ELDER, 1989; KLAASSEN, 2013). No entanto, os testes laboratoriais de espécies individuais são importantes para a determinação da suscetibilidade de espécies a uma grande variedade de poluentes, a determinação da bioacumulação em organismos e da biomagnificação ao longo da cadeia alimentar, bem como a importância das propriedades físicas e químicas de cada agente para ambos os processos (PRITCHARD, 1993).

Os testes de toxicidade laboratoriais com uma espécie podem ser crônicos ou agudos, sendo estes últimos caracterizados pela exposição de organismos a compostos tóxicos por períodos de curta duração, geralmente de 24-96 horas, exceto para microtox e *Vibrio fischeri* (15 minutos de duração), sendo desempenhados para mensurar os efeitos de agentes tóxicos em espécies aquáticas durante seu curto período de vida (HOFFMAN et al., 2002).

Este ensaio permite estabelecer a relação dose ou concentração administrada que provoque a mortalidade de 50% da população exposta (DL₅₀ ou CL₅₀) (DEZOTTI, 2008). A concentração efetiva dos testes agudos pode ser baseada nas respostas quanto à imobilização ou letalidade dos organismos expostos, dependendo do organismo a ser empregado no bioensaio (JOHNSON; FINLEY, 1980). As mortalidades são registradas e os parâmetros CL₅₀, CEO (Concentração de efeito observado) e CENO (Concentração de efeito não-observado) podem ser determinados (TONKES; BESTEN; LEVERETT, 2005).

Por conseguinte, os testes de toxicidade crônica consistem na exposição de organismos a concentrações subletais de poluentes, as quais, por vezes, não causam a mortalidade e, portanto, podem ocasionar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo (HOFFMAN et al., 2002). Podem englobar todo o ciclo de vida das espécies ou apenas os mais críticos, cuja duração pode ser de sete dias até meses, dependendo da espécie avaliada (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os estudos de longo prazo avaliam *endpoints* quantitativos (como mortalidade) e não-quantitativos (reprodução, crescimento) e podem ser utilizados para derivar valores adicionais, como o MATC (concentração tóxica máxima aceitável), que é a concentração química máxima não-tóxica para os organismos-teste, e o BCF (fator de bioconcentração), que estima a concentração de tecido em relação à concentração média de exposição no meio de teste (KLAASSEN, 2013).

3.5 Organismos-teste

Os macroinvertebrados aquáticos têm sido amplamente utilizados como indicadores de qualidade da água, fornecendo informações a respeito de perturbações químicas e/ou físicas resultantes de diferentes usos do solo (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006; DORNFELD et al., 2006; PIMENTA et al., 2016). Entre eles, a família Chironomidae, pertencente à ordem Diptera, é comumente utilizada em testes ecotoxicológicos devido à sua

resistência a alterações de qualidade da água e de sedimento, possibilitando um maior tempo de exposição desses organismos a contaminantes e tornando-os potenciais biomonitores em estudos de deformidades e de bioacumulação de contaminantes (BONANI, 2010).

Destarte, espécies dos grupos Chironomidae e Oligochaeta têm sido amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, por serem consideradas boas indicadoras e por serem os organismos mais abundantes na comunidade bentônica (AMORIM; CASTILLO, 2009; CESAR; HENRY, 2017; FONSECA; ROCHA, 2004). Eles são extremamente importantes à cadeia alimentar uma vez que vivem e se alimentam da matéria orgânica aderida às partículas de sedimentos, por isso são diretamente expostos a compostos tóxicos por contato corporal e através da ingestão de alimentos contaminados (FONSECA; ROCHA, 2004).

De acordo com Elder (1989), a escolha das espécies a serem testadas devem seguir as seguintes premissas:

- O organismo deve responder à variedade de contaminantes em concentrações naturalmente encontradas no ambiente. Sua escolha deve visar à significância ecológica e econômica por sua abundância, bem como a importância comercial ou na cadeia alimentar;
- O organismo deve ser representativo, ou seja, as respostas ao contaminante devem corresponder às respostas esperadas de um grande número de outras espécies;
- O organismo deve ser adaptável às condições laboratoriais, não apresentando problemas à criação e experimentação, com respostas e *endpoints* prontamente detectáveis e quantificáveis;
- Os procedimentos experimentais devem ser simples e rápidos, como também fomentar a reprodutibilidade dos resultados.

Posto que existem poucos protocolos de ensaios ecotoxicológicos que recomendem a utilização de espécies brasileiras nativas, critérios de qualidade de água tem se baseado em estudos com espécies não nativas, que não representam a biodiversidade e a grande variedade de ecossistemas localizados em áreas com diferentes condições geológicas, físicas, químicas e climáticas do Brasil (MARTINS; BIANCHINI, 2011).

Nesse contexto, é de suma importância a avaliação dos efeitos da exposição de espécies nativas de macroinvertebrados aquáticos como o *Chironomus sancticaroli* (Diptera:

Chironomidae) e *Allonais inaequalis* (Oligochaeta: Naididae), devido à sua ampla ocorrência e grande representatividade entre os macroinvertebrados aquáticos (TRIVINHO-STRIXINO et al., 2000; FONSECA; ROCHA, 2004; TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 2005).

3.5.1 *Chironomus sancticaroli* (Strixino e Strixino, 1981)

Os Chironomidae constituem em uma família de Diptera de subordem Nematocera ocorrente em todas as regiões zoogeográficas do mundo (TRIVINHO-STRIXINO, 2011). As formas de imaturos de Chironomidae são abundantes e amplamente distribuídas em corpos d'água, tendo seus hábitos intimamente relacionados ao sedimento em que estão inseridos (RICHARDI et al., 2015; ROQUE et al., 2004), uma vez que são amplamente utilizados como bioindicadores da qualidade da água por apresentarem deformidades morfológicas quando em contato com contaminantes (JANSSENS DE BISTHOVEN et al., 1998; REBECHI; NAVARRO-SILVA, 2012).

Em áreas protegidas por vegetação ripária, a comunidade de macroinvertebrados aquáticos, pertencentes à família Chironomidae (Diptera, Insecta), apresentou riqueza e diversidade mais elevadas, e dominância mais baixa se comparada a regiões próximas ao emissário de estações de tratamento de esgotos (ETE) (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006).

A espécie *Chironomus xanthus* Rempel (1931), é descrita pelos autores Spies e Reiss (1996) como sinônimo sênior de *Chironomus domizii* Paggi (1977) e *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino (1981). No entanto, Trivinho-Strixino (2011) ressalta que há uma ausência de comparação pormenorizada entre os tipos de *Chironomus xanthus* com os das espécies consideradas seus sinônimos juniores, o que torna inválida a sinonímia sugerida pelos autores, mantendo-se assim a denominação da espécie como *C. sancticaroli*.

A espécie *Chironomus sancticaroli*, descrita por Strixino e Strixino, em 1981, a partir de exemplares encontrados na cidade de São Carlos-SP, consiste em insetos holometábolos, portanto, apresentam ciclo de vida completo: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1), sendo que as três primeiras fases do ciclo de vida são aquáticas e a fase adulta é terrestre (TRIVINHO-STRIXINO, 1981).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Chironomus sancticaroli* - (1) Desova; (2) Eclosão das larvas; (3) Larvas de I ínstar; (4) Larvas de III a IV ínstar; (5) Pupa; (6-A) Adulto Fêmea; (6-B) Adulto Macho

Fonte: Elaborado pela autora.

As massas ovígeras possuem uma média de 500-600 ovos de Chironomidae e são compostas por uma matriz gelatinosa, que tem como função a proteção dos ovos, que quando entram em contato com a água se expandem, adquirindo um aspecto tubular recurvado (FONSECA; ROCHA, 2004; OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1981). Uma das extremidades da matriz fica livre na água, ao passo que a outra é presa à borda da bandeja por um pedúnculo estreito também gelatinoso (TRIVINHO-STRIXINO, 1981). Os períodos de crescimento embrionário até o momento da eclosão das larvulas são em torno de 48 horas após a postura (FONSECA; ROCHA, 2004).

As larvulas recém-eclodidas logo que escapam do ovo se alimentam da gelatina circundante (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995). Os quironomídeos do I ínstar se alimentam de bactérias presentes no sedimento, de modo que quando atingem o II ínstar iniciam a construção dos casulos, através da adição de pequenas partículas do substrato, unidas por fios de seda, secretada pelas glândulas salivares que aumentam de largura e tamanho juntamente com o crescimento da larva (FONSECA; ROCHA, 2004). Dessa forma,

as larvas, dentro dos casulos se movimentam de forma a promover ondulações anteroposteriores, de maneira que o material líquido seja aprisionado e lhes sirva de alimento (OLIVER, 1971). A criação de ondulações corporais também tem a função de conduzir um fluxo de água dentro do tubo, reabastecendo-o de oxigênio e eliminando metabólitos e dióxido de carbono (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995). Durante a fase larval, sua alimentação ocorre por depósito ou por sedimento, quando os organismos obtêm o material microdetrital aderido às partículas de sedimento ingeridas, e a separação das partículas de sedimento e alimento ocorre dentro do seu aparelho digestivo (RASMUSSEN, 1984).

O desenvolvimento dos organismos depende das condições ambientais. Além da temperatura, parâmetros como fotoperíodo e disponibilidade de alimento são determinantes, de modo que fotoperíodos inferiores a 12 horas induzem à inibição da emergência de adultos da maior parte das larvas, ao passo que a restrição de alimentos leva a uma metamorfose tardia dos organismos (DANKS, 1978; MACKEY, 1977).

O desenvolvimento embrionário dos organismos na massa ovígera e o crescimento larval podem ser favorecidos em condições de temperaturas elevadas, o que consequentemente indica que uma fêmea de maior desenvolvimento larval pode produzir mais ovos do que a de menor desenvolvimento larval (CANTEIRO; ALBERTONI, 2011). No entanto, o aumento de temperatura ambiente acarreta a aceleração de reações químicas e de processos fisiológicos (aceleração das taxas metabólicas) dos organismos, resultando em adultos menores pelo fato de o desenvolvimento ser mais acelerado que o crescimento (DANKS, 1978; MACKEY, 1977; STEVENS, 1993; STRIXINO; TRIVINHO-STRIXINO, 1985).

As temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento da espécie, de acordo com Strixino e Trivinho-Strixino (1985) é de 18-31°C, registrando as maiores sobrevivências entre 22-26°C, que consiste na temperatura média registrada no Município de São Carlos, nos meses de novembro a abril. Na faixa de temperatura de 19-26°C, a emergência de adultos iniciou-se 14 dias após a eclosão das larvas, estágio que se prolongou por 13-14 dias, embora estes períodos tenham oscilado mediante alterações na temperatura (TRIVINHO-STRIXINO, 1981).

Toda a energia requerida para completar o ciclo de vida é acumulada durante o estágio larval, pois os adultos não se alimentam, demandando apenas abrigo mínimo para o acasalamento, ovopostura e maturação dos ovos (OLIVER, 1971). Os adultos machos apresentam tamanhos médios de 5,6 mm, coloração amarelo-esverdeada, tendendo ao

castanho, e plumas antenais mais claras, ao passo que as fêmeas possuem tamanho médio de 5,38 mm e coloração um pouco mais acastanhada (TRIVINHO-STRIXINO, 1981).

3.5.2 *Allonais inaequalis* (Stephenson, 1911)

A família Oligochaeta é constituída, em sua maior parte, por minhocas terrestres, no entanto, algumas famílias habitam ambientes aquáticos de água doce, como é o caso dos grupos Naididae, Tubificidae e Enchytraeidae (SHUHAIMI-O et al., 2012). Em particular, a espécie *Allonais inaequalis* está inserida na família Naididae, que consiste em oligoquetos aquáticos que se reproduzem tipicamente por fissão (BELY; SIKES, 2010), e podem viver tanto na coluna d'água quanto no sedimento, sendo considerados organismos de vida livre por serem adaptados à vida fora do sedimento (ERSÉUS et al., 2017; VERDONSCHOT; SMIES; SEPERS, 1982).

Organismos da família Naididae usualmente se reproduzem de forma assural por fissão (ENVALL; KÄLLERSJÖ; ERSÉUS, 2006). O modo mais comum de fissão, neste grupo, é a fissão paratômica, na qual uma nova cabeça e cauda são intercaladas no meio do corpo, entre a zona de fissão, gerando assim indivíduos transitórios (BELY; SIKES, 2010; ENVALL; KÄLLERSJÖ; ERSÉUS, 2006). Contudo, periodicamente, o grupo Naididae se reproduz sexualmente (BELY; WRAY, 2004, 2001). A maioria das espécies é detritívora, vivendo em sedimentos ou entre vegetação aquática, mas algumas espécies são carnívoras ou parasitárias (BELY; WRAY, 2004). A maioria dos Oligochaeta é conhecido por afetar os processos, tais como a troca de nutrientes entre água-sedimento, dinâmica de poluentes e aeração de sedimentos e sua estrutura (SHUHAIMI-O et al., 2012).

Como estruturas de diagnóstico, *A. inaequalis* tem o comprimento do corpo variando entre 3-9 mm (37 a 85 segmentos), sem pigmentação, corpo muito delgado, com bordas segmentares distintas e contorno perfurado, e a cabeça e o prostômio alongados, como representado na Figura 2 (NESEMANN; SHARMA; SINHA, 2004). A região acima do prostômio possui uma forma arredondada, e os olhos e a probóscide estão ausentes (Figura 2a). As cerdas ou pelos dorsais começam no segmento VI e consistem em 1-2 cerdas capilares acompanhadas por 1-2 cerdas agulhas. As cerdas agulhas são pectinadas, com dentes laterais irregulares associados a 1-4 dentes mais finos intermediários. As cerdas ventrais são bífidas

com nó ligeiramente proximal. Estas podem ocorrer em lotes de 5 a 8 cerdas (CORBI; GORNI; CORREA, 2015).

Figura 2 - *Allonais inaequalis*: a-região do prostômio, b-vista geral

Fonte: Elaborado pela autora.

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

Os autores Shain et al. (2015) relataram a ocorrência da espécie na Reserva Nacional Pacaya Samiria (Loreto, Peru, América do Sul), na porção peruana da bacia do Rio Amazonas, enquanto Righi e Hamoui (2002) relatam a incidência em Cuba, Porto Rico, Guadalupe, La Désirade, Marie Galante, Îles des Saintes, Martinica e Barbados (PUJALS,

1988), assim como na Argentina. Há relatos de ocorrência, ainda, na América do Norte, no efluente de uma ETE (Estação de Tratamento de Esgotos) em Nova Jersey, e no Grande Rio Miami, em Ohio (KATHMAN; WETZEL, 2003), no Rio Eufrates, município de Al-Mussayab no Iraque (JAWAIR; AL-JANABI, 2012), e nos rios ao Norte da Austrália (HUMPHREY; HANLEY; CAMILLERI, 2008).

As concentrações de metais em ambientes aquáticos podem afetar a fauna local como descrito por Corbi et al. (2008), podendo apresentar bioacumulação nos organismos expostos ao contaminante e sua consequente transferência aos níveis tróficos mais altos (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008a). Este tipo de contaminante também influencia na estrutura da comunidade de insetos, como apresentado por Corbi e Trivinho-Strixino (2016).

3.6 Adsorventes

Os processos de tratamento mais indicados para córregos contaminados por metais incluem a precipitação química, filtração por membrana, adsorção em carvão e adsorção/co-precipitação (BAILEY et al., 1999). A adsorção é a técnica mais indicada para baixas concentrações de metais em grandes volumes de líquidos (HUANG; CHUNG; LIOU, 1996). Apresenta, ainda, a vantagem da remoção do contaminante do ambiente aquático, impossibilitando que o mesmo se torne biodisponível em casos de alterações das condições ambientais (DI NANNO; CURUTCHET; RATTO, 2007; KOMÁREK; ZEMAN, 2004). Mediante a adsorção, é possível recuperar materiais de interesse, por meio da dessorção do mesmo, a partir de um substrato (adsorvente), consistindo assim em um interesse econômico (JINTAKOSOL; NITAYAPHAT, 2016; VENCES-ALVAREZ et al., 2017), assim como o baixo custo e a possibilidade de reutilização dos adsorventes (ALIABADI, 2016).

Para a recuperação de ambientes naturais é importante que sejam aplicadas substâncias naturalmente produzidas por organismos vivos, consideradas eco amigáveis e sustentáveis, como é o caso dos biopolímeros (KANMANI et al., 2017; KEAN; THANOU, 2010; THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001). A quitina, juntamente com a celulose e o amido, consistem nos biopolímeros mais abundantes no ambiente (CRINI, 2005), embora a quitina e seu derivado, a quitosana, sejam apontados como os materiais mais interessantes de serem aplicados como adsorventes por possuírem grupamentos hidroxila e grupamentos

amino, contribuindo para diversas possíveis interações com poluentes (CRINI; BADOT, 2008; KYZAS; BIKIARIS, 2015).

A quitosana possui uma estrutura química parecida com a da celulose, exceto pelo fato de que o grupamento hidroxila na molécula de celulose é substituído pelo grupamento amino na quitosana (JINTAKOSOL; NITAYAPHAT, 2016). A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina (MAJEKODUNMI, 2016), a qual consiste em um componente estrutural dos exoesqueletos de artrópodes e das paredes celulares de fungos e leveduras (RINAUDO, 2006). A celulose bacteriana, por sua vez, é um biopolímero sintetizado por bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Sarcina* (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A aplicação da quitosana e da celulose bacteriana na adsorção de íons metálicos em soluções tem sido amplamente estudada em suas formas puras ou nas formas de compósitos (KRAJEWSKA, 2005; LU et al., 2014; MOHITE; PATIL, 2014; OSHIMA et al., 2008; SCHMUHL; KRIEG; KEIZER, 2001; SHETTY, 2006).

3.6.1 Quitosana

A quitosana é um derivativo da quitina (poli (β - (1 $\rightarrow$ 4) -*N*-acetil-D-glucosamina)), que consiste em um polissacarídeo naturalmente abundante, extraído do exoesqueleto de crustáceos, também encontrada em fungos, algas, protozoários, artrópodes, anelídeos e moluscos, sendo considerada, portanto, um subproduto da indústria pesqueira (CRINI, 2005; MCKAY; BLAIR; GRANT, 1987; STRUSZCZYK, 2002).

3.6.1.1 Obtenção da quitosana

A quitina é um polímero constituído por unidades de acetilglucosamina (

Figura 3), ao passo que a quitosana consiste em um polímero constituído por unidades de glucosamina e acetilglucosamina, o que promove a heterogeneidade do material (GUIBAL, 2004, 2005).

Figura 3 - Estrutura química da quitina

Fonte: Struszczyk (2002) e Guibal (2004).

O arranjo das cadeias poliméricas é dependente dos tipos de quitina existentes (cadeias antiparalelas - α -quitina e paralelas - β -quitina) (Figura 4), os quais podem influenciar na cristalinidade do material. No entanto, após a extração ou solubilização do polímero, a cristalinidade do material é modificada e suas diferenças desaparecem (GUIBAL, 2004).

Ambos os compostos são atrativos, uma vez que não são afetados por variações na temperatura, são imputrescíveis, não sofrem ataques por bactérias e são indiferentes ao pH. Todavia, a quitosana é solúvel em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos com o pH inferior ao pKa do grupamento amino da quitosana (6,3) (MUZZARELLI; TUBERTINI, 1969; SZYMAŃSKA; WINNICKA, 2015).

Figura 4 - Representação da estrutura polimórfica da quitina

Fonte: Campana-Filho et al. (2007).

De acordo com Hajji et al. (2014) e Roberts (1992), a técnica mais comum para extração da quitina a partir do exoesqueleto de crustáceos, por exemplo, envolve as etapas de purificação da quitina em (1), (2) e (3), e a etapa de desacetilação (4), como descrito a seguir.

1. A desmineralização para remoção de minerais, como carbonatos de cálcio e de magnésio, por meio ácido (HCl), a temperatura ambiente;
2. Desproteínização, na qual as proteínas são extraídas por tratamento com solução aquosa de NaOH ou KOH;
3. Por vezes, dependendo do tipo de matéria-prima e o uso do material, faz-se necessária a despigmentação da quitina, por meio da extração com etanol ou acetona. Após a desmineralização, a despigmentação é conseguida por tratamento ácido ou com EDTA;
4. O processo de N-desacetilação da quitina pode ser realizado heterogeneamente ou homogeneamente. A diferença entre os dois métodos é a temperatura em que a quitina é dispersa em solução concentrada de NaOH, de modo que o método heterogêneo se dá em altas temperaturas apresentando um produto final com maior grau de desacetilação (85-99%) comparado à quitosana obtida pelo método homogêneo (48-55%) (SKJÅK-BRAEK; ANTHONSEN; SANDFORD, 1989; YOUNES; RINAUDO, 2015).

A heterogeneidade ocorre devido à característica semicristalina do polímero, o que resulta em acessibilidade limitada aos sítios reativos do material pelos reagentes. Além disso, há os processos de despolimerização e outras reações colaterais que acontecem simultaneamente à desacetilação, ocasionando a produção de copolímeros de composição e massa molar variáveis, comprometendo a reprodutibilidade do processo mesmo em condições reacionais semelhantes (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

O grupamento acetamido da quitina apresenta conjugação com o nitrogênio, esta conjugação faz com que os pares de elétron do nitrogênio não fiquem disponíveis para a complexação com metais (GUIBAL et al., 1995). Na quitosana, devido ao fato de o grupo amino estar livre, os pares de elétrons estão à disposição para a complexação com metais, em função do seu grau de desacetilação. O grau de desacetilação da quitosana, segundo alguns autores é de $\overline{GD} \leq 70\%$ e $\overline{GD} \leq 50\%$, e diferentemente da quitina, ela é solúvel em meio ácido (CRINI; BADOT, 2008; VIARSAGH et al., 2010).

3.6.1.2 Características da quitosana

A quitosana é um biopolímero obtido por meio da desacetilação da quitina, com alta capacidade de retenção de íons metálicos, e baixo custo de produção, quando comparada ao carvão ativado comercial, devido à sua abundância, pouco processamento requerido e por se tratar de um subproduto da indústria pesqueira (BAILEY et al., 1999; CRINI; BADOT, 2008; HOSSAIN; IQBAL, 2014).

Possui muitas características, como hidrofiliidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades antibacterianas e afinidade por proteínas (KAWAMURA; MITSUHASHI; TANIBE, 1993). Pode, efetivamente, remover íons metálicos, corantes, ânions e fenóis, além de sua aplicabilidade como coagulante em tecnologias de tratamento de água e águas residuárias, pelo fato de ser um material não tóxico e biocompatível (BARBUSÍNSKI; SALWICZEK; PASZEWSKA, 2016; CRINI et al., 2014; MENEGHETTI et al., 2010).

A quitosana consiste em um copolímero com uma fração molar (GA - grau de acetilação) de β - (1 $\rightarrow$ 4) - N -acetil-D-glucosamina e uma fração (1- GA) de β - (1 $\rightarrow$ 4) -D-glucosamina, de modo que seu grau de acetilação é caracterizado pela fração molar de unidades N -acetiladas (GA ou $GA\%$) (SKJÅK-BRAEK; ANTHONSEN; SANDFORD, 1989; YOUNES; RINAUDO, 2015).

Pode ser caracterizada pelo grau de desacetilação, massa molecular e cristalinidade, parâmetros estes que influenciam nas propriedades físico-químicas do material (GUIBAL, 2004). O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) refere-se à fração de agrupamentos amina livres, disponíveis para interações com íons metálicos (GUIBAL, 2004).

O grupamento amina da quitosana é fortemente reativo em presença de íons metálicos, apresentando grande afinidade por metais de transição, cuja maior capacidade adsortiva deve-se à basicidade do grupamento amino primário alifático, dependendo do grau de desacetilação, da extensão da ionização do polímero e do grau de neutralização do grupamento amino protonado (ARRASCUE et al., 2003; GUIBAL, 2005; GUIBAL; MCCARRICK; TOBIN, 2003; MASRI; REUTER; FRIEDMAN, 1974; OHGA; KURAUCHI; YANASE, 1987; SORLIER et al., 2001). No entanto, a quitosana não forma complexos com metais alcalinos e com metais alcalino-terrosos (ROBERTS, 1992).

Seu desempenho na adsorção dos metais Cr^{6+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} é significativamente superior do que qualquer tipo de carvão ativado comercial (CAC), como demonstrado por Babel e Kurniawan (2003). Isso se deve às suas características físico-químicas, estabilidade química, alta reatividade e excelente sensibilidade em relação aos metais, resultantes da presença de grupos químicos reativos como hidroxila ou funções amino, ao longo da cadeia do polímero (Figura 5) (CRINI, 2005; MASRI; REUTER; FRIEDMAN, 1974; VARMA; DESHPANDE; KENNEDY, 2004).

Figura 5 - Estrutura química da quitosana

Fonte: Struszczyk (2002) e Guibal (2004).

A quitosana é considerada um bom adsorvente, pois devido à presença dos grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ como ligantes, pode se ligar a metais por dois ou mais ligantes em uma mesma molécula (ROBERTS, 1992).

A maior afinidade da quitosana por certos metais foi estudada por alguns autores, que mesmo em concentrações iniciais similares, em uma solução complexa de polimetais, ou mesmo em soluções monometais, a adsorção de $\text{Cu}(\text{II})$, por exemplo, foi maior em todos os estudos avaliados, seguida por Cr , Zn e Mn , como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Ordem de afinidade de metais em quitosana

Ordem de afinidade	Concentração inicial (mg L^{-1})	T ($^{\circ}\text{C}$)	Adsorvente	pH	Autores
$\text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{3+} = \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$	1000	25	Quitosana em pó	6	(YANG; ZALL, 1984)
$\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$	10 e 100	30	Grânulos de quitosana expandidos	5,4	(MITANI; MORIYAMA; ISHII, 1992)
$\text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{6+} > \text{Zn}^{2+}$	<60	30	Pérolas de quitosana	-	(KAMINSKI; TOMCZAK; JAROS, 2008)
$\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$	10	25	Montmorilonita-quitosana e quitosana reticulada	4	(TSAI et al., 2016)
$\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$		20	Quitosana em pó	7	(MUZZARELLI; TUBERTINI, 1969)

Fonte: Elaborado pela autora.

Os cátions metálicos são adsorvidos à quitosana por quelação ao grupamento amina em soluções com pH próximo à neutralidade, ao passo que os ânions metálicos se ligam à quitosana por atração eletrostática ao grupamento amina protonado em $\text{pH} < 7$ (GUIBAL, 2004, 2005).

Deste modo, é possível ocasionar a dessorção de metais adsorvidos à quitosana pela redução do pH, pois a protonação do agrupamento amino das unidades de glucosamina prevalece sobre sua coordenação com os metais (MCKAY; BLAIR; GRANT, 1987; OHGA; KURAUCHI; YANASE, 1987). A partir deste procedimento, há a regeneração do adsorvente utilizado, sendo possível sua aplicação em outros ciclos de adsorção, assim como a recuperação de materiais de interesse adsorvidos à quitosana (CRINI, 2005). Trung et al. (2003) observaram que a capacidade adsorptiva da quitosana é reduzida, mediante o aumento dos ciclos de regeneração do adsorvente (em solução de H_2SO_4 a 2M), sendo possível obter remoções superiores a 90% de corantes em 10-12 ciclos de adsorção.

Como forma de prevenir a dissolução da quitosana em meio ácido ($\text{pH} < 5$), durante os processos de regeneração do adsorvente, há a possibilidade de reticulação do polímero, por meio do uso de reagentes bifuncionais. A reticulação ocorre quando um agente reticulante, que possui ao menos dois grupos funcionais reativos, introduz pontes intermoleculares e/ou reticulamentos entre as macromoléculas de polissacarídeos, reduzindo a mobilidade em decorrência da formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas diferentes ou segmentos da mesma cadeia polimérica do polímero, tornando o polímero mais resistente ao cisalhamento, à alta temperatura e ao baixo pH em comparação com o polissacarídeo principal (CRINI, 2005; CRINI; BADOT, 2008).

A epícloridrina consiste em uma molécula que contém dois grupos funcionais altamente reativos com o grupamento hidroxila, e uma vantagem de aplicação como agente reticulante é que ela não elimina a função amina da quitosana, contrariamente à aplicação do glutaraldeído como agente reticulante (CRINI, 2005; WEBSTER; HALLING; GRANT, 2007).

Os estudos de Chou e Li (2003), Ngh et al. (2002) e Ngh et al. (2005), avaliaram a adsorção de corantes, íons Cu(II) e íons Fe(II) e Fe(III) em solução, em quitosanas reticuladas com epícloridrina, glutaraldeído e diglicidil etilenoglicol, respectivamente, de modo que o primeiro agente reticulante apresentou uma maior capacidade de adsorção frente aos demais compostos estudados, embora ainda seja inferior à adsorção máxima em quitosana pura. No entanto, a difusão intrapartícula de poluentes na matriz do

polímero torna-se mais lenta à medida que a densidade de reticulação aumenta, pois a capacidade de adsorção diminui com os aumentos na extensão da reticulação (CRINI, 2005; GUIBAL, 2004).

A capacidade adsortiva da quitosana depende também de parâmetros físicos estruturais, tais como:

- A cristalinidade: determina a acessibilidade do adsorvato aos sítios internos do sorvente, ou seja, quanto maior o grau de cristalinidade, menor a capacidade adsortiva da quitosana (IOELOVICH, 2014);
- Porosidade: a baixa porosidade das pérolas de quitosana não permite uma adsorção intra partícula com os contaminantes presentes na solução, reduzindo, deste modo, a capacidade de adsorção do material devido à diminuição da área superficial do adsorvente (BABEL; KURNIAWAN, 2003; CRINI; BADOT, 2008; MASEL; 1951-, 1996);
- Tamanho da partícula: quanto maior o tamanho da partícula, maior a resistência à difusão intrapartícula (CRINI; BADOT, 2008; GUIBAL et al., 1995). A área superficial também é citada como um parâmetro físico estrutural que influencia na adsorção, que aumenta conforme a dimensão da partícula diminui, de forma que a capacidade adsortiva em sua totalidade é controlada pelo tamanho das partículas, possivelmente sugerindo um fenômeno de sorção de superfície (CRINI; BADOT, 2008; MASEL; 1951-, 1996). Contudo, alguns autores, como Bosinco et al. (1998), observaram que este parâmetro somente influenciou na taxa de adsorção de íons cobre, níquel e zinco em meio aquoso, não se aplicando para o cromo hexavalente.

Apesar disso, o procedimento de formação de gel permite uma expansão da rede polimérica, uma diminuição nos fenômenos de impedimento estérico e uma diminuição da cristalinidade das matérias-primas que favorecem o transporte de massa (CRINI; BADOT, 2008; IOELOVICH, 2014). Portanto, os desempenhos de sorção do gel independem do tamanho das partículas, mesmo após o processo de reticulação (CRINI; BADOT, 2008). Bosinco et al. (1998) explicam que na quitosana bruta, os sítios de adsorção estão muito próximos e, com isso, os íons cromo podem ocupar vários sítios ativos ao mesmo tempo, enquanto que, em pérolas de hidrogel, por efeito da expansão, os sítios de adsorção estarão

distantes um do outro de modo que o íon cromo poderia ocupar menos sítios de adsorção de uma única vez, resultando em mais sítios disponíveis que levam a um aumento na capacidade adsortiva.

Outro tipo de modificação da quitosana com a finalidade de produzir compósitos com maiores capacidades adsortivas é a sua imobilização em suportes insolúveis ou reações de enxerto, como: quitosana e Ca-alginato (HUANG; CHUNG; LIOU, 1996), nanopartículas de FeO_4 ligados à carboximetil-quitosana (CHANG; CHEN, 2005), filmes de nanomagnetita-quitosana (LASHEEN et al., 2016), quitosana-EDTA (LABIDI et al., 2016), quitosana-argila (AUTA; HAMEED, 2014), entre outros.

3.6.2 Celulose bacteriana (CB)

A celulose vegetal é produzida dentro das células de plantas, com diâmetro de suas fibras de 25 nm, no entanto, algumas bactérias são capazes de produzi-la extracelularmente, com comprimentos variando entre 100 e 2000 nm e diâmetros entre 2-4 nm a partir de um meio de cultivo rico em carboidratos (MÜHLETHALER, 1949; VOISIN et al., 2017; ZIMMERMANN; BORDEANU; STRUB, 2010).

Os estudos sobre CB foram reportados pela primeira vez por Brown (1886), que observou a formação de uma membrana translúcida gelatinosa na superfície do líquido de cultura para a produção de vinagre (ácido acético).

As bactérias responsáveis pela produção do vinagre, denominadas acetobactérias ou bactérias do ácido acético, são aeróbias obrigatórias pertencentes à família *Acetobacteraceae* (MAMLOUK; GULLO, 2013). As acetobactérias consistem em bacilos aeróbios Gram-negativos (abrangendo inclusive alguns organismos patogênicos), em forma de cocóides ou bastão, que têm a capacidade de sintetizar a celulose bacteriana a partir da oxidação incompleta de uma ampla gama de carboidratos, álcoois e álcoois de açúcares (CLEENWERCK et al., 2009). No estudo de Kaushal e Walker (1951), por exemplo, obteve-se a síntese de membrana celulósica por espécies de bactérias como: *A. acetigenum*, *A. pasteurianum* e *A. kiitzingianum*, em condições favoráveis; no entanto, a espécie *Acetobacter acetigenum*, isolada do vinagre da África Oriental, formou celulose a partir de 18 tipos diferentes de carboidratos ou álcoois relacionados aos carboidratos avaliados.

Espécies como a *Acetobacter xylinum* têm sido vastamente aplicadas na produção de celulose bacteriana a partir de uma ampla gama de fontes de carbono e de nitrogênio (MONIRI et al., 2017; SCHRAMM; GROMET; HESTRIN, 1957). Os autores Kaushal e Walker (1951), por sua vez, constataram a produção de celulose bacteriana a partir de diversas fontes de carbono como o manitol, glicerol, etilenoglicol, arabinose, xilose, eritritol e ramnose. Autores como El-Saied et al. (2008) e Lazarini, Aquino e Lustri (2016) observaram, inclusive, a produção de celulose bacteriana a partir do melaço, do xarope de cana-de-açúcar e da frutose.

Há ainda relatos em bibliografia da produção de celulose bacteriana até mesmo a partir de resíduos industriais como fonte de carbono, provenientes da produção de biodiesel e de confeitarias (TSOUKO et al., 2015), da vinhaça fina proveniente da produção de vinho de arroz (WU; LIU, 2012), do bagaço de uva resultante da produção de vinho e do glicerol resultante da produção de biodiesel (VAZQUEZ et al., 2013), de resíduos de abacaxi e caldo de cana (ALGAR et al., 2014), e a partir de resíduos de levedura de cerveja hidrolisados (LIN et al., 2014) e de resíduos alimentícios sacarificados (MOON et al., 2006). O intuito dos estudos que aplicaram resíduos como carboidratos é reduzir os custos de produção da celulose bacteriana, sem diminuir a qualidade do produto final (VAZQUEZ et al., 2013).

A estrutura da celulose bacteriana pode ser alterada em função da espécie de bactéria aplicada, o meio de cultura e as condições do cultivo (YAN et al., 2008) (GROMET; SCHRAMM; HESTRIN, 1957; LUSTRI et al., 2015; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

O rendimento para a produção de celulose bacteriana depende de outros fatores como a temperatura, a qual se mostrou mais favorável ao crescimento da membrana celulósica em 28°C, de modo que acima de 36°C seu crescimento é dificultado (BROWN, 1886). A faixa de pH, como demonstrado nos estudos de Hestrin e Schramm (1954), apresentou tanto a polimerização como a absorção de oxigênio máximas na faixa de pH 5-7, e a taxa da polimerização é retardada em relação à absorção de O₂ na região de pH abaixo de 5. As características do material também dependem se há ou não agitação do meio de cultivo (WILLIAMS; CANNON, 1989).

A celulose bacteriana é formada entre as membranas externa e citoplasmática da célula, sendo inicialmente sintetizada dentro da célula bacteriana (MONIRI et al., 2017). A biossíntese da celulose bacteriana consiste na polimerização de resíduos de glicose na cadeia de β 1-4-glucano, seguida por sua secreção extracelular dispostas de forma linear, cuja cristalização ocorre através de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando

uma estrutura tridimensional denominada fibrila (LUSTRI et al., 2015; YAN et al., 2008). As ligações de hidrogênio podem ser intramoleculares (responsável pela rigidez da cadeia) e intermoleculares (responsável pela formação da fibra vegetal) (Figura 6) (DONINI et al., 2010). As protofibrilas consistem em fibrilas elementares compostas por agrupamentos de 36 cadeias de celulose de ca. 2-4 nm (YUAN; CHENG, 2015) que formarão microfibrilas de 80 nm e de diâmetro e graus de polimerização de 2.000-14.000 moléculas de glicose (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; WATANABE et al., 1998).

Figura 6 - Estrutura química linear da celulose bacteriana

Fonte: De Olyveira et al. (2011).

A celulose sintetizada por bactérias consiste num material nativo, de elevada pureza e alta massa molecular, alta cristalinidade, excelente biodegradabilidade (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SHODA; SUGANO, 2005). A estrutura amorfa da celulose se divide em celulose I, para disposição paralela, enquanto que as fibrilas cristalinas que possuem cadeias poliglucanas antiparalelas (como ocorre durante a mercerização industrial) são denominadas celulose II (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SISSONA, 1935).

A combinação da alta resistência, inércia química, superfície hidrofílica e grande área superficial, tornam a celulose de fibras nanométricas um material muito promissor à aplicação de membranas seletivas e filtros de alto desempenho aplicados à remoção de contaminantes de águas de abastecimento e para uso industrial (MA et al., 2011; VOISIN et al., 2017).

Apesar de a celulose bacteriana possuir a mesma fórmula química do que a celulose vegetal, suas fibras apresentam dimensões nanométricas que conferem à celulose bacteriana alta resistência mecânica e à tração, a possibilidade de formação de compósitos, (inserção de materiais “*in situ*”) durante o cultivo das bactérias (DONINI et al., 2010).

As células presentes no meio de cultura, em condição estática, são varridas à superfície pela flotação da película de celulose que é menos densa do que a água, promovida pelo desprendimento de dióxido de carbono adsorvido, o qual é provido pelas células metabolizadoras (BROWN, 1886; SCHRAMM; HESTRIN, 1954). Schramm e Hestrin (1954) observaram que o aumento da massa de celulose acontece principalmente na parte superior da película, de modo que a parte inferior é empurrada progressivamente para baixo, em zonas de diminuição da pressão de oxigênio e menor atividade bacteriana, concordando com as observações de Brown (1886), que constatou que o material é construído com multicamadas sobrepostas, podendo atingir até 25 mm de espessura em condições ideais.

A produção de celulose bacteriana ocorre, de acordo com Schramm e Hestrin (1954), como uma forma das bactérias aeróbias se manterem próximas à superfície do meio de cultura, onde a concentração de oxigênio dissolvido é maior. Outros autores afirmam que as bactérias produzem a membrana de celulose como uma maneira de se protegerem das exposições à radiação UV e como forma de prevenir a evaporação do cultivo e secagem do meio (WILLIAMS; CANNON, 1989).

A celulose bacteriana tem sido muito aplicada na área da saúde, devido à sua capacidade de retenção e liberação sustentada de agentes antibacterianos e fármacos, sendo utilizadas como curativos para tratar infecções de pele (LAZARINI; AQUINO; LUSTRI, 2016; LUSTRI et al., 2017). Além disso, a celulose tem sido aplicada na adsorção de íons metálicos presentes em meios aquosos, uma vez que sua carga aniônica permite que íons metálicos carregados positivamente sejam adsorvidos à sua superfície (GUPTA; DIWAN, 2017; LU et al., 2012; MOHITE; PATIL, 2014).

Com vistas a aumentar as capacidades adsorptivas do material, alguns processos podem ser adotados como a formação de compósitos a base de celulose-glucoamilase (WU; LIA, 2008), carboximetilcelulose e alginato de sódio (CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009).

3.6.3 Isotermas de adsorção

A adsorção é um fenômeno superficial de ligação de partículas a uma superfície, de modo que a substância adsorvida é denominada adsorvato, e o material sobre o qual ocorre a adsorção, é o adsorvente (ATKINS; DE PAULA, 2003).

A adsorção pode acontecer em camadas, de modo que a primeira camada, em contato com a superfície do adsorvente, forma uma ligação física ou química com o mesmo; em sequência, a próxima camada tem uma interação mais fraca com a superfície e uma ligação mais forte com a primeira camada de adsorvato, e assim por diante (MASEL; 1951-, 1996). A ligação física é uma ligação mais fraca, cuja energia de dissociação (energia necessária para romper este tipo de ligação) é de cerca de 20 kJ mol^{-1} , na qual predominam as interações de Van der Waals, ao passo que a ligação química é mais forte (entalpia $\approx 200 \text{ kJ mol}^{-1}$), representada por ligações covalentes (ATKINS; DE PAULA, 2003).

A remoção de íons a partir de uma solução ocorre por meio da transferência de íons até a camada limite (limítrofe à superfície do sorvente), assim ocorre o transporte de íons para a superfície do sorvente e, posteriormente, para os sítios ativos intraparticulares, em que ocorre a adsorção do íon metálico nos sítios ativos através de quelação, troca iônica ou complexação (LEE et al., 2001).

É um fenômeno dependente das condições experimentais, de forma que a adsorção de metais está relacionada às concentrações de adsorvente e adsorvato, ao tempo de contato entre adsorvente e adsorvato, ao pH, à competição de íons e ao tamanho das partículas (BAILEY et al., 1999; GYANANATH; BALHAL; SCIENCES, 2012; INOUE; BABA; YOSHIZUKA, 1993; JUANG; SHAO, 2002; SOUNDARRAJAN; GOMATHI; SUDHA, 2013). A quantidade de material adsorvido na superfície de um sólido está diretamente relacionada à área superficial total do adsorvente (HUANG; CHUNG; LIOU, 1996; MASEL; 1951-, 1996).

A alteração do pH pode tanto alterar a especiação dos íons metálicos em solução como alterar a capacidade adsortiva do polímero, tomando a quitosana como exemplo; a redução do pH pode promover a protonação do agrupamento amino, afetando a adsorção de cátions metálicos (CRINI, 2005).

A concentração inicial do metal em solução é importante para superar a resistência de transferência de massa entre as fases aquosa e sólida, de modo que concentrações elevadas resultam em gradientes de concentração maiores, aumentando a probabilidade de colisão entre íons metálicos e sítios ativos do material (ZHANG; WANG, 2015). A agitação do meio também aumenta a probabilidade de colisão entre adsorvato-adsorvente, diminuindo os tempos de contato até que seja atingido o equilíbrio do sistema (SINGH; ZAHRA, 2014). Com isso, a capacidade adsortiva é aumentada até atingir a

saturação, momento a partir do qual a adsorção se torna constante (ALJEBOREE; ALSHIRIFI; ALKAIM, 2014).

Uma forma de avaliar o desempenho da adsorção e aplicação de sorventes específicos para tratamento de soluções com íons metálicos é a partir da cinética e das isotermas de adsorção (GUIBAL, 2004). As isotermas de adsorção são construídas a partir da determinação de adsorvato no líquido, antes e depois o período de adsorção, em uma temperatura fixa (CRINI; BADOT, 2008).

Para a determinação destes parâmetros, é necessária a análise de adsorção em soluções com concentrações iniciais de adsorvato conhecidas (C_e) e taxas de aplicação de sorvente predeterminadas, sendo assim possível estipular a taxa de adsorção em condições de equilíbrio (q_e) (NASCIMENTO et al., 2014).

As equações de Langmuir e Freundlich são utilizadas para descrever o equilíbrio de adsorção para tratamento de efluentes (SAHA et al., 2013). A isoterma de adsorção de Langmuir parte das premissas de que: (1) a adsorção é monocamada; (2) todos os sítios de adsorção são equivalentes uns aos outros e a superfície é uniforme; e, (3) se pressupõe que não existam interações entre moléculas adsorvidas (ATKINS; DE PAULA, 2003; SINGH, 2016).

O modelo de isotermas de adsorção de Freundlich consiste em um modelo empírico que pode ser aplicado à adsorção monocamada com interação mútua entre as moléculas adsorvidas em superfícies heterogêneas (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; GUIBAL et al., 1995; NASCIMENTO et al., 2014), bem como pode sugerir também uma adsorção multicamadas, cuja taxa adsortiva é proporcional ao aumento da concentração de soluto em solução (FIERRO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2014).

3.6.4 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção descreve a taxa de adsorção de um soluto em um sorvente, parâmetros estes de fundamental importância para predizer a taxa em que um poluente é removido do meio líquido, de modo a obter projetos apropriados de técnicas de tratamento de água e efluentes (SAĞ; AKTAY, 2002).

A capacidade de adsorção aumenta com o tempo e, em certo momento, atinge um valor constante em que o soluto não é mais removido da solução, isto é, a superfície adsorvente é progressivamente bloqueada por moléculas de adsorvato, até a sua cobertura, quando não adsorve mais moléculas, atingindo o equilíbrio dinâmico no tempo de equilíbrio (t_e) (CRINI; BADOT, 2008). Quando o equilíbrio é alcançado, assume-se que há a saturação do adsorvente (ALJEBOREE; ALSHIRIFI; ALKAIM, 2014). Contudo, em situações de concentrações iniciais mais elevadas do adsorvato, a difusão de moléculas de troca dentro das partículas de quitosana pode dirigir a taxa de adsorção (CRINI; BADOT, 2008).

A cinética de adsorção para pérolas de quitosana é principalmente dirigida pela difusão intrapartícula, que se trata de um fenômeno ocorrente na camada externa da partícula para a quitosana pura e em toda a massa da pérola para a quitosana modificada (expandida) (GUIBAL; MILOT; TOBIN, 1998).

Os mecanismos gerais de difusão podem ser descritos nas etapas sequenciais (GUIBAL et al., 1995): (1) transferência do soluto para a interface solução-substrato; (2) transporte do soluto presente na solução à superfície do adsorvente; (3) transferência do soluto da superfície do adsorvente aos sítios ativos intrapartículas; (4) absorção do soluto nos sítios ativos via complexação, sorção ou precipitação intraparticular.

A difusão limita a capacidade de adsorção do polímero, de acordo com a razão entre o volume útil e o volume total da partícula, de modo que a estrutura da quitosana e sua baixa porosidade contribuem para a baixa difusividade de íons metálicos, sendo de 10^{-10} - 10^{-11} $\text{m}^2 \text{min}^{-1}$ para pérolas de quitosana, e para o polímero nativo é de 10^{-12} - 10^{-14} $\text{m}^2 \text{min}^{-1}$ (GUIBAL; MILOT; TOBIN, 1998).

Quando não ocorre agitação do meio, o equilíbrio é atingido após tempos de contato maiores que em casos de agitação (SINGH; ZAHRA, 2014), pois o aumento de colisão de partículas com a superfície adsorvente aumenta as percentagens de êxito na adsorção (ATKINS; DE PAULA, 2003).

A taxa de adsorção inicial é igual à taxa de transferência de massa máxima, partindo de zero inicialmente, e que, próximo à saturação, inicia o seu decréscimo (DIJT, 1993). A taxa constante abrangida nos modelos está relacionada à combinação dos processos de adsorção e dessorção, em função da concentração inicial de soluto (AZIZIAN, 2004). Deste modo, a adsorção observada resulta do equilíbrio entre a adsorção e dessorção ocorrentes no meio (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; DIJT, 1993).

Existem numerosos modelos cinéticos que descrevem a ordem de reação do processo adsorptivo baseados na concentração de soluto presente na solução; por outro lado, há também modelos que se baseiam na capacidade adsorptiva do substrato (adsorvente) a partir de uma solução contendo o adsorvato, como o modelo de primeira ordem de Lagergren (1898), conhecido como modelo de pseudo-primeira ordem, e o modelo de pseudo-segunda ordem, definido por Ho (1995) citado por Ho (2006). Como explicado por Ho (2006), o termo “pseudo” foi adotado como forma de diferenciar os modelos baseados nas capacidades adsorptivas dos substratos dos modelos baseados nas concentrações das soluções.

De acordo com Azizian (2004), em situações de altas concentrações de soluto no meio líquido, estas tendem a se ajustar ao modelo de pseudo-primeira ordem, ao passo que, em condições de concentrações iniciais mais baixas (comparáveis a taxa de cobertura superficial do adsorvente), tendem a se ajustar ao modelo de pseudo-segunda ordem (HO; MCKAY, 1998a, 1998b).

A expressão de pseudo-segunda ordem descreve a quimiossorção envolvendo forças de valência através do compartilhamento ou troca de elétrons entre o adsorvente e adsorvato como forças covalentes e permuta iônica (HO, 2006; SAĞ; AKTAY, 2002).

Voisin et al. (2017) complementam que o processo de adsorção que segue o modelo cinético de pseudo-segunda ordem indica que o processo de quimiossorção é predominante no sistema, em contraste com os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem, no qual a difusão das espécies para o adsorvente é determinante no sistema.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho avaliou as capacidades adsorptivas dos materiais poliméricos avaliados, com a finalidade de estabelecer as massas a serem aplicadas nos testes ecotoxicológicos, assim como os tempos de contato entre adsorvente e adsorvato, baseados nos tempos de equilíbrio do processo adsorptivo nas condições ambientais de trabalho.

Os bioensaios de CL_{50} também serviram de base para as concentrações de trabalho durante os testes ecotoxicológicos com aplicação dos adsorventes.

Os sedimentos contaminados provenientes de áreas de cultivo de cana-de-açúcar foram avaliados como forma de estudo a respeito da aplicabilidade dos adsorventes em amostras naturais.

Os resultados observados em cada etapa do trabalho, serviram de subsídios à etapa dos testes ecotoxicológicos finais, como demonstrado na Figura 7, em que foram avaliadas as taxas de mortalidade de organismos mediante a adição de adsorventes, bem como a adsorção de algumas espécies metálicas presentes nos sedimentos avaliados.

Figura 7 – Fluxograma das etapas do projeto

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1 PARTE 1: Preparação dos adsorventes

A quitosana foi preparada no Laboratório de Físico-Química Orgânica do IQSC (Instituto de Química de São Carlos), sob a supervisão do professor Dr. Sérgio Campana Filho.

Já a celulose, foi produzida nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular do departamento Quimera (Química Medicinal e Medicina Regenerativa) da UNIARA, sob a supervisão do professor Dr. Wilton Rogério Lustri.

4.1.1 Quitosana

A quitosana utilizada foi uma quitosana comercial adquirida da empresa Chengyue Planting Co. Ltda – China, cujo grau de acetilação ($\overline{GA}$) de 5,5% foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Hirai et al. (1991) e massa molecular de $M_v \approx 85.000 \text{ g mol}^{-1}$ (FIAMINGO; CAMPANA-FILHO, 2016).

A produção das pérolas foi realizada a partir da diluição de 1,5 g de quitosana em ácido acético a 5% (m/v), de modo que a solução foi mantida sob agitação constante durante 16 horas para garantir a dissolução completa da quitosana em pó, na solução de ácido acético. A solução viscosa foi coagulada em meio básico (NaOH a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$) por meio do titulador automático Titronic Universal da marca Schott®, ajustado à velocidade de 3 mL min^{-1} e acoplado a uma agulha de diâmetro de 18 galge (Figura 8) (BOSINCO et al., 1998). As pérolas (Figura 9) foram mantidas sob agitação até que a coagulação se completasse, e, posteriormente, foram lavadas abundantemente até atingir pH próximo a 7 (GOY, 2007).

A quitosana foi submetida a um processo de reticulação com epícloridrina, na proporção de 4,9 mL de epícloridrina por 10 g de quitosana, em temperatura de 50°C (durante 1 hora), e então foram adicionados 70 mL de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) sob aquecimento por 2 horas. As pérolas foram lavadas exaustivamente com água deionizada para estabilização do pH e remoção do agente reticulante (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004).

Figura 8 - Produção de pérolas de quitosana

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9 - Pérolas de quitosana

Fonte: Elaborado pela autora.

A percentagem de quitosana nas pérolas foi mensurada por quociente de massa, de modo que dez pérolas foram pesadas em triplicata, e as amostras foram postas em estufa a 60°C por 24 horas para sua desidratação. Posteriormente, as porções foram pesadas novamente e a diferença de massa refere-se ao teor de água presente no hidrogel. As pérolas produzidas eram compostas de 5,5% de quitosana (m/m).

As superfícies das pérolas de quitosana foram fotografadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), após serem liofilizadas em temperatura de -45°C e pressão de 50 a 500 μHg para remoção da umidade e preservação da estrutura do material.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP), em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 200 pA. As amostras foram recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein), e mantidas em dessecador até o momento de análise. As condições de metalização foram: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60 mA; taxa de deposição $0,60 \text{ nm s}^{-1}$.

As superfícies externas das pérolas de quitosana apresentaram certa porosidade, como pode ser observado na Figura 10. Para verificar se estes poros eram conectados ao interior da pérola, as pérolas de quitosana foram cortadas ao meio após congelamento em nitrogênio líquido, como uma forma de preservar a estrutura original do material e posteriormente submetidas à MEV.

Figura 10 - MEV das pérolas de quitosana com aumento de 85X (à esquerda) e de 5000X (à direita)

Fonte: Elaborado pela autora.

As pérolas resultantes consistiam em um material compacto, como pode ser analisado na Figura 11, que ilustra a superfície interna de pérolas de quitosana cortadas ao meio após congelamento em nitrogênio líquido. Sugerindo que os poros aparentemente não eram conectados ao seu interior, o que pode, na realidade, ser um indicativo de poros

resultantes da perda de umidade mediante o processo de liofilização prévia das amostras, no caso da MEV, da área superficial externa do material.

Figura 11 - MEV da parte interna das pérolas de quitosana com aumento de 500X (à esquerda) e de 1500X (à direita)

Fonte: Elaborado pela autora.

O diâmetro médio das pérolas de quitosana obtidas foi de $2,8 \pm 0,4$ mm, mensurado com o auxílio do software ImageJ®, utilizado para a medida a partir de fotografias com escala milimétrica ao fundo.

4.1.2 Celulose bacteriana

A amostra bacteriana de *G. hansenii* ATCC 23769 utilizada, adquirida da Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, foi reativada a partir de um estoque liofilizado, em 50 mL do meio de cultivo Hestrin & Schramm (20 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de peptona, 2,7 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 1,15 g L⁻¹ de ácido cítrico) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). O cultivo, em condição estática, foi mantido em BOD a 28°C até a produção de uma membrana de celulose bacteriana (CB). A seguir, o cultivo foi vigorosamente agitado para a remoção das bactérias da membrana formada, sendo obtida a suspensão bacteriana, utilizada como pré-inóculo para a síntese de CB no meio, contendo melaço como fonte de carbono.

Um volume de 50 mL da suspensão bacteriana, obtida como descrito anteriormente, foi adicionada a 250 mL do meio contendo melaço (ME) como fonte de carbono (5,6 g L⁻¹ de extrato de levedura, 100 mL L⁻¹ de melaço de cana de açúcar, 50 mL L⁻¹ de etanol absoluto), como descrito por Lazarini e colaboradores (2016). O cultivo estático foi

mantido por 10 dias a 28°C em incubadora BOD, até a formação de membranas (Figura 12-3).

Figura 12 - 1) Pré-inóculo; 2) Meio de cultura à base de melaço; 3) Celulose produzida no pré-inóculo

Fonte: Elaborado pela autora.

Após esse período de incubação, o cultivo foi vigorosamente agitado para a remoção das bactérias das membranas e um volume de 100 mL da suspensão bacteriana obtida foi adicionada a 200 mL de meio de cultivo ME (Figura 13).

Figura 13 - Preparação do inóculo para a produção de celulose bacteriana

Fonte: Elaborado pela autora.

A suspensão bacteriana obtida foi transferida para recipientes de polipropileno retangulares estéreis aerados. Os recipientes foram incubados em condições estáticas em BOD a 28°C por 15 dias (Figura 14).

Figura 14 - Frascos com inóculo para incubação

Fonte: Elaborado pela autora.

Após os 15 dias de cultivo, as membranas de CB obtidas foram retiradas e tratadas com NaOH a 80°C por 30 minutos para a eliminação das bactérias e, a seguir, lavadas em água destilada, com troca periódica, em banho-maria a 60°C, até a neutralização do pH (LAZARINI; AQUINO; LUSTRI, 2016).

Em seguida, foram submetidas à liofilização, a uma temperatura de -50°C e pressão de 50 a 500 μ Hg para remoção da umidade presente no material.

A membrana de CB se apresentou na forma de manta com superfície superior mais densa que a inferior, como descrito por Lazarini, Aquino e Lustri (2016), como pode ser observado na Figura 15a, parte superior mais densa e com menor porosidade em relação à 14b.

Figura 15 - MEV das placas de celulose com aumentos de 500X (à esquerda) e de 1500X (à direita)

Fonte: Elaborado pela autora.

As membranas de CB foram cortadas em tamanhos variáveis que resultaram em uma massa aproximada de 50 mg (Figura 16). Estas membranas foram aplicadas em ensaios da cinética e de isotermas de adsorção e, posteriormente, em bioensaios ecotoxicológicos.

Figura 16 - Membranas de celulose bacteriana

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 PARTE 2: Avaliação da adsorção de Cr(VI)

Como os ensaios ecotoxicológicos são desenvolvidos sob temperatura constante (25 ± 2 °C) e pH próximo à neutralidade, neste trabalho foram estudados os efeitos da variação da concentração inicial de Cr(VI) e do tempo de contato entre metal-adsorvente na adsorção de íons de Cr(VI) em quitosana e celulose bacteriana.

Com o intuito de avaliar o efeito da concentração inicial de metais na adsorção, foram avaliadas 6 concentrações iniciais diferentes para o mesmo tempo de contato (360 minutos), temperatura (25°C) e pH (7), como exemplificado na Figura 17. As concentrações avaliadas foram estipuladas com base nos valores de CL_{50} obtidos no presente estudo, que são as concentrações aplicadas nos bioensaios ecotoxicológicos.

Para tanto, 100 mL de solução foram preparadas, tendo como a maior concentração 45 mg L^{-1} de cromo hexavalente, que é a maior concentração a ser utilizada nos bioensaios, devido a CL_{50} determinada para peixes (*Danio rerio*), um organismo que estava presente no escopo inicial do projeto, mas acabou sendo descartada a sua possibilidade de aplicação.

No presente estudo não foram aplicadas condições de agitação, pois o objetivo das análises de adsorção de metais em quitosana e celulose foi simular a adsorção de metais durante os testes ecotoxicológicos efetuados posteriormente, os quais não podem ser desempenhados em condições de agitação.

Deste modo, foram avaliados dois adsorventes, a quitosana e a celulose, em 6 concentrações iniciais de cromo hexavalente, em triplicatas, como apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Fluxograma da análise dos efeitos da concentração de Cr^{6+} na adsorção em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

O processo de adsorção também foi avaliado para diversos tempos de contato, sendo o máximo de 144 horas (Figura 18), como forma de avaliar se haveria a dessorção de adsorvato no meio líquido para tempos de contato mais longos, durante o teste ecotoxicológico em que o adsorvente fosse aplicado.

Figura 18 - Fluxograma da análise dos efeitos do tempo de contato na adsorção em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

Apesar de a temperatura também ser fator de grande influência na adsorção (BARKAT et al., 2009), as análises de tempo de contato foram desenvolvidas em temperaturas de 25°C, pois é a condição comumente aplicada para os testes ecotoxicológicos.

4.2.1 Isotermas de adsorção de Cr(VI)

As isotermas de adsorção traçam a capacidade de adsorção, q_e , *versus* a concentração residual do metal na solução em equilíbrio (C_e) (GUIBAL, 2004).

As isotermas e a cinética de adsorção foram calculadas com base na Equação (1):

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) * V}{w} \quad (1)$$

Onde:

- C_0 : é a concentração inicial de Cr(VI) (mg L^{-1});
- C_e : a concentração de equilíbrio (mg L^{-1});
- V : volume da solução (L);
- w : é a massa de adsorvente (g).

A forma linearizada da isoterma de adsorção de Langmuir é representada pela Equação (2) (ATKINS; DE PAULA, 2003):

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_{max}} + \frac{C_e}{q_{max}} \quad (2)$$

Onde:

- C_e : é a concentração de equilíbrio do adsorvato (mg L^{-1});
- q_e : quantidade de adsorvato adsorvido em condições de equilíbrio (mg g^{-1});
- q_{max} : constantes de Langmuir relacionada à capacidade de adsorção (mg g^{-1});
- K_L constantes de Langmuir relacionada à energia de adsorção (L mg^{-1}).

A partir do ajuste linear entre C_e/q_e versus C_e é possível determinar $1/(K_L \cdot q_{max})$ com a inclinação e $1/q_{max}$ com a interceptação, como representado na Equação (3) (NASCIMENTO et al., 2014).

Um indicativo relativo ao grau de desenvolvimento do processo de adsorção é o fator de separação R_L (Equação (3)), o qual pode indicar que o soluto prefere a fase sólida à líquida quando $0 < R_L < 1$, que o soluto prefere a fase líquida à sólida quando $R_L > 1$, ou pode corresponder a uma isoterma linear quando $R_L = 1$ (ERDOĞAN et al., 2005).

$$R_L = \frac{1}{(1 + K_L C_0)} \quad (3)$$

A isoterma de Freundlich consiste em um modelo empírico capaz de avaliar a relação entre a quantidade de material adsorvido e a concentração do soluto na solução, podendo ser aplicado em sistemas não ideais, em superfícies heterogêneas e adsorção em multicamada com interação entre as moléculas adsorvidas (NASCIMENTO et al., 2014). No entanto, pode sugerir também uma adsorção monocamada com interação mútua entre as moléculas adsorvidas (GUIBAL et al., 1995), representada linearmente pela Equação (4):

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (4)$$

Onde:

- q_e : quantidade de adsorvato adsorvido em condições de equilíbrio (mg g^{-1});

- K_F e n : valores obtidos a partir da inclinação e interceptação de um gráfico de $\log q_e$ versus $\log C_e$ ($K_F \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$);
- C_e : é a concentração de equilíbrio do adsorvato (mg L^{-1}).

A determinação dos parâmetros K_F e $1/n$ é possível a partir da regressão linear de um gráfico de q versus $\log C_e$, o qual fornecerá uma inclinação de $1/n$ e um intercepto $\log K_F$ (FEBRIANTO et al., 2009).

A constante de Freundlich (“ n ”) indica a interação entre o adsorvato e o adsorvente, de forma que quanto maior o n , mais forte a interação entre o adsorvato e o adsorvente, e que para $n = 1$ a 10 o adsorvato tem maior afinidade pelo adsorvente, ao passo que para n igual a 1, a adsorção é linear e as energias são idênticas para todos os sítios de adsorção (NASCIMENTO et al., 2014). No entanto, para n menor do que a unidade ($1/n > 1$), o adsorvato tem maior afinidade pelo solvente, sugerindo que há uma forte atração intermolecular entre os dois (SITE, 2001).

4.3 Cinética de adsorção de Cr(VI)

Os modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem são os modelos mais utilizados para estudar a cinética de adsorção de metais e quantificar sua extensão (FEBRIANTO et al., 2009). Uma análise simples da cinética de adsorção, realizada pela equação de Lagergren de pseudo-primeira ordem, baseada na capacidade dos sólidos, é dada pela Equação (5) (FEBRIANTO et al., 2009):

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (5)$$

Onde:

- k_1 : constante da taxa de adsorção de pseudo-primeira ordem (min^{-1});
- q_e e q_t : são as quantidades adsorvidas por grama de adsorvente no equilíbrio e no tempo t , respectivamente (mg g^{-1}).

O valor de k_1 pode ser determinado através do gráfico de $\ln(q_e - q_t)$ versus t .

O modelo de pseudo-segunda ordem pode ser expresso de acordo com a Equação (6) linearizada (HO; MCKAY, 1999):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (6)$$

Onde:

- k_2 : constante da taxa de adsorção de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

Os valores de q_e e k_2 podem ser obtidos através do intercepto e da inclinação da curva apresentada no gráfico (t/q_t) versus t . Se o modelo cinético de pseudo-segunda ordem for aplicável, a plotagem de (t/q_t) versus t deve apresentar uma relação linear próxima a 1 (NASCIMENTO et al., 2014).

4.4 PARTE 3: Bioensaios

Os testes de toxicidade podem ser crônicos ou agudos, sendo estes últimos caracterizados pela exposição de organismos por períodos de curta duração a compostos tóxicos, geralmente entre 0-96 horas, dependendo do ciclo de vida da espécie a ser avaliada, e geralmente estimam a manifestação de um efeito letal ou quaisquer outros produzidos em um curto intervalo de tempo. Este ensaio permite estabelecer a relação entre dose/resposta administrada que provoque a morte de 50% da população exposta (DL_{50} ou CL_{50}) (DEZOTTI, 2008).

À medida que os testes de toxicidade crônicos consistem em exposição de organismos a concentrações subletais de poluentes, o que por sua vez não causam a morte, é comum que ocorram distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo. Em vista disso, podem englobar todo o ciclo de vida das espécies ou apenas os mais sensíveis ou críticos (embrião, larva, jovem), com a duração de sete dias, podendo se estender por meses dependendo da espécie (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

4.4.1 Condições de cultivo das espécies estudadas

De acordo com Tonkes, Besten e Leverett (2005), as espécies propostas devem ter uma importância ecológica, comercial ou recreativa na água receptora, e ainda devem ser tão sensíveis a substâncias tóxicas quanto as espécies atuais que representem essa categoria filogenética. Os testes devem ser realizados nas primeiras fases da vida do organismo,

geralmente a fase mais sensível, o que acarreta na necessidade de espécies que se reproduzam o ano todo para que haja organismos-teste disponíveis.

Para tanto, os organismos avaliados no presente estudo foram o *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*, espécies nativas de grande representatividade por pertencerem às classes Oligochaeta e Chironomidae, que constituem os principais componentes da fauna de invertebrados em diferentes tipos de *habitats* (PAMPLIN; ROCHA; MARCHESE, 2005). De acordo com Elder (1989), a adoção de espécies nativas é indicada para melhor representar as condições de águas superficiais do local de estudo, uma vez que as espécies sugeridas em protocolos internacionais podem não corresponder à sensibilidade das espécies de organismos ocorrentes na região de estudo.

Tabela 2 - Graus de toxicidade de organismos expostos a contaminantes em função da taxa de mortalidade

Graus de toxicidade	Taxa de mortalidade
Não tóxica	< 10%
Indícios de toxicidade	10% - 50%
Tóxica	>50%

Fonte: Dornfeld, 2006.

As taxas de mortalidade estabelecidas a partir dos ensaios ecotoxicológicos podem classificar as condições de trabalho, em função da concentração do metal avaliado ou de poluente dos sedimentos contaminados, como transcrito na Tabela 2.

4.4.1.1 Condições de cultivo de *C. sancticaroli* em laboratório

O cultivo e a manutenção dos organismos foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da EESC-USP, no município de São Carlos, segundo metodologia proposta por Fonseca e Rocha (2004).

As culturas de *C. sancticaroli* foram mantidas em tabuleiros plásticos cobertos com gaiolas de nylon para a retenção dos organismos adultos (Figura 19). A água deionizada e areia esterilizada para aquário foram colocadas nos recipientes nas seguintes condições: condutividade entre 25-55 $\mu\text{S cm}^{-1}$, dureza entre 12 e 16 $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, pH entre 6,5 e 7,5, e

temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sob aeração constante, e um fotoperíodo de 12h luz/12h escuro (FONSECA; ROCHA, 2004; NOVELLI et al., 2012).

O alimento adicionado às bandejas de cultivo foi uma suspensão de ração floculada para peixes Tetramin[®], após ser macerada, na proporção de $0,04\text{ mg mL}^{-1}$, adicionadas semanalmente às bandejas.

Figura 19 - Cultivos de *Chironomus sancticaroli*

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.1.2 Condições de cultivo *Allonais inaequalis*

Os primeiros indivíduos de *A. inaequalis* foram obtidos a partir de amostras de água e sedimento aquático em lagoas localizadas em São Carlos (São Paulo – Brasil), no Parque Ecológico Municipal.

A metodologia de cultivo utilizada baseou-se no trabalho de Corbi, Gorni e Correa (2015). As amostras foram colocadas em frascos plásticos de 500 mL (Figura 20), contendo 300 mL de água deionizada e uma porção de areia comercial para aquários, mantida à temperatura ambiente (entre $22-28^{\circ}\text{C}$) com ligeira aeração (vazão média de 4 mL s^{-1} de ar), fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro.

A alimentação foi de 5 mL de solução de Tetramin[®] (5 g L^{-1}) por cultura a cada sete dias. As culturas foram mantidas por adição regular de água de alimentação (pH 6,5-7,5,

dureza 12-16 mg CaCO₃ L⁻¹ e temperatura 23-25°C) e substituindo 20% da cultura antiga com água de alimentação a cada 4 semanas.

Figura 20 - Cultivos de *Allonais inaequalis*

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 Carta-control

Em um frasco plástico de 500 mL foram adicionados 240 mL de solução padrão de KCl (nas concentrações dispostas na Tabela 3), 30 g de areia comercial para aquário, e seis larvas de *C. sancticaroli* em IV instar (observado entre 7-9 dias após a eclosão da desova). A identificação dos I, II, III e IV instar larvais dos quironomídeos é baseada nas medidas morfométricas da cápsula cefálica, de modo que a duração de cada fase é, em média, do primeiro ao terceiro dia do ciclo, do quarto ao quinto dia, do quinto ao oitavo dia e do sexto ao dia 19, respectivamente (RICHARDI et al., 2013). As medidas das cápsulas cefálicas não são alteradas em função das condições de cultivo. Ou, também, há o método de contagem das estrias das placas ventromentais (REBECHI; NAVARRO-SILVA, 2012).

A determinação do instar larval dos organismos é fundamental para a aplicação dos mesmos em ensaios ecotoxicológicos, pois a suscetibilidade dos organismos expostos aos contaminantes é diferente para cada estágio de desenvolvimento que se encontrem, de modo que, quanto mais jovens os organismos, mais suscetíveis serão aos contaminantes, exceto na

fase de ovo, quando se mostram mais resistentes a contaminantes do que nas fases larvais (GAUSS et al., 1985; NEBEKER; CAIRNS; WISE, 1984).

Os organismos foram acondicionados em tabuleiros plásticos com uma porção de areia de aquário como sedimento, água deionizada e alimento, submetida às mesmas condições dos testes, até que as larvas estivessem prontas a serem aplicadas nos ensaios (Figura 21).

Figura 21 - Cultivos de *C. sancticaroli* para aplicação em testes agudos

Fonte: Elaborado pela autora.

A proporção de 1:4 (líquido:sedimento) sugerida pela OECD (2011), e por Fonseca e Rocha (2004), não foi seguida pelo fato de se acumular uma camada densa de areia no fundo do frasco, permitindo que os organismos que se encasulassem na parte inferior do frasco fossem menos afetados pela concentração de cromo (na forma de $K_2Cr_2O_7$) presente na solução, o que pode ser observado em testes preliminares, onde os organismos que encasularam-se mais próximos da interface sedimento/água, quando sobreviviam, apresentavam tamanhos muito inferiores aos localizados em pontos mais distantes da interface, mais ao fundo do recipiente. Para tanto, neste trabalho, convencionou-se a padronização da massa de areia aplicada de 30 g.

As condições do teste foram: pH entre 6,5-7,5 e temperatura $25 \pm 2^\circ C$, e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro (FONSECA; ROCHA, 2004; NOVELLI et al., 2012). Com alimentação durante os testes, com 5 mL de solução de Tetramin[®] a 5 g L^{-1} .

As condições do teste para *A. inaequalis* são similares aos testes para *C. sancticaroli*, com exceção de que não há uma diferenciação entre os organismos quanto ao seu ciclo de vida para serem inseridos no teste. Nos testes com *A. inaequalis* não foram inseridos sedimentos (areia estéril) pelo fato dos oligoquetos serem muito pequenos e se envolverem nas partículas do sedimento, tornando difícil a sua contagem ao final do teste.

Tabela 3 - Concentrações de KCl para elaboração da carta-controlê

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>A. inaequalis</i>
Concentrações de KCl (mg L⁻¹)	0	0
	2,0	2,0
	4,0	4,0
	6,0	6,0
	8,0	8,0
	10,0	10,0

Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações de KCl foram estipuladas com base nas CL₅₀ de trabalhos que avaliaram a sensibilidade do *C. sancticaroli* para este mesmo composto, como é o caso dos trabalhos de Dornfeld (2006), Rebecchi (2012) e Fonseca (1997).

4.4.3 Determinação de CL₅₀

A CL₅₀ foi determinada para os testes agudos e crônicos com *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*, apesar de não haver uma normativa que estabeleça condições de teste com os mesmos organismos, foram adaptados dos protocolos estipulados para *Daphnia magna*, *Danio rerio* e *Chironomus sp.*, que preconizam a avaliação das mortalidades, ao menos em cinco concentrações diferentes de um mesmo composto em triplicatas (ABNT, 2009, 2011; OECD, 2011).

As metodologias para os testes de mortalidade agudos são idênticas à metodologia para a determinação da carta-controlê, com a particularidade de aplicação de cromo na forma de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) como contaminante. As concentrações avaliadas foram estipuladas com base na literatura (DORNFELD, 2006; REBECHI, 2012), as concentrações utilizadas nos testes agudos estão descritas na

Tabela 4, e para os testes crônicos na Tabela 5.

Tabela 4 - Concentrações de cromo hexavalente para determinação da CL₅₀ para testes agudos

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>A. inaequalis</i>
Concentrações de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹)	0	0
	3,0	0,5
	3,5	0,6
	4,0	0,7
	4,5	0,8
	5,0	0,9
	5,5	1,0

Fonte: Elaborado pela autora.

A metodologia para elaboração de testes crônicos de CL₅₀ é similar à metodologia para testes agudos, no entanto, os testes crônicos são aerados e o tempo de exposição adotado neste trabalho foi de 10 dias. Os indivíduos *C. sancticaroli* aplicados em testes crônicos eram de primeiro ínstar larval (no máximo 2 dias pós-desova). As concentrações para a determinação dos testes crônicos para ambos os organismos estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações de cromo hexavalente para determinação da CL₅₀ para testes crônicos

	<i>C. sancticaroli</i>	<i>A. inaequalis</i>
Concentrações de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹)	0	0
	0,50	0,5
	0,75	0,6
	1,0	0,7
	1,5	0,8
	2,0	0,9

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.4 Testes ecotoxicológicos com adsorventes

O presente estudo avaliou a exposição de dois organismos ao cromo hexavalente, de modo a analisar os efeitos do metal na mortalidade dos organismos expostos. Também foi avaliada a taxa de adsorção de Cr(VI) em quitosana para todos os testes, e em celulose para o teste de curta duração com larvas de IV ínstar de *C. sancticaroli* durante os testes ecotoxicológicos.

A Figura 22 apresenta o fluxograma dos ensaios ecotoxicológicos e os respectivos parâmetros desempenhados para *C. sancticaroli*, no qual é possível observar que contemplam

a medida das larvas utilizadas nos testes de longa duração, sendo possível associar a exposição ao contaminante a seu desenvolvimento.

Figura 22 - Fluxograma dos ensaios ecotoxicológicos e *endpoints* para *C. sancticaroli*

Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes com celulose somente foram possíveis em bioensaios de curta duração para o *C. sancticaroli*, em consequência da limitação de adsorvente, de longo tempo para sua produção quando comparado às pérolas de quitosana e da baixa reprodução dos organismos-teste nos meses de março a outubro de 2017, devido à redução de temperatura neste período.

Os ensaios ecotoxicológicos e parâmetros para *A. inaequalis* estão contemplados na Figura 23, na qual é possível observar que não houveram bioensaios que compreendessem a celulose como adsorvente pelo motivo supracitado.

Figura 23 - Fluxograma dos ensaios ecotoxicológicos e *endpoints* para *A. inaequalis*

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.4.1 Ensaios com *C. sancticaroli*

O procedimento dos bioensaios ecotoxicológicos com *C. sancticaroli* é o mesmo descrito na elaboração da carta-controlê. As concentrações estudadas foram estabelecidas com base nos resultados das CL_{50} para cada organismo (Tabela 6). Utilizou-se, deste modo, valores superiores à CL_{50} obtida tanto para os testes agudos quanto os crônicos, com a finalidade de observar se a mortalidade dos organismos foi menor em presença dos adsorventes aplicados (quitosana e celulose bacteriana). Foram selecionadas três concentrações iniciais de metal para cada tratamento aplicado em virtude da limitação de material para este trabalho, em vista do grande número de repetições dos testes para a obtenção de resultados mais consistentes.

A massa de hidrogéis de quitosana (peso úmido composto 95,5% de água) adicionada à amostra, foi de 5 g para 240 mL de solução, e para os testes realizados com celulose bacteriana liofilizada, 0,05 g foram adicionados proporcionalmente a 80 mL de solução de dicromato de potássio. As massas foram selecionadas com base em pré-testes realizados.

Tabela 6 - Concentrações de cromo hexavalente testadas em *C. sancticaroli*

Teste	Concentrações de Cr ⁶⁺ (mg L ⁻¹)
Teste Agudo (96h)	3,5
	4,0
	4,5
Teste Crônico (10 dias)	1,5
	2,0
	2,5

Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes foram desempenhados em triplicatas e os parâmetros avaliados foram: pH, dureza, condutividade e concentração de cromo hexavalente, bem como a mortalidade dos organismos submetidos ao ensaio toxicológico (TONKES; BESTEN; LEVERETT, 2005). Cabe ressaltar que a metodologia das análises seguiram instruções apresentadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1999).

O pH foi mensurado com um peagâmetro de mão da marca Íon – pH300[®], a condutividade, com um condutivímetro de mão da marca Íon – con300[®], e a dureza, com o kit da Visocolor HE (915005)[®]. Ao passo que o cromo hexavalente foi aferido com o espectrofotômetro de absorção atômica da Varian[®], modelo 240 FS, no Laboratório de Saneamento da EESC (Escola de Engenharia de São Carlos).

4.4.4.2 Ensaios com *A. inaequalis*

Para os testes com *A. inaequalis*, as condições experimentais foram as mesmas aplicadas para *C. sancticaroli* (CORBI; GORNI; CORREA, 2015), exceto que não há uma diferenciação dos organismos para os testes crônico e agudo, e, neste caso, não foi usado nenhum tipo de sedimento, pois como os organismos são demasiado pequenos, adotou-se esta tática para facilitar a separação dos organismos a partir das partículas de sedimento e a contagem dos sobreviventes ao final dos ensaios.

As concentrações avaliadas para os testes com *A. inaequalis* em presença de cada um dos adsorventes estão descritas na Tabela 7. As mesmas foram estipuladas, tendo por base os resultados dos ensaios de CL₅₀ para ensaios de curta e longa duração, e seu tratamento estatístico.

Tabela 7 - Concentrações de cromo hexavalente determinadas para *A. inaequalis*

Teste	Concentrações de Cr ⁶⁺ (mg L ⁻¹)
Teste Agudo (96h)	2,0
	2,5
	3,0
Teste Crônico (10 dias)	0,5
	1,0
	1,5

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.5 Extração de metais

Os adsorventes foram submetidos a uma adaptação da técnica de extração de metais em solo descrita por De Paula e Mozeto (2001), a qual determina que o material deva ser transferido a um béquer de 100 mL juntamente com 10 mL de HNO₃ e coberta com um vidro de relógio para permitir que haja um refluxo durante a digestão da amostra (Figura 24). A temperatura a qual as amostras foram submetidas foi de 200°C em placa aquecedora, até que os adsorventes fossem completamente dissolvidos mediante as novas condições de pH.

Figura 24 - Abertura de amostra da celulose (extração de metais)

Fonte: Elaborado pela autora.

A solução final não precisou ser filtrada após atingir a temperatura ambiente devido à dissolução dos adsorventes em meio ácido. Deste modo, as amostras foram transferidas a balões volumétricos de 50 mL e, em triplicatas, foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica, por um equipamento da Varian®, modelo 240 FS, no

Laboratório de Saneamento da EESC (Escola de Engenharia de São Carlos), cujos protocolos estavam em conformidade com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1999) e os limites de detecção estão relacionados na Tabela 9.

4.5 PARTE 4: Caracterização da área de estudo

O cromo também está relacionado à atividade sucroalcooleira, uma vez que é um elemento encontrado nos agroquímicos aplicados no cultivo de cana-de-açúcar (ANGELOTTI-NETTO et al., 2004; ATAFAR et al., 2010) como: fertilizantes fosfatados, calcário para correção da acidez do solo, fungicidas e inseticidas (H_2CrO_4) (ALLOWAY, 1995; TESTA, 2004) e na vinhaça (resíduo líquido gerado a partir da fermentação da cana-de-açúcar para produção de etanol) que é aplicada no solo por meio da fertirrigação (LIBONI; CEZARINO, 2012).

Com a fertirrigação, a vinhaça é aplicada no solo para a reposição de água, sais e outros nutrientes (LIBONI; CEZARINO, 2012); no entanto, ocorre o aporte de metais como Cu, Cd, Cr, Zn, Fe, Ni, Mn and Pb, presentes na vinhaça em concentrações que excedem os limites aceitáveis para o uso da água para irrigação de áreas agricultáveis (FUESS; GARCIA, 2014; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Tem sido observado um considerável aumento no consumo de fertilizantes e pesticidas devido à expansão do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (MARTINELLI; FILOSO, 2008), os quais apresentam concentrações de íons metálicos como: chumbo, níquel, cromo, cádmium, alumínio e zinco (ANGELOTTI-NETTO et al., 2004; ATAFAR et al., 2010).

Os metais atingem os ambientes aquáticos por meio do escoamento superficial e da erosão do solo, conduzindo à contaminação dos sedimentos e propiciando danos à biota aquática, sendo mais agravante onde há a supressão da vegetação ciliar (CORBI et al., 2006, 2010; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008a; GOVIND, 2014; OMWOMA, 2017).

Para tanto, foi avaliada a remoção de íons metálicos de sedimentos naturais provenientes de seis córregos situados em áreas adjacentes às plantações de cana-de-açúcar com vegetação ciliar ausente, e presente em um único caso (Córrego São Vicente), tendo como referência córregos localizados em áreas preservadas, como representado na Tabela 8.

Como adsorventes, foram utilizados os biopolímeros: quitosana e celulose, avaliados quanto à adsorção dos metais: Cd, Cu, Cr, Zn, Mn, e Mg previamente determinados nas amostras dos sedimentos contaminados.

Tabela 8 - Características dos córregos estudados

Córrego	Município	Uso do solo	Coordenadas geográficas
Água Preta	Ribeirão Bonito	Cana-de-açúcar	22°00' (S) 48°12' (W)
Água Sumida	Araraquara	Cana-de-açúcar	21°56' (S) 48°16' (W)
Bela Vista	Araraquara	Cana-de-açúcar	21°54' (S) 48°13' (W)
Chibarro	Ibaté	Cana-de-açúcar	21°52' (S) 48°05' (W)
Fazzari	São Carlos	Mata ciliar preservada	21°59' (S) 47°54' (W)
Espraiado	São Carlos	Mata ciliar preservada	21°53' (S) 47°52' (W)
São João	Guarapiranga	Cana-de-açúcar	21°57' (S) 48°15' (W)
São Vicente	Guarapiranga	Cana-de-açúcar/Mata ciliar	21°47' (S) 48°0.7' (W)

Fonte: Elaborado pela autora.

É de grande importância o estudo de contaminantes contidos em sedimentos de córregos, uma vez que alterações de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e variações do fluxo (velocidade e vazão) promovem a dessorção dos metais adsorvidos no sedimento e sua ressolubilização à água (CORBI; KLEINE; TRIVINHO-STRIXINO, 2013; CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008b; KOMÁREK; ZEMAN, 2004; LI et al., 2013).

4.5.1 Coleta das amostras e análises dos sedimentos

Os sedimentos foram coletados com o auxílio de uma draga Ekman-Birge, com uma área amostral de 255 cm². Os sedimentos foram amostrados duas vezes em cada ponto de coleta, durante o período de janeiro à julho de 2017, e estocados em temperatura de 4°C até os testes serem desempenhados.

4.5.1.1 Percentagem de matéria orgânica

A presença de matéria orgânica no sedimento pode influenciar a biodisponibilidade de metais, em decorrência de que alguns grupos funcionais orgânicos

apresentam alta afinidade por metais-traço (BAKEN et al., 2011). Isto se deve à formação de complexos entre matéria orgânica e metais por troca iônica, adsorção superficial, quelação e coagulação complexa e reações de peptização (MORTENSEN, 1963).

A percentagem de matéria orgânica do sedimento foi determinado pelo método gravimétrico descrito por Callisto e Esteves (1996), no qual alíquotas da amostra eram secas em estufa durante 48 horas para a remoção de água. Após sua massa ser mensurada, as amostras foram calcinadas em mufla durante 4 horas a 550°C. A razão entre a massa inicial e a final das amostras, nos fornece a percentagem de matéria orgânica presente nas amostras de sedimento.

4.5.1.2 *Análise granulométrica*

Dentre as principais características do sedimento que influenciam biodisponibilidade de contaminantes, encontra-se o tamanho das partículas e os tipos de argila que influenciam na capacidade de troca catiônica (CTC) (LANDRUM; FAUST, 1991).

Consequentemente, faz-se necessária a determinação das partículas predominantes nos sedimentos dos córregos avaliados. A análise granulométrica das amostras foi desempenhada por peneiramento ou por uma combinação de sedimentação e peneiramento, de acordo com o protocolo descrito na NBR 7181/16 (ABNT, 2016). A mesma normativa determina que as amostras devem ser secas ao ambiente, de acordo com o protocolo NBR 6457/86 (ABNT, 1986), homogeneizadas, de modo que seus torrões sejam desfeitos com auxílio do almofariz e, posteriormente, é indicado que seja feito o quarteamento. Esta normativa estabelece a metodologia de preparação de amostras e peneiramento para mensuração da massa das partículas mais grosseiras.

As partículas finas (com diâmetro inferior a 2 mm), devem passar por um procedimento de adição de solução do defloculante hexametáfosfato de sódio (125 mL de solução na concentração de 45,7 g L⁻¹) e, posteriormente, a solução deve ser tamponada com carbonato de sódio até que atinja um pH entre 8-9. Após isso, a solução deve ser agitada e a densidade da mesma deve ser mensurada nos tempos: 0,5, 1 e 2 minutos, e por fim, as partículas devem ser secas e passar pelo peneiramento fino para mensuração de suas massas (ABNT, 2016).

4.5.1.3 Extração de metais dos sedimentos

Os sedimentos foram submetidos à mesma técnica de extração de metais em solo, a qual determina que 2 g do material deva ser transferido a um béquer de 100 mL juntamente com 10 mL de HNO₃ e coberto com um vidro de relógio. A solução posteriormente foi digerida em temperatura de 90°C durante 2 horas (DE PAULA; MOZETO, 2001) em placa aquecedora analógica da marca Magnu's®.

A solução final foi filtrada em papel filtro da marca Unifil®, de gramatura 80 g m⁻² e tamanho médio dos poros de 26 µm. A posteriori, a solução foi transferida a um balão volumétrico de 100 mL (DE PAULA; MOZETO, 2001) e as amostras, em triplicatas, foram encaminhadas ao Laboratório de Saneamento da EESC (Escola de Engenharia de São Carlos), onde foram determinadas as concentrações dos metais Cd, Cu, Cr, Mn, Zn e Mg, por espectrofotometria de absorção atômica, por um equipamento da Varian®, modelo 240 FS, de acordo com a metodologia citada na Tabela 9 (APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1999).

Tabela 9 - Metais avaliados e os respectivos métodos utilizados

Metais	Limite de detecção (mg L ⁻¹)	Método
Cádmio	0,0006	SM 3111B
Cobre	0,003	SM 3111B
Cromo total	0,005	SM 3111B
Manganês	0,003	SM 3111B
Zinco	0,002	SM 3111B
Magnésio	0,001	SM 3111B

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.2 Tratamento estatístico dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos

Os resultados obtidos foram avaliados quanto à sua distribuição normal através do teste Kolmogorov-Smirnov, apresentando um resultado negativo. A partir disso, os resultados foram testados para transformação quadrática, cúbica, senoidal e raiz quadrada, e em nenhum caso se ajustou à curva normal.

Em sequência, os dados foram submetidos à reamostragem por Bootstrap, o qual se baseia na média e no desvio padrão dos dados, que, neste caso, gerou valores negativos para a taxa de sobrevivência dos organismos expostos ao contaminante. Ainda assim, os

dados reamostrados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, novamente, não apresentaram distribuição normal.

Deste modo, os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis.

Como os resultados não se ajustaram à distribuição normal, não foram submetidos ao tratamento estatístico paramétrico ANOVA aninhada, como pretendido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção foram calculadas usando as Equações (1), (2), (3) e (4) descritas no item MATERIAL E MÉTODOS, a partir das concentrações iniciais teóricas de dicromato de potássio: 1, 2, 3, 15, 30 e 45 mg L⁻¹, no entanto, os resultados obtidos para a concentração de 1 mg L⁻¹ foram inconclusivos, optando-se assim pela exclusão dos dados nesta concentração. Os ajustes dos resultados de adsorção em quitosana e em celulose estão dispostos nos itens 5.1.1 e 5.1.2.

5.1.1 Quitosana

Os parâmetros obtidos a partir dos ensaios de adsorção de Cr(VI) (na forma de K₂Cr₂O₇) em quitosana estão descritos na Tabela 10. Os dados serviram de base para os cálculos dos modelos das isotermas de Langmuir (Equação (2)) e Freundlich (Equação (4)), que são os modelos mais utilizados para adsorção de metais (AYAWEI; EBELEGI; WANKASI, 2017; AYDIN; AKSOY, 2009; ROJAS et al., 2005; VOISIN et al., 2017).

Na Tabela 10 também estão descritas as taxas de remoções de Cr(VI), e como é possível observar, as taxas de remoção aumentam junto ao aumento da concentração inicial de Cr(VI), pois como explanado por Aydın e Aksoy (2009), e Anupam et al. (2011), o aumento na concentração inicial promove um maior encontro entre as espécies metálicas e a superfície do adsorvente até que o equilíbrio seja atingido. No caso da maior concentração (45 mg L⁻¹), é provável que o equilíbrio tenha sido atingido antes, em relação às demais concentrações iniciais, de modo que a concentração remanescente no fluido contribuiu às menores taxas de remoção de íons.

As taxas de adsorção do presente estudo, representadas por *C_e* (Tabela 10), foram de 0,12 mg g⁻¹ de adsorvente aplicado para a concentração de 2 mg L⁻¹, 0,29 mg g⁻¹ para a concentração de 3 mg L⁻¹, e 1,9, 2,8 e 3,4 mg g⁻¹ para as concentrações de 15, 30 e 45 mg L⁻¹, respectivamente.

As massas de Cr(VI) adsorvidas em quitosana foram inferiores às massas obtidas por Jung et al. (2013), cujos valores foram de 5 mg g^{-1} e $9,5 \text{ mg g}^{-1}$ para as concentrações iniciais de $2,5$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, em pH 4 e dosagem de adsorvente de 100 mg L^{-1} , posto que no presente estudo, para as concentrações de 2 e 3 mg L^{-1} , as taxas de adsorção foram de $0,13$ e $0,30 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente, em condições de pH 7 e dosagem de adsorvente de $1,02 \text{ g L}^{-1}$ (disponível no

APÊNDICE A – Resultados dos ensaios ecotoxicológicos). O que pode estar relacionado ao fato de que, apesar de os íons cromo serem positivos, o dicromato de potássio forma complexos estáveis aniônicos na solução, tais como: Cr_2O_7^- , HCrO_4^- , CrO_4^{2-} e HCr_2O_7^- dependendo do pH, de modo que o cromato de hidrogênio (HCrO_4^-) e o dicromato (Cr_2O_7^-) são os íons predominantes em soluções ácidas, dependendo da concentração de Cr(VI), enquanto o cromato (CrO_4^{2-}) prevalece em condições alcalinas, dependendo dos estados de oxidação e concentrações (JUNG et al., 2013; ROJAS et al., 2005). Deste modo, considerando que a quitosana possui sítios ativos de carga negativa, a adsorção das espécies de cromo será menor em pH próximo a neutralidade ou alcalino, sendo máxima nas formas protonadas de quitosana, em pH baixo, onde ocorrem as interações eletrostáticas mais fortes entre adsorvente (aniônico) e adsorvato (KYZAS; KOSTOGLU; LAZARIDIS, 2009; SAĞ; AKTAY, 2002; UDAYBHASKAR; IYENGAR; RAO, 1990).

Uma vez que o pH inicial dos testes ecotoxicológicos deve ser mantido próximo de 7, os adsorventes, cujo objetivo principal do trabalho é aplicá-los em bioensaios, foram testados nesta condição de pH. Entretanto, devido a esta padronização do pH da solução, o processo adsorptivo pode ter sido prejudicado, ocasionando taxas de adsorção inferiores às relatadas na bibliografia.

Tabela 10 - Parâmetros para ajuste das isotermas de adsorção em quitosana

Concentração teórica (mg L ⁻¹)	Concentração real (mg L ⁻¹)	q_e (mg g ⁻¹)	C_e (mg L ⁻¹)	Porcentagem de remoção (%)
2	2	0,129259	1,88	6%
3	3,03	0,299259	2,76	9%
15	13,2	1,922963	11,47	13%
30	25	2,885556	22,40	10%
45	43	3,404815	39,94	7%

Fonte: Elaborado pela autora.

É importante salientar que o Cr(VI) pode ser convertido a Cr(III), o qual possui menor afinidade com a quitosana. Todavia, este comportamento somente foi confirmado por Rojas et al. (2005) com o pH < 3. Logo, no presente estudo, pode-se afirmar que durante os testes não houve a conversão de uma espécie à outra e a percentagem de adsorção se deveu apenas às características do adsorvente.

A adsorção de Cr(VI) em quitosana apresentou um baixo coeficiente de correlação (R^2) de 4,12% de ajuste ao modelo de Langmuir, como é possível observar na Figura 25, que demonstra que o processo de adsorção de cromo em quitosana não ocorre em monocamada. Apesar de não ter se ajustado ao modelo, o valor do coeficiente de ajuste R_L , foi inferior a 1 (0,84) e superior a zero, indicando que a adsorção é favorável, e que o soluto tem afinidade com o adsorvente.

Figura 25 - Adsorção de Cr(VI) em quitosana: Linha representa o ajuste à Isoterma de Langmuir e símbolos representam os dados

Fonte: Elaborado pela autora.

Contudo, o ajuste ao modelo de Freundlich foi de 95,02% (Figura 26), apontando que, possivelmente, a adsorção do metal em quitosana ocorra em múltiplas camadas e que os íons adsorvidos podem influenciar o processo adsorptivo ou interagir entre si. Apesar do alto R^2 , o valor de n foi inferior à unidade ($1/n = 1,113$) (Tabela 11), preconizando que o íon metálico possui alta afinidade ao solvente (água deionizada), e que a adsorção não seja tão favorável nas condições experimentais (SITE, 2001).

Alternativamente a este caso, os resultados de Jung et al. (2013) e Rojas et al. (2005) se ajustaram para ambos os modelos, incluindo os parâmetros R_L e n , mas o primeiro estudo classificou seus dados como ajustados ao modelo de Freundlich pelo valor de $n > 1$, que define uma adsorção em múltiplas camadas e, o segundo estudo considerou seus

resultados ajustados ao modelo de Langmuir pelo fato de seu $n < 1$ e seu $R_L > 1$, sugerindo uma maior afinidade do soluto ao adsorvente do que ao líquido.

Figura 26 - Adsorção de Cr(VI) em quitosana: Linha representa o ajuste à Isoterma de Freundlich e símbolos representam os dados

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 11- Parâmetros das isotermas de adsorção de Cr(VI) em quitosana

Modelos	Equação	R ²	q _{max} (mg g ⁻¹)	K _L (L mg ⁻¹)	K _F (L g ⁻¹)	R _L	1/n
Langmuir	y = 0,0367x + 8,6058	0,04	27,23	0,004	-	0,84	-
Freundlich	y = 1,113x - 1,0909	0,95	-	-	0,08	-	1,113

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.2 Celulose

As taxas de aplicação de adsorventes foram similares, de modo que, para os dois adsorventes, a média foi de 1,02 g L⁻¹. Os parâmetros dos ensaios de adsorção de Cr(VI) em celulose, assim como os parâmetros calculados para ajuste aos modelos de Langmuir e Freundlich, são apresentados n

Tabela 12. As taxas de remoção de íons metálicos observadas foram reduzidas em vista das baixas massas de adsorvente adicionadas. Entretanto, com as mesmas taxas de

adsorvente adicionadas, as taxas de remoção (adsorção) de Cr(VI) em quitosana foram muito superiores que em celulose, mostrando uma maior afinidade do metal ao adsorvente.

Para as concentrações iniciais de 2 e 3 mg L⁻¹, as taxas de remoção em função da massa de adsorvente aplicada foram de 0,02 mg g⁻¹, para a concentração de 15 mg L⁻¹, a taxa de remoção foi de 0,27 mg g⁻¹, e para as concentrações de 30 e 45 mg L⁻¹, as taxas de remoção foram de 1,17 e 1,95 mg g⁻¹, respectivamente. Assim como para quitosana, as taxas de adsorção aumentaram acompanhando os aumentos das concentrações iniciais de metais, acarretando em um aumento gradual da percentagem de remoção.

As percentagens de remoção foram baixas pelo fato de serem adotadas altas concentrações iniciais de Cr(VI), como recomendado na bibliografia (AZIZIAN, 2004), para a avaliação da capacidade adsorptiva de um material.

Tabela 12 - Parâmetros para ajuste das isotermas de adsorção em celulose

Concentração teórica (mg L⁻¹)	Concentração real (mg L⁻¹)	q_e (mg g⁻¹)	C_e (mg L⁻¹)	Porcentagem de remoção (%)
2	2	0,025463	1,998	0,12%
3	3,03	0,025926	3,028	0,08%
15	13,2	0,275	13,173	0,21%
30	25	1,168771	24,881	0,48%
45	43	1,949107	42,852	0,34%

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados de adsorção de Cr(VI) em celulose também foram avaliados quanto ao ajuste aos modelos de Langmuir, o qual apresentou um coeficiente de correlação de 0,699 (Figura 27), e ao modelo de Freundlich, o qual, similarmente à quitosana, apresentou um maior coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9828$) (Figura 28). Entretanto, ambos os fatores que avaliam o processo adsorptivo indicam que a adsorção de Cr(VI) em celulose é desfavorável nas condições experimentais, devido ao fator relativo ao modelo de Langmuir, R_L , ser igual a 12,95, e o fator relativo ao modelo de Freundlich, n , ser inferior a 1 (

Tabela 13). Sendo assim, devido ao fato de n estar relacionado ao número de camadas de adsorvente, e considerando o melhor ajuste, neste trabalho, a adsorção de Cr(VI) em quitosana foi considerada como ajustada ao modelo de Freundlich.

Figura 27 - Adsorção de Cr(VI) em celulose: Linha representa o ajuste à Isoterma de Langmuir e símbolos representam os dados

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como para a adsorção em quitosana, o valor de n também foi inferior à unidade ($1/n = 1,52$), indicando que o íon apresenta maior afinidade pelo solvente do que ao adsorvente (SITE, 2001), o que pode ser explicado pelo fato de que os sítios de adsorção da quitosana são compostos por grupos hidroxila e amino, nos quais a adsorção de íons negativos como o cromato é máxima nas formas protonadas, que ocorre em condições de pH baixo, quando há o aumento dos íons H^+ no meio e ligação destes com os íons OH^- , permitindo que o íon cromato se ligue ao adsorvente protonado (MA et al., 2011; SINGH et al., 2014; VOISIN et al., 2017; ZIMMERMANN; BORDEANU; STRUB, 2010).

Assim como para a quitosana, a celulose também apresenta maiores taxas de adsorção em pH baixos como apresentado no estudo de Lu et al. (2012), em que também foi avaliado a adsorção de Cr(VI) em celulose bacteriana, com concentração inicial de metal de 50 -90 mg L⁻¹, taxa de aplicação de adsorvente de 1 g L⁻¹ e pH de 1; a isoterma de adsorção que descreveu o processo foi a de Langmuir. O estudo foi desenvolvido neste pH pelo fato de apresentar as maiores percentagens de remoção do metal a partir do meio líquido nestas condições. Todavia, como apresentado por Módenes et al. (2016), a espécie de cromo predominante em pH inferior a 3 é a Cr(III), o que pode ser um indício de que a celulose apresente maior afinidade ao metal neste estado de valência.

Figura 28 - Adsorção de Cr(VI) em celulose: Linha representa o ajuste à Isoterma de Freundlich e símbolos representam os dados

Fonte: Elaborado pela autora.

As equações obtidas por meio da regressão linear para ambos os modelos, juntamente com os parâmetros obtidos a partir da inclinação e da interseção, estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros das isotermas de adsorção de Cr(VI) em celulose

Modelos	Equação	R ²	q _{max} (mg g ⁻¹)	K _L (L mg ⁻¹)	K _F (L g ⁻¹)	R _L	1/n
Langmuir	y = - 1,9794x + 92,218	0,69	-0,505	-0,021	-	12,95	-
Freundlich	y = 1,5245x - 2,1855	0,98	-	-	0,006	-	1,52

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Cinética de adsorção

Foram desempenhados testes iniciais para a determinação do tempo de equilíbrio da adsorção de cromo (na forma de K₂Cr₂O₇) em quitosana, a uma temperatura constante de 30°C, como forma de avaliar se o processo adsorptivo se estabilizaria neste período. Esta temperatura de trabalho foi determinada por ser a temperatura mínima de estabilização da estufa.

Como pode ser observado na Figura 29, a adsorção atinge o equilíbrio para a temperatura de 30°C nas primeiras horas do tempo de contato entre íons de Cr(VI) (na forma

de dicromato de potássio – $K_2Cr_2O_7$), mesmo sem agitação do líquido. O que indica que a concentração de metal no meio líquido era muito alta, resultando em uma saturação rápida do adsorvente. O coeficiente de ajuste à curva logarítmica para adsorção de cromo em quitosana a 30°C foi de 0,88, indicando um bom ajuste à curva.

Fonte: Elaborado pela autora.

Posteriormente, outros testes foram desenvolvidos em incubadora de BOD a uma temperatura de 25°C, mesma condição a que os testes ecotoxicológicos foram submetidos, como uma forma de explicar como a adsorção se daria nas mesmas condições experimentais em que os testes ecotoxicológicos foram realizados.

Para esta temperatura (Figura 30), o equilíbrio da reação foi atingido no tempo de contato de 3 horas, próximo ao tempo de equilíbrio para a temperatura de 30°C, e também se manteve estável nos demais períodos avaliados. O coeficiente de ajuste à curva logarítmica foi alto, com um R^2 de 0,96.

Figura 30 - Cinética de adsorção de Cr(VI) em quitosana (mg kg^{-1}) a 25°C

Fonte: Elaborado pela autora.

A adsorção de Cr(VI) continuou aumentando ligeiramente após o tempo de equilíbrio, o que, de acordo com Sağ e Aktay (2002) pode sugerir que o processo de quimiossorção tenha ocorrido, cuja captura muitas vezes irreversível, possa ser responsável por boa parte da captação de Cr(VI).

Cabe ressaltar que a adsorção pode ter sido prejudicada em consequência do pH próximo à neutralidade adotado no presente estudo, pois como já explanado, as remoções do íon Cr(VI) podem ser maiores em pH próximo a 3, como observado por Bosinco et al. (1998), Aydin e Aksoy (2009), e por Kyzas, Kostoglou e Lazaridis (2009).

Os dados da cinética de adsorção foram avaliados para modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, que são os modelos mais aplicados para a cinética de adsorção de metais (SAĞ; AKTAY, 2002). Os dados de adsorção de íons Cr(VI) se ajustaram melhor ao modelo de pseudo-segunda ordem para a quitosana, com um coeficiente de correlação de 0,9961, como demonstrado na Figura 31. O coeficiente de correlação ao modelo de pseudo-primeira ordem foi alto, porém inferior ao de pseudo-segunda ordem ($R^2 = 0,93$) (Tabela 14). O maior ajuste de adsorção de Cr(VI) em quitosana está em acordo com os trabalhos de Sağ e Aktay (2002), Jung et al. (2013) e Aydin e Aksoy (2009). O modelo de pseudo-segunda ordem relaciona-se com a predominância da quimiossorção como força diretiva da adsorção ocorrente nas condições experimentais vigentes.

Figura 31 - Plotagem linear do modelo de pseudo-segunda ordem da cinética de adsorção de Cr(VI) em quitosana

Fonte: Elaborado pela autora.

Como apresentado por Nascimento et al. (2014) e Febrianto et al. (2009), o modelo de pseudo-primeira ordem se ajusta melhor para casos onde a adsorção é mais rápida, como no início da curva de adsorção em função do tempo, e, também, quando a concentração de soluto no meio líquido é muito alta.

O modelo de pseudo-primeira ordem geralmente se aplica à fase inicial da curva de adsorção (fase log) quando seu crescimento é máximo (SAĞ; AKTAY, 2002).

Tabela 14 - Parâmetros para determinação da cinética de adsorção em quitosana

Modelo	Equação	R ²	k ₁ (g mg ⁻¹ h ⁻¹)	q _e (mg g ⁻¹)	k ₂ (g mg ⁻¹ h ⁻¹)
Pseudo-primeira ordem	y = - 0,111x + 3,418	0,939	0,048198	-	-
Pseudo-segunda ordem	y = 0,0002x + 0,0001	0,996	-	5000	0,0004

Fonte: Elaborado pela autora.

A adsorção de Cr(VI) em quitosana em condições de equilíbrio foi superior à adsorção do metal em celulose, de modo que as taxas de adsorção em quitosana situaram-se entre 4000-5000 mg kg⁻¹, ao passo que as taxas de adsorção em celulose estiveram em torno de 2000 mg kg⁻¹. O que pode estar ligado ao fato de que esta espécie química de cromo apresente maior afinidade com a quitosana, pois como demonstrado no estudo de Lu et al.

(2012) e Módenes et al. (2016), as maiores taxas de adsorção de celulose foram em pH menor que 7, com predominância da espécie Cr(III).

A adsorção de Cr(VI), tanto em quitosana quanto celulose, foram maiores nos tempos de contato iniciais, em concordância com os resultados apresentados por Udaybhaskar, Iyengar e Rao (1990). No entanto, o aumento da taxa de adsorção em celulose na fase log da curva (Figura 32) foi muito maior do que para quitosana, de modo que ao avaliar os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, os resultados geraram uma reta de maior inclinação, favorecendo o ajuste ao modelo de pseudo-primeira ordem, cujo coeficiente de correlação foi de 0,97 (Figura 33), sugerindo a predominância da adsorção por difusão. Como afirma Azizian (2004), a cinética de adsorção além de ser dependente das concentrações de adsorvato no meio líquido, também está relacionada ao tipo de adsorvente aplicado, o que explica que sob as mesmas condições experimentais, os ajustes para quitosana e celulose foram diferentes.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 33 - Plotagem linear do modelo de pseudo-primeira ordem da cinética de adsorção de Cr(VI) em celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, apesar das altas taxas de adsorção de Cr(VI) em celulose, a adsorção de espécies metálicas aniônicas, a partir de soluções, pode ser potencializada por meio de grupos hidroxila carregados positivamente (protonação), de modo que maiores taxas de adsorção de ânions são obtidas em pH mais baixos (SINGH et al., 2014; VOISIN et al., 2017).

Os parâmetros de ambos os modelos avaliados para adsorção de Cr(VI) em celulose estão representados na Tabela 15, na qual é possível observar os respectivos coeficientes de ajuste.

Tabela 15 - Parâmetros para determinação da cinética de adsorção em celulose

Modelo	Equação	R ²	k ₁ (g mg ⁻¹ h ⁻¹)	q _e (mg g ⁻¹)	k ₂ (g mg ⁻¹ h ⁻¹)
Pseudo-primeira ordem	y = - 0,0229x + 2,8673	0,97	0,009944	-	-
Pseudo-segunda ordem	y = 0,0006x + 0,0003	0,32	-	1666,667	0,0012

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Carta Controle

O sal utilizado para a elaboração da carta controle dos organismos estudados foi o KCl. Os resultados da mortalidade dos organismos expostos às concentrações de sal foram aplicados no teste estatístico de probito, o qual se baseia em uma curva acumulativa de valores de mortalidade de organismos expostos, decorrentes do aumento da concentração de um contaminante, de modo que, por meio do teste do qui-quadrado, o ajuste dos dados ao modelo é verificado.

5.3.1 Carta controle *C. sancticaroli*

A Figura 34 mostra a CL_{50} de larvas de *C. sancticaroli* em IV instar para a concentração de $6,53 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ de KCl e um IC de $6,14\text{-}7,01 \text{ g L}^{-1}$, indicando a adequabilidade dos organismos para aplicação em testes ecotoxicológicos, de modo que o ajuste de dados à curva logística apresentou um p de 0,000. O intervalo de concentrações de KCl que compreende a CL_{50} esteve superior aos valores encontrados por De Almeida (2002) ($2,83\text{-}4,1 \text{ g L}^{-1}$), Rodrigues (2011) ($2,14\text{-}4,62 \text{ g L}^{-1}$), Rebechi (2012) ($3,9\text{-}5,7 \text{ g L}^{-1}$), Da Costa (2014) ($2,38\text{-}5,41 \text{ g L}^{-1}$) e Dornfeld (2006) ($3,39\text{-}6,38 \text{ g L}^{-1}$), de modo que os resultados obtidos neste estudo estiveram mais próximos dos intervalos obtidos nos três últimos estudos mencionados.

Figura 34 - Ajuste à curva de mortalidade para *C. sancticaroli* em solução de KCl

Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores da concentração letal a 50% dos organismos expostos ao composto, bem como o erro padrão do teste e os valores máximos e mínimos para ambos os organismos avaliados, estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Carta controle dos organismos *C. sancticaroli* para solução de KCl

Organismos	Testes	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Erro padrão	Mínimo (mg L ⁻¹)	Máximo (mg L ⁻¹)
<i>C. sancticaroli</i>	Agudo	6,533	0,204	6,138	7,015

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 Carta controle *A. inaequalis*

O preparo das soluções para determinação da carta controle para *A. inaequalis* seguiu a mesma metodologia utilizada para a preparação dos testes para *C. sancticaroli*, a

partir do mesmo sal avaliado (KCl). Os dados obtidos ajustaram-se à curva logística, apresentando um p valor de 0,001, como ilustrado na Figura 35.

Figura 35 - Curva de sobrevivência para *A. inaequalis* em solução de KCl

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste caso, o valor da CL_{50} obtido de $4,72338 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 35 e Tabela 17) foi superior ao apresentado por Corbi et al. (2015), de $3,505 \text{ mg L}^{-1}$, indicando que os organismos criados em laboratório e aplicados neste estudo são mais resistentes à substância a qual foram submetidos.

Tabela 17 - Carta controle dos organismos *A. inaequalis* para solução de KCl

Organismos	Testes	CL_{50} (mg L^{-1})	Erro padrão	Mínimo (mg L^{-1})	Máximo (mg L^{-1})
<i>A. inaequalis</i>	Agudo	4,72	0,215	4,301	5,167

Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, a *Allonais inaequalis* demonstrou maior sensibilidade em relação aos organismos *C. sancticaroli* na solução salina (KCl), sendo muito importante para as próximas

etapas deste estudo avaliar organismos com diferentes graus de sensibilidade ocorrentes em um mesmo ambiente.

5.4 CL₅₀

Os pesquisadores têm personalizado os protocolos de exposição a contaminantes, selecionando os *endpoints* biológicos compatíveis com os objetivos de suas pesquisas (HANDY et al., 2012). Assim, o presente estudo optou por avaliar a CL₅₀ ao invés de CE₅₀ ou outros parâmetros subletais em resposta à exposição dos organismos *C. sancticaroli* e *A. inaequalis* a diferentes concentrações de Cr(VI), pois o intuito do estudo foi o de avaliar os efeitos da aplicação de adsorventes quanto à mortalidade dos organismos expostos ao contaminante.

5.4.1 CL₅₀ *C. sancticaroli*

O intervalo de confiança da concentração que ocasionou letalidade à 50% do número total de organismos expostos ao dicromato de potássio foi de 2,63-3,14 mg L⁻¹ (Tabela 18), estando em conformidade com o intervalo de confiança de 1,70-3,32 mg L⁻¹, determinado por De Almeida (2002). Poucos trabalhos foram encontrados na bibliografia para fins comparativos de CL₅₀ ao dicromato de potássio, pois ele constitui um composto padrão indicado para testes de sensibilidade com crustáceos, e é pouco utilizado para larvas de insetos aquáticos, sendo mais aplicado para testes com crustáceos.

Tabela 18 - CL₅₀ dos *C. sancticaroli* expostos a K₂Cr₂O₇

Testes	CL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Erro padrão	Mínimo (mg L ⁻¹)	Máximo (mg L ⁻¹)
Agudo	2,891	0,127	2,633	3,138
Crônico	1,333	0,095	1,154	1,538

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados de sobrevivência dos organismos apresentaram um ajuste à curva logística de p valor de 0,000 (Figura 36), e a CL_{50} para testes agudos com *C. sancticaroli* foi de $2,89 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 18).

Figura 36 - Curva de mortalidade para *C. sancticaroli* em solução de $K_2Cr_2O_7$ (96h)

Fonte: Elaborado pela autora.

Os organismos expostos às concentrações mais elevadas de Cr(VI) dos testes agudos, que por algum motivo não se aprofundaram na camada de sedimento ao serem adicionados nos testes, apresentaram uma falta de pigmentação, como relatado por Nebeker et al. (1984), quando comparado aos organismos que penetraram à camada de sedimento. Isso sugere que estas larvas estiveram mais expostas ao contaminante em comparação às larvas situadas nas camadas mais profundas de sedimento, sendo possível notar, no final do teste, a ausência dos casulos para estes mesmos organismos, consistindo em efeitos comportamentais da exposição ao metal.

Para os testes crônicos, como os organismos eram neonatos e, portanto, mais sensíveis à exposição ao metal, quando comparados aos efeitos de toxicidade em larvas de IV ínstar aplicadas nos testes agudos (GAUSS et al., 1985; NEBEKER; CAIRNS; WISE, 1984), os valores de CL_{50} para *C. sancticaroli* expostos ao cromo ($K_2Cr_2O_7$) foram de

$1,33 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$, uma concentração mais baixa do que a apresentada para o teste agudo. Para os testes crônicos, o ajuste à curva logística apresentou p de 0,006 (Figura 37).

Figura 37 - Curva de mortalidade para *C. sancticaroli* em solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (10 dias)

Fonte: Elaborado pela autora.

Os organismos não apresentaram efeitos subletais comportamentais como no teste agudo, no entanto, em concentrações maiores, por vezes, os organismos mostraram tamanhos inferiores, indicando um menor desenvolvimento destas larvas expostas ao contaminante.

5.4.2 CL_{50} *A. inaequalis*

As concentrações letais estipuladas para os *C. sancticaroli* foram superiores às concentrações definidas para *A. inaequalis*, pois, como nos sugere os resultados obtidos na carta controle, os oligoquetos mostraram-se mais sensíveis do que os quironomídeos (Tabela 18 e Tabela 19), o que talvez se relacione ao fato da ausência de sedimentos nos ensaios com os oligoquetos, de modo que estes organismos estejam mais expostos ao contaminante que os quironomídeos.

Os oligoquetos apresentaram CL_{50} inferior a um terço da concentração apresentada para *C. sancticaroli* para o cromo na forma de dicromato de potássio. Para os ensaios agudos, a CL_{50} foi de $0,857 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ (IC 0,812-0,913 mg L^{-1}) como expresso na Tabela 19.

Tabela 19 - CL_{50} das *A. inaequalis* expostas a $K_2Cr_2O_7$

Testes	CL_{50} (mg L^{-1})	Erro padrão	Mínimo (mg L^{-1})	Máximo (mg L^{-1})
Agudo	0,857	0,024	0,812	0,913
Crônico	0,713	0,018	0,68	0,749

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados de sobrevivência de *A. inaequalis* expostos às concentrações de Cr(VI) na forma $K_2Cr_2O_7$, em ensaios de curta duração, apresentaram um ajuste à curva logística de p valor de 0,012, como evidenciado na Figura 38.

Ao passo que a curva de sobrevivência da *A. inaequalis* de exposição crônica ao mesmo contaminante está descrita na Figura 39, cujo ajuste dos dados à curva logística apresentou um p de 0,001.

A CL_{50} do ensaio crônico foi ligeiramente inferior a do ensaio agudo, situando-se próxima a 0,7 mg L^{-1} (IC 0,68-0,75 mg L^{-1}).

Figura 38 - Curva de mortalidade para *A. inaequalis* em solução de $K_2Cr_2O_7$ (96h)

Fonte: Elaborado pela autora.

Para os ensaios de longa duração (10 dias), foi comum ocorrer a reprodução dos organismos em condições de ausência de cromo ou mesmo nas concentrações mais baixas do metal, o que não foi observado nos organismos expostos às concentrações mais elevadas.

Os organismos expostos às concentrações mais altas apresentavam-se enrolados em torno de si mesmos e, por vezes, sem suas partes posteriores, de forma a apresentar um tamanho inferior do que possuíam no início do teste. Alguns casos de organismos da família Naididae, sem suas partes traseiras, já foram relatados em bibliografia (GORNI; ALVES, 2006). Este comportamento, bem como a ausência de cauda, não foram observados em condições ideais de desenvolvimento para as *A. inaequalis*, no caso, nas amostras de controle do presente trabalho.

Figura 39 - Curva de mortalidade para *A. inaequalis* em solução de $K_2Cr_2O_7$ (10 dias)

5.5 Testes ecotoxicológicos em presença de quitosana

Primeiramente, foram realizados pré-testes com a finalidade de definir as taxas de aplicação dos adsorventes, baseados na redução da mortalidade de organismos e na taxa de adsorção de cromo (na forma de $K_2Cr_2O_7$), para posterior efetivação dos bioensaios.

5.5.1 Testes preliminares para a determinação da massa de adsorvente a ser aplicada

Como testes preliminares para determinar a massa de hidrogéis de pérolas de quitosana (quitosana com peso úmido) a ser aplicada em testes posteriores, foram avaliadas as taxas de mortalidade de larvas de *C. sancticaroli* expostas às concentrações remanescentes do mesmo contaminante (Figura 40) como reflexo da adsorção do metal, bem como a taxa de remoção de Cr(VI) (Figura 41) e em presença de 5 e 10 g de pérolas de hidrogéis de quitosana (peso úmido) e concentrações iniciais do metal de 0, 0,5 e 2,5 mg L⁻¹.

Ambas as variáveis avaliadas não demonstraram diferenças consideráveis nas concentrações avaliadas entre as concentrações de adsorvente aplicadas, tendo em vista que as taxas de mortalidade não variaram muito entre as duas concentrações de adsorvente aplicadas. No entanto, pode-se observar uma maior sobrevivência na concentração inicial de metal mais alta ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) em presença de quitosana, cujas taxas de sobrevivência foram superiores às aquelas apresentadas na ausência do biopolímero. A taxa de sobrevivência para a maior concentração em presença de polímero foi superior a 80%, ao passo que em ausência de quitosana, foi de 65-85%.

Figura 40 - Percentagem de sobrevivência de *C. sancticaroli* em presença de quitosana – Testes preliminares

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto às taxas de remoção de íons metálicos de Cr(VI), os resultados para ambas as massas de adsorvente aplicadas mostraram-se muito próximas, podendo indicar que, para as condições de pH e concentração inicial de metal no ensaio, as menores taxas de adsorvente aplicadas foram satisfatórias para as respostas avaliadas, de forma que as diferenças não foram expressivas, não justificando a adoção de massas maiores (AYDIN; AKSOY, 2009).

Deste modo, optou-se por aplicar 5 g de pérolas de hidrogéis de quitosana nos testes subsequentes, em virtude desta sutil diferença, para a taxa de remoção de metais do meio e mortalidade de organismos expostos, entre as concentrações aplicadas e em vista da limitação de matéria prima (quitosana em pó) disponível para a produção das pérolas a serem aplicadas nos ensaios.

Figura 41 - Taxa de remoção de Cr(VI) em presença de quitosana – Testes preliminares

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.2 Ensaios ecotoxicológicos com *C. sancticaroli*

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos, quando submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, resultaram em uma resposta negativa ao ajuste à normalidade. E após aplicação de tratamentos quadrático, cúbico, senoidal e raiz quadrada, ainda continuaram não apresentando uma curva de distribuição normal.

Os resultados foram então submetidos ao tratamento estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual apresentou valores de $p > 0,05$, indicando que os dados não apresentavam diferenças estatísticas conforme os tratamentos aplicados, ou seja, que o tempo

de contato e o aumento das concentrações de metais não repercutiram em alterações das taxas de sobrevivências dos organismos expostos.

Os ensaios ecotoxicológicos de curta duração (96 horas), com *C. sancticaroli*, foram desempenhados em 6 concentrações diferentes (Controle (0), 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5 mg L⁻¹), devido ao grande intervalo de confiança da CL₅₀ para estes organismos nestas condições do ensaio. Como pode ser observado na Figura 42, as taxas de sobrevivência na concentração 0 foram máximas, e diminuíram conforme houve o aumento da concentração de Cr(VI).

Figura 42 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de *C. sancticaroli* em ensaios agudos em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) versus tempo de contato com o adsorvente

Fonte: Elaborado pela autora.

No

APÊNDICE A – Resultados dos ensaios ecotoxicológicos, constam as tabelas nas quais estão descritas as médias dos resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos, sendo possível observar a diferença nas taxas de sobrevivência na ausência e na presença dos adsorventes. Para os testes agudos, nas concentrações de 4,0 e 4,5 mg L⁻¹, as taxas de sobrevivência média respectivas na ausência de quitosana são de aproximadamente 40% e 31%, fazendo-se notável o aumento da sobrevivência dos organismos na presença de quitosana e salientando a importância ecológica da aplicação de adsorventes na recuperação de ambientes contaminados para sobrevivência das espécies afetadas.

Como explicado na seção 4, MATERIAL E MÉTODOS, os tempos de contato foram prévios à inserção dos organismos-teste ao ensaio, ou seja, o adsorvente ficou em contato com o adsorvato 0, 24 e 48 horas antes dos organismos serem introduzidos nas amostras. O tempo inicial exerceu uma influência determinante na sobrevivência dos organismos, pois como pode ser observado, nos tempos 0 h, as taxas de sobrevivência foram muito inferiores aos demais, de modo que para todos os casos, nas amostras cujo tempo de contato foi de 48 horas, as taxas de sobrevivência foram maiores.

O que é justificado pelo fato de que a adsorção, principalmente em condições de não agitação, leva mais tempo até atingir o tempo de equilíbrio, e este contato inicial da larva com o contaminante é crucial, pois dependendo do ínstar em que os organismos se encontrem, pode culminar no aumento da mortalidade.

De forma semelhante, as percentagens de adsorção de Cr(VI) por quitosana no tempo de 0 h foram, na maior parte do tempo, levemente inferiores que os demais tempos de contato para as concentrações avaliadas (Figura 43). No entanto, essas diferenças não foram significativas, sendo coerente com o fato de que para uma mesma concentração utilizaram-se as mesmas condições experimentais, variando somente o tempo de contato inicial de aplicação de adsorvente. As concentrações de metal adsorvido foram determinadas a partir das massas de adsorvente aplicadas nos testes, as quais eram removidas somente ao final do ensaio. Deste modo, é lógico que não haveria diferenças consideráveis para as percentagens de remoção de metal para uma mesma concentração inicial de Cr(VI) aplicada.

Figura 43 - Percentagem de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos agudos com *C. sancticaroli* em diferentes tempos de contato

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 43, pode-se observar ainda o aumento da percentagem de adsorção de íons metálicos, mediante o aumento inicial de concentração de Cr(VI), evidenciando-se, deste modo, que o adsorvente não atingiu a saturação para as concentrações iniciais aplicadas pela sua capacidade de adsorção perante o aumento da concentração de soluto, pois, caso contrário, a concentração remanescente seria maior, reduzindo a percentagem de remoção.

Assim como para os ensaios agudos com *C. sancticaroli*, nos ensaios de longa duração, as taxas de sobrevivência dos organismos expostos aumentaram em conformidade com o aumento do tempo de contato entre adsorvato-adsorvente, sendo mais expressiva a diferença entre os tempos de contato de 24 e 48 horas (Figura 44). É evidente a importância do tempo de contato quando comparamos os tempos de 0 e 48 horas, principalmente neste tipo de ensaio, onde as larvas utilizadas são mais jovens, de I instar larval (0-48 horas após a eclosão), sendo mais suscetíveis ao contaminante do que as larvas maiores de IV instar que são aplicadas nos testes de curta duração agudos (GAUSS et al., 1985; NEBEKER; CAIRNS; WISE, 1984).

As taxas de sobrevivência dos organismos expostos ao cromo, em ausência de quitosana para as concentrações de 1,5, 2,0 e 2,5, variaram de 36 a 11%. Por outro lado, em presença de quitosana, principalmente nos tempos de contato de 48 horas, as taxas de sobrevivência se mantiveram entre 70-90%, evidenciando que a quitosana tem um grande potencial quanto à proteção das espécies expostas, permitindo a manutenção da sobrevivência.

Figura 44 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de *C. sancticaroli* em ensaios crônicos em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) *versus* tempo de contato com a quitosana

Fonte: Elaborado pela autora.

A taxa de mortalidade não variou com o aumento da concentração de contaminante, o que consiste em um indício de que a taxa de adsorvente aplicada não atingiu a saturação para as concentrações iniciais de metais aplicadas. Como pode ser constatado na Figura 45, percentagens de adsorção de Cr(VI) situaram-se entre 60-80% para todas as concentrações avaliadas e, como já explicado, principalmente para tempos de contato totais entre adsorvato-adsorvente tão longos (10 dias – duração do ensaio crônico), o sistema já havia atingido o tempo de equilíbrio, não havendo diferença de adsorção entre os tempos de contato prévios à inserção dos organismos-teste.

Figura 45 - Percentagem de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos crônicos com *C. sancticaroli* em diferentes tempos de contato

Fonte: Elaborado pela autora.

Para os testes de longa duração, também podem ser observados outros *endpoints* com o tamanho das larvas expostas. Na Figura 46, estão representados os tamanhos das larvas expostas ao Cr(VI) em ausência de quitosana, e na Figura 47, são apresentados os tamanhos das larvas expostas ao Cr(VI) em presença de quitosana. É possível observar que o tamanho médio das larvas em ausência de quitosana foi de 6-10 cm para todas as concentrações iniciais de metal aplicado, porém, o comprimento médio aumentou em presença de quitosana, situando-se entre 7-15 cm para as concentrações avaliadas. Houve uma diferenciação quanto ao tempo de contato inicial, de modo que nos tempos de contato 0 h, muitas larvas não sobreviveram, sendo contabilizadas com o comprimento 0. O comprimento das larvas aumentou conforme o aumento do tempo de contato inicial, sendo máximo para o tempo de contato de 48 horas. Deste modo, é possível afirmar que a quitosana além de reduzir a mortalidade para exposições agudas, também é aplicável para a redução de outros efeitos nocivos decorrentes da exposição dos organismos a contaminantes.

Figura 46 - Boxplot do comprimento das larvas de *C. sancticaroli* submetidas à exposição de longa duração ao Cr(VI)

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 47 - Boxplot do comprimento das larvas de *C. sancticaroli* submetidas à exposição de longa duração ao Cr(VI), em diferentes tempos de contato com a quitosana

Fonte: Elaborado pela autora.

5.5.3 Ensaios ecotoxicológicos com *A. inaequalis*

Os organismos *A. inaequalis* também foram aplicados em testes de curta e longa duração, assim como os *C. sancticaroli*. No entanto, as concentrações iniciais de Cr(VI) foram inferiores às utilizadas nos testes com os quironomídeos pelo fato desta espécie de Oligochaeta ser mais sensível ao contaminante estudado, como já apontado na seção anterior, da concentração letal a 50% dos organismos expostos, ou mesmo pela ausência de sedimento nos testes com estes organismos tornando a exposição mais intensa.

Na Figura 48, estão dispostas as percentagens de sobrevivência para cada uma das concentrações avaliadas e os respectivos tempos de contato entre adsorvente-adsorvato. Nas concentrações de 1,0 e 1,5 mg L⁻¹, as taxas de sobrevivência aumentaram concomitantemente ao aumento do tempo de contato. Todavia, para as concentrações de 2,0 e 2,5 mg L⁻¹, as maiores taxas de sobrevivência foram com relação ao tempo de contato de 24 horas, pois no t = 48 h, a sobrevivência sofreu uma redução. Já para a maior concentração inicial (3,0 mg L⁻¹), as maiores taxas de sobrevivência foram obtidas no tempo t = 0. Foram os ensaios onde a variação ambiental dos organismos foi mais expressiva, uma vez que as respostas não seguiram um padrão de alteração, mesmo mediante a alteração dos parâmetros avaliados.

Nos ensaios de oligoquetos expostos somente ao Cr(VI), as taxas de sobrevivência foram de 13% para a concentração de 1,0 mg L⁻¹, de 2% para a concentração de 1,5, e de 0% para as demais concentrações. É incontestável a contribuição da quitosana quanto à sobrevivência desta espécie, especialmente nestas condições onde não sobreviveria nenhum organismo, foram observadas taxas de sobrevivência partindo de 0 até 90%, em alguns casos.

As divergências apresentadas para as taxas de sobrevivência dos organismos não foram acompanhadas pelas percentagens de remoção de metais, que partiram de 40 a 60% durante todo o teste, acompanhando o aumento da concentração inicial de íons metálicos, como pode ser observado na Figura 49.

Figura 48 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de *A. inaequalis* em ensaios agudos em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) *versus* tempo de contato com o adsorvente

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 49 - Percentagem de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos agudos com *A. inaequalis* em diferentes tempos de contato

Fonte: Elaborado pela autora.

Os ensaios de longa duração apresentaram taxas de sobrevivências maiores e, na maioria das concentrações avaliadas, houve um padrão, um aumento da sobrevivência acompanhado do aumento do tempo de contato inicial entre adsorvato-adsorvente, sendo maior nas concentrações de 48 horas, exceto para o tempo de contato de 1,0 mg L⁻¹, para a

qual a taxa de sobrevivência de 48 horas variou de 0-100%. Nos demais casos, as taxas de sobrevivência foram inferiores para o tempo $t = 0$ (Figura 50).

Nas amostras em ausência de quitosana, as taxas de sobrevivência foram de 70% na concentração mais baixa ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e de aproximadamente 10% nas demais concentrações, ao passo que em presença de quitosana, as taxas de sobrevivências médias foram superiores a 20%, de modo que para a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, estiveram próximas a 100% nos tempos de contato de 24 e 48 horas, e nas demais concentrações foram superiores a 60%. Mesmo no tempo $t = 0$, em que se obtiveram taxas de sobrevivências inferiores, ainda se mantiveram acima dos valores apresentados para as amostras em ausência de quitosana.

Figura 50 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de *A. inaequalis* em ensaios crônico em presença de quitosana - concentração inicial de Cr(VI) *versus* tempo de contato com o adsorvente

Fonte: Elaborado pela autora.

Distintamente dos casos anteriores, as percentagens de remoção de Cr(VI) nos tempos de contato de 48 horas foram inferiores aos demais tempos de contato, mantendo-se próximas a 60%, ao mesmo tempo que nos tempos de 0 e 24 horas, as percentagens foram aproximadamente de 80% (Figura 51).

Figura 51 - Percentagens de adsorção de Cr(VI) por quitosana em ensaios ecotoxicológicos crônicos com *A. inaequalis* em diferentes tempos de contato

Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Testes ecotoxicológicos em presença de celulose

Entre todos os ensaios elaborados com celulose, foram apresentados somente os resultados dos ensaios de curta duração com *C. sancticaroli*, pelo fato de que nos outros testes as taxas de aplicação de celulose foram muito baixas, de modo que as concentrações de metais adsorvidos não foram suficientes para atingir os limites de detecção do equipamento utilizado para tal finalidade.

Na Figura 52, estão dispostas as taxas de sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli* de IV ínstar, expostas ao Cr(VI) em presença de celulose. Como pode-se observar, as taxas de sobrevivência diminuíram com o aumento das concentrações iniciais de metais e foram superiores para o tempo de contato entre adsorvente-adsorvato de 24 horas. Os tempos $t = 0$ não surtiram efeitos positivos quanto a este parâmetro, apresentando taxas de mortalidade de 100% dos organismos expostos.

Figura 52 - Boxplot da percentagem de sobrevivência de *C. sancticaroli* em ensaios agudos em presença de celulose - concentração inicial de Cr(VI) *versus* tempo de contato com a celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

5.7 Testes de adsorção em sedimento contaminado

Apesar de a matéria orgânica apresentar capacidade de se complexar com metais (CAMPAGNA; RODRIGUES; VERANI, 2013; MORTENSEN, 1963), e servir de alimento a organismos bentônicos, favorecendo a absorção de contaminantes associados aos sedimentos (GRANBERG; FORBES, 2006), este apresentou percentuais muito baixos, não representando um propulsor da mortalidade dos organismos expostos no presente estudo.

Os teores de matéria orgânica nos sedimentos dos córregos avaliados (Figura 53) atingiram uma percentagem máxima de 24% para o Córrego Fazzari, ao passo que para os demais córregos avaliados, os valores se mantiveram entre 0,62-15%. Quando comparada aos teores de matéria orgânica de sedimentos turfosos (> 50%), de reconhecida capacidade adsortiva (LAMIM et al., 2001; PETRONI; PIRES; MUNITA, 2000), é possível afirmar que as concentrações de matéria orgânica nos sedimentos avaliados foram muito baixas.

Figura 53 - Teor de matéria orgânica presente nos sedimentos contaminados

Fonte: Elaborado pela autora.

Da mesma forma, as partículas de argila aumentam a capacidade de troca catiônica (CTC) do sedimento sendo, inclusive, aplicadas para a remoção de metais pesados e outros contaminantes do meio líquido (BAKEN et al., 2011; UDDIN, 2017; WANG; HARRELL, 2005), deste modo, sua presença nos sedimentos pode interferir no processo de adsorção de metais em quitosana e celulose. As granulometrias dos sedimentos dos córregos avaliados mostraram-se em sua maior parte arenosas, o que indica uma baixa interação com os metais presentes. No entanto, o córrego Água Sumida apresentou uma granulometria argilo-siltosa e para o córrego Fazzari, o sedimento mostrou-se com granulometria silto-argilosa, como mostra a Tabela 20.

Os metais avaliados neste estudo foram: cádmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr) total, manganês (Mn), zinco (Zn) e magnésio (Mg), determinados a partir de técnicas de extração de metais de sedimentos. As massas de metais adsorvidos em quitosana e celulose também foram determinadas em função da massa de adsorvente aplicada, no entanto, os cálculos para metais adsorvidos em quitosana referiram-se à massa de quitosana seca e não à massa de pérolas de hidrogel.

A liberação de metais do solo para o meio líquido pode estar relacionada ao pH dos sedimentos. No entanto, no presente estudo, os pHs foram mensurados em quadruplicatas e foram observados valores de 8 para os córregos Água Preta, Bela Vista, Chibarro e São

Vicente, indicando condições moderadamente alcalinas, ao passo que para os demais córregos avaliados, os valores do pH situaram-se entre 7 e 7,5, apresentando condições de neutralidade.

O cádmio foi detectado em todos os córregos estudados (Figura 54), apresentando valores máximos para o córrego Chibarro ($1,75 \text{ mg kg}^{-1}$), seguido do córrego Bela Vista ($1,0 \text{ mg kg}^{-1}$), Fazzari ($0,975 \text{ mg kg}^{-1}$), São Vicente ($0,75 \text{ mg kg}^{-1}$) e Espraiado (córrego referência) ($0,675 \text{ mg kg}^{-1}$). Já nos córregos Água Sumida e Água Preta, as concentrações foram inferiores ao córrego de referência ($0,25$ e $0,425 \text{ mg kg}^{-1}$).

Tabela 20 - Granulometria dos sedimentos contaminados

Córrego	Solo	$\rho_s (\text{kg m}^{-3})$
Água Preta	Areia fina e média, marrom escuro com matéria orgânica	2,680
Água Sumida	Argila siltosa, pouco arenosa cinza escuro com matéria orgânica	2,750
Bela Vista	Areia média, fina e pouco grossa, siltosa, marrom escuro	2,680
Chibarro	Areia média e fina, marrom escuro com matéria orgânica	2,680
Espraiado	Areia média, grossa e fina, cinza médio com presença de matéria orgânica	
Fazzari	Silte argiloso preto com matéria orgânica	2,800
São João	Areia fina, média e pouco grossa com pedregulho, marrom escuro	2,680
São Vicente	Areia fina e média amarela com presença de matéria orgânica	

Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação à adsorção de metais em quitosana, as adsorções de Cd se mantiveram entre $11\text{-}15 \text{ mg kg}^{-1}$ para cada um dos córregos, exceto para o córrego Espraiado o qual apresentou adsorção de $9,4 \text{ mg kg}^{-1}$, apresentando uma das concentrações iniciais mais baixas para cádmium.

As adsorções de cádmium em celulose para cada um dos córregos avaliados estiveram bem próximas dos valores apresentados para quitosana, variando de $8\text{-}15 \text{ mg kg}^{-1}$ de adsorvente aplicado. Comparativamente à quitosana, suas taxas de adsorção foram inferiores na maioria dos córregos, mostrando maiores eficiências para os córregos Água Preta e Espraiado.

Figura 54 - Concentração de cádmio em sedimentos contaminados, em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

O cádmio apresentou menor concentração em sedimentos do que o cromo e o cobre, apesar destes outros metais não ocorrerem em todos os sedimentos de córregos avaliados. No entanto, suas adsorções em quitosana e celulose foram superiores às adsorções destes metais, o que pode ser explicado pela alta afinidade entre o cádmio e grupos funcionais contendo nitrogênio, como é o caso do agrupamento amina (HUANG et al., 1996). Todavia, a ligação de cádmio em quitosana, de acordo com Ogawa et al. (1984) e Roberts (1992), provavelmente se dá com o íon metálico ligado a um grupamento amina da cadeia da quitosana de forma pendente.

O modelo de ligação pendente pode prejudicar o processo de difusão dos íons através do hidrogel de quitosana, em função dos efeitos puramente mecânicos da introdução de obstáculos ou pela introdução de grupos capazes de interagir com os íons através de interações eletrostáticas ou pela formação de complexos (ROBERTS, 1992).

Não obstante, há relatos em bibliografia de que o cobre e o cromo apresentam maiores afinidades com a quitosana em relação ao cádmio (YANG; ZALL, 1984). Os autores Kaminski et al. (2008) observaram que a ordem de seletividade dos metais pode ser alterada em função da concentração inicial dos mesmos no meio líquido.

As concentrações de cobre nos sedimentos avaliados (Figura 55), foram superiores para o córrego São João (30 mg kg^{-1}), seguidas dos córregos Água Preta (23 mg kg^{-1}), Bela Vista (15 mg kg^{-1}) e Chibarro (8 mg kg^{-1}), enquanto que no córrego referência, Espirado, não foi detectada a presença desse metal. As concentrações de cobre observadas por Corbi et al. (2008) foram muito superiores para os córregos Água Sumida (55 mg kg^{-1}), Bela Vista (25 mg kg^{-1}), São Vicente (10 mg kg^{-1}) e Espirado (5 mg L^{-1}) no ano de 2008. Ao passo que o córrego Água Preta apresentou concentrações de cobre muito superiores no presente estudo (23 mg kg^{-1}), comparadas ao estudo de 2008, em que este metal não foi detectado neste córrego.

Figura 55 - Concentração de cobre em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

Não foram observadas adsorções de cobre em quitosana e em celulose nas amostras de sedimento avaliadas, dentro das faixas de detecção do equipamento utilizado, o que pode ser justificado pelo fato de que os íons Cu(II) possuem uma grande afinidade por grupos funcionais contendo oxigênio (dois grupos em pH 6-7). Deste modo, sua adsorção pode ser desfavorecida com o processo de reticulação da quitosana (HUANG; CHUNG; LIOU, 1996; MICERA et al., 1985).

Em geral, as concentrações de cromo foram muito altas em todos os sedimentos dos córregos avaliados (Figura 56), quando comparados ao estudo de Corbi et al. (2008), o qual apresentou concentrações de cromo variando de 0,1-0,8 mg kg⁻¹ para os mesmos córregos avaliados no presente estudo.

Com exceção do córrego Fazzari, com concentração de 196 mg kg⁻¹, nos demais córregos os valores mais expressivos para o cromo foram nos córregos Bela Vista e Chibarro, com concentrações próximas a 10 mg kg⁻¹. Para os demais córregos avaliados, as concentrações de cromo variaram entre 1-5 mg kg⁻¹.

Apesar das altas concentrações de cromo em todos os sedimentos, a adsorção dos íons em quitosana foi observada somente no córrego Fazzari, cuja concentração inicial de cromo foi muito mais elevada do que nas demais amostras. Foram observadas adsorções em celulose para os córregos Fazzari e Espiraiado, de modo que para o primeiro córrego, a adsorção de metal foi muito superior, se comparada a adsorção apresentada para quitosana.

Figura 56 - Concentração de cromo em sedimentos contaminados, em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

As concentrações mais elevadas de zinco foram nos córregos: Chibarro (35 mg kg⁻¹), Água Sumida (29 mg kg⁻¹), São João (29 mg kg⁻¹) e Bela Vista (23 mg kg⁻¹),

como representado na Figura 57. As concentrações de Zn foram baixas para o Córrego Espraiado (2 mg kg^{-1}) e Água Preta ($4,7 \text{ mg kg}^{-1}$).

A maior adsorção de zinco em quitosana foi para o córrego referência (91 mg kg^{-1}), e a menor para o córrego São Vicente (68 mg kg^{-1}), mantendo-se elevada para todas as amostras.

As concentrações de cobre e cromo apresentaram-se próximas às concentrações de zinco em sedimento, o qual apresentou adsorção em quitosana e celulose muito superior aos dois metais supracitados. O que contradiz o estudo de Kaminski et al. (2008), e de Yang e Zall (1984), nos quais o cromo e o cobre apresentaram afinidade à quitosana superior ao zinco, no entanto, corresponde aos resultados obtidos por Nishi et al. (1986) e Kawamura, Mitsuhashi e Tanib (1993).

Figura 57 - Concentração de zinco em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

Para Mn, as adsorções máximas foram para o córrego São João com valor de 132 mg kg^{-1} , Chibarro com 63 mg kg^{-1} , Água Sumida 29 mg kg^{-1} e São Vicente 23 mg kg^{-1} , enquanto que para os demais córregos, os valores foram inferiores a 10 mg kg^{-1} , como pode

ser observado na Figura 58. Em geral, as concentrações de Mn foram altas para todos os córregos, exceto para o córrego referência (1,5 mg kg⁻¹).

Para o manganês, todos os pontos apresentaram adsorção em quitosana, exceto o córrego Fazzari. Os maiores valores foram obtidos nos sedimentos dos córregos Chibarro (73 mg kg⁻¹), Água Sumida (31 mg kg⁻¹) e São Vicente (20 mg kg⁻¹). As adsorções em celulose foram superiores às adsorções em quitosana, o que pode ser um indicativo de uma maior afinidade entre manganês e celulose do que entre o manganês e a quitosana, uma vez que os testes foram desempenhados sob as mesmas condições experimentais. As maiores adsorções de manganês em celulose foram nos córregos São Vicente, com valores de 163 mg kg⁻¹ e Chibarro com 71,5 mg kg⁻¹.

Figura 58 - Concentração de manganês em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste estudo, a concentração inicial de zinco e manganês foram próximas, entretanto, a adsorção de zinco em quitosana foi superior à adsorção de manganês, assim como no estudo de Mitani et al. (1992), o qual também observou uma maior afinidade do zinco à quitosana, comparativamente ao manganês.

A alta concentração de magnésio no sedimento pode ser relacionada ao processo de gessagem, para correção da acidez do solo em áreas com cultura da cana-de-açúcar, bem como a fertirrigação com vinhaça, o efluente gerado pelo processo de produção de etanol (CRUSCIOL et al., 2014; DE CARVALHO et al., 2014).

As concentrações de Mg foram inferiores a 200 mg kg^{-1} para todos os córregos, exceto para o córrego São João, o qual apresentou concentrações de magnésio em sedimento de 765 mg kg^{-1} . Dentre os demais córregos, as maiores concentrações encontradas foram nos córregos Água Sumida (184 mg kg^{-1}), localizado em áreas de cultivo de cana-de-açúcar e mata ciliar ausente, seguido pelo Córrego São Vicente e Chibarro (124 e 122 mg kg^{-1} , respectivamente) (Figura 59).

Figura 59 - Concentração de magnésio em sedimentos contaminados e as massas adsorvidas em quitosana e celulose

Fonte: Elaborado pela autora.

As adsorções de magnésio em quitosana foram superiores a 500 mg kg^{-1} , exceto para o córrego Água Preta, com concentração de 355 mg kg^{-1} . A maior adsorção em quitosana foi obtida para o sedimento do córrego São Vicente (687 mg kg^{-1}).

As adsorções em celulose estiveram muito próximas aos valores obtidos para quitosana, no entanto, foram muito díspares para os córregos Água Preta (104 mg kg^{-1}) e São

João (117 mg kg^{-1}). Para os demais córregos, as massas adsorvidas estiveram entre 518-751 mg kg^{-1} , com adsorção máxima para o córrego Bela Vista.

A maior concentração de metal nos sedimentos de sítios impactados é explicada pelo uso de fertilizantes durante o cultivo de cana-de-açúcar em áreas adjacentes (CORBI et al., 2006, 2010). Essas áreas apresentaram maiores concentrações de metais do que as áreas de vegetação ripária.

É importante ressaltar que os sedimentos dos córregos avaliados se tratam de amostras naturais, localizadas em sistemas abertos. Deste modo, devemos considerar a complexidade amostral e a presença de vários compostos no sedimento e no líquido que possam interferir no processo adsorptivo. Dentre as substâncias ocorrentes em sedimento podemos citar: substâncias húmicas (DOS SANTOS et al., 2004) e compostos organoclorados, que já foram determinados para os mesmos córregos avaliados no presente estudo (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008b), que porventura possam saturar o adsorvente, uma vez que ambos os adsorventes avaliados apresentam capacidade de adsorção tanto para compostos orgânicos quanto para compostos inorgânicos.

Ensaio ecotoxicológico com larvas de *C. sancticaroli* em IV instar larval foram desenvolvidos com o objetivo de observar os efeitos da adsorção da quitosana na mortalidade destes organismos, como apresentado na Figura 60.

A adição de quitosana aos bioensaios permitiu uma maior percentagem de sobrevivência de organismos expostos aos sedimentos contaminados da maior parte dos pontos amostrais, exceto para os córregos Água Sumida, Água Preta e Espriado. Nos experimentos sem quitosana, os sedimentos dos córregos Água Sumida, Bela Vista e São Vicente foram considerados tóxicos, no entanto, quando em presença de quitosana, as amostras de Bela Vista e São Vicente foram classificadas como indícios de toxicidade (sobrevivência entre 50-90%).

A taxa de mortalidade das amostras do córrego Fazzari também pode estar relacionada às altas concentrações de matéria orgânica, associada ao processo de eutrofização do ponto de coleta. Este córrego tem passado desde 2013 por um processo de transformação de características lótic, de águas correntes, para lênticas, de águas paradas.

Figura 60 - Taxa de sobrevivência de larvas de *C. sancticaroli* (IV ínstar larval) expostas aos sedimentos contaminados

Fonte: Elaborado pela autora.

A alta mortalidade dos organismos expostos ao sedimento do córrego Fazzari pode estar relacionada à predominância de condições lânticas à dinâmica do fluxo, o que pode estar associado às concentrações de Mn, Cu, Zn e Mg, que se apresentaram sempre altas quando comparadas aos demais córregos. As maiores concentrações de metais no sedimento, dependendo das formas que as espécies metálicas se apresentem, podem resultar em sua biodisponibilidade em maiores concentrações à fauna local, sobretudo os macroinvertebrados presentes no sedimento, contribuindo deste modo para a maior taxa de mortalidade neste ponto.

6 CONCLUSÕES

O processo adsorptivo para ambos os reagentes foi mais bem explicado pela isoterma de Freundlich, sugerindo uma superfície heterogênea dos adsorventes e as interações intercamadas entre o adsorvato. Já em termos de cinética de reação para a quitosana, o melhor ajuste foi ao modelo de pseudo-segunda ordem que preconiza a quimiossorção como predominante, ao passo que para a celulose, o melhor ajuste foi ao modelo de pseudo-primeira ordem, sugerindo uma ligação por dissociação. Comparativamente, a adsorção em quitosana, sob as mesmas condições de concentração inicial de Cr(VI), temperatura, tempo de contato e pH, foi maior do que em celulose, o que pode indicar uma maior afinidade do metal à quitosana.

Quando aplicados em ensaios ecotoxicológicos, observou-se um aumento considerável nas taxas de sobrevivência dos organismos expostos ao Cr(VI), principalmente para a *A. inaequalis*, que na ausência de adsorventes, as sobrevivências foram próximas a zero, consistindo em uma técnica de grande importância ecológica, uma vez que os materiais não apresentam riscos aos organismos aquáticos, pois quando expostos somente ao adsorvente, as taxas de sobrevivência se mantiveram similares as dos controles como apresentado nos testes preliminares, e para *A. inaequalis* foi possível observar reprodução dos organismos.

A partir dos resultados dos ensaios, foi possível concluir que os tempos de contato entre o adsorvente-adsorvato, prévios à inserção dos organismos-teste, tiveram um papel fundamental nas taxas de sobrevivência dos organismos.

A quitosana e a celulose também foram avaliadas quanto à adsorção de íons metálicos presentes na matriz do sedimento a partir de testes realizados com amostras de sedimento aquáticos naturais, nas quais os adsorventes removeram íons metálicos presentes no sedimento, comprovando a sua aplicabilidade mesmo para estas condições, em que a complexação de metais por biopolímeros é um desafio em vista da complexidade desses sistemas e da infinidade de matérias presentes que possam interagir na adsorção de materiais de interesse, por meio de interferências pela coadsorção de substâncias.

A quitosana e a celulose consistem em biopolímeros que podem ser produzidos a partir de resíduos, o que resulta em menores custos para a sua produção. São materiais poliméricos não-tóxicos, que não representam riscos aos ambientes ou organismos aquáticos,

características estas associadas às suas altas capacidades adsorptivas, a uma vasta gama de contaminantes que comprovam uma boa potencialidade da aplicação destes compostos na descontaminação “*in situ*” de ecossistemas aquáticos.

É importante ainda ressaltar a possibilidade de recuperação dos adsorventes dos locais contaminados onde forem aplicados e sua regeneração a partir de tratamentos ácidos ou alcalinos (variável em função do tipo de contaminante), tornando possível a sua reutilização.

7 SUGESTÕES

- Um estudo sobre a produção de compósitos derivados da quitosana e da celulose seria interessante como forma de buscar uma melhor adsorção de contaminantes;
- Avaliação de efeitos subletais de contaminantes em nível de danos genéticos nos organismos expostos é recomendada, com a finalidade de se prever possíveis deformidades às futuras gerações;
- Avaliação da toxicidade de vertebrados, com a finalidade de extrapolar os efeitos da exposição ao Cr(VI) aos seres humanos;
- Avaliação da remoção de íons metálicos a partir de amostras de águas naturais;
- Avaliação de efeitos da exposição dos organismos a soluções multicomponentes;
- Estudar a adsorção de compostos a partir de solução multicomponentes;
- Avaliação da aplicação de adsorventes para diversas amostras ambientais de áreas contaminadas.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S. et al. Mixing and capping techniques for activated carbon based sediment remediation – Efficiency and adverse effects for *Lumbriculus variegatus*. **Water Research**, v. 114, p. 104–112, 2017.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457 - Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização**. Brasil, 1986.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713 - Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**, 2009.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes**. Brasil, 2011.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181 - Solo - Análise granulométrica**. Brasil, 2016.
- ALCÂNTARA, M. A. K. DE; CAMARGO, O. A. DE. Transporte de cromo trivalente influenciado pelo pH, horizonte do solo e fontes do cromo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 497–501, 2001.
- ALGAR, I. et al. Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 1, p. 1–8, 2014.
- ALIABADI, M. Removal of Pb(II) and Cr(VI) ions from aqueous solutions using chitosan/cobalt ferrite nanofibrous adsorbent. **Fibers and Polymers**, v. 17, n. 8, p. 1162–1170, 2016.
- ALJEBOREE, A. M.; ALSHIRIFI, A. N.; ALKAIM, A. F. Kinetics and equilibrium study for the adsorption of textile dyes on coconut shell activated carbon. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability**. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 1995.

ALMODOVAR, M. L. N.; PACHECO, A. Anomalia de cromo nas águas subterrâneas de Urânia no Noroeste do Estado de São Paulo. **Boletim IG-USP, Série Científica**, v. 26, p. 1–12, 1993.

ALVES, G.; MARCHESE, M. R.; ESCARPINATI, S. C. Oligochaeta (Annelida , Clitellata) in lotic environments in the State of Sao 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.

ANGELOTTI-NETTO, A. et al. Metais pesados provenientes de atividade agrícola: formas, prevenção e controle. In: ESPÍNDOLA, E.; WENDLAND, E. (Eds.). . **Bacia Hidrográfica: Diversas Abordagens Em Pesquisa**. São Carlos: RIMA, 2004. p. 412.

ANUPAM, K. et al. Adsorptive removal of chromium (VI) from aqueous solution over powdered activated carbon: Optimisation through response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 1, p. 135–143, 2011.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater** (L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, A. D. Eaton, Eds.) Washington American Public Health Association, , 1999.

ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges**. First Edit ed. Wareham: Springer-Science+Business Media, 1995.

ARRASCUE, M. L. et al. Gold sorption on chitosan derivatives. **Hydrometallurgy**, v. 71, n. 1–2, p. 191–200, 2003.

ARSLAN, P.; BELTRAME, M.; TOMASI, A. Intracellular chromium reduction. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 931, n. 1, p. 10–15, 1987.

ATAFAR, Z. et al. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 160, n. 1–4, p. 83–89, 2010.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-Química**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2003.

AUTA, M.; HAMEED, B. H. Chitosan-clay composite as highly effective and low-cost adsorbent for batch and fixed-bed adsorption of methylene blue. **Chemical Engineering Journal**, v. 237, p. 352–361, 2014.

AYAWEI, N.; EBELEGI, A. N.; WANKASI, D. Modelling and interpretation of adsorption isotherms. **Journal of Chemistry**, v. 2017, 2017.

AYDIN, Y. A.; AKSOY, N. D. Adsorption of chromium on chitosan: Optimization, kinetics and thermodynamics. **Chemical Engineering Journal**, v. 151, n. 1–3, p. 188–194, 2009.

AZIZIAN, S. Kinetic models of sorption: A theoretical analysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, n. 1, p. 47–52, 2004.

BABEL, S.; KURNIAWAN, T. A. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 97, n. 1–3, p. 219–243, 2003.

BAGCHI, D. et al. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology**, v. 180, n. 1, p. 5–22, 2002.

BAILEY, S. E. et al. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2469–2479, 1999.

BAKEN, S. et al. Metal complexation properties of freshwater dissolved organic matter are explained by its aromaticity and by anthropogenic ligands. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 7, p. 2584–2590, 2011.

BARBUSÍŃSKI, K.; SALWICZEK, S.; PASZEWSKA, A. The use of chitosan for removing selected pollutants from water and wastewater – Short review. **Architetur Civil Engineering Environment**, v. 2, p. 107–115, 2016.

BARKAT, M. et al. Kinetics and thermodynamics studies of chromium (VI) ions adsorption onto activated carbon from aqueous solutions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 1, p. 38–47, 2009.

BELY, A. E.; SIKES, J. M. **Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids.** (D. Futuyma, Ed.) PNAS - Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America. Stony Brook: PNAS, 2010.

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

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.

BERTOLO, R. et al. Geochemistry of natural chromium occurrence in a sandstone aquifer in Bauru Basin, Sao Paulo State, Brazil. **Applied Geochemistry**, v. 26, n. 8, p. 1353–1363, 2011a.

BERTOLO, R. et al. Anomalous content of chromium in a Cretaceous sandstone aquifer of the Bauru Basin, state of Sao Paulo, Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 31, n. 1, p. 69–80, 2011b.

BONANI, F. **Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) na Bacia do Rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCAR, 2010.

BOSINCO, S. et al. Adsorption of hexavalent chromium on chitosan beads: Sorption isotherms and kinetics. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, v. 19, n. 1, p. 277–291, 1998.

BOUROTTE, C. et al. Natural occurrence of hexavalent chromium in a sedimentary aquifer in Urânia, State of São Paulo, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 2, p. 227–242, 2009.

BRETON, A.; SURDIN-KERJAN, Y. Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical and genetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 1, p. 224–232, 1977.

BROWN, A. J. Brown on acetic ferment. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, p. 432–439, 1886.

CALLISTO, M.; ESTEVES, F. A. Composição granulométrica do sedimento de um lago amazônico impactado por rejeito de bauxita e um lago natural. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 8, p. 115–126, 1996.

CAMPAGNA, A. F.; RODRIGUES, B. K.; VERANI, N. F. Use of artificial sediment to

assess toxicity of chromium on *Chironomus xanthus*, *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 25, n. 1, p. 42–53, 2013.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

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

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 DE SÃO PAULO. **Qualidade Das Águas Interiores No Estado De Sao Paulo 2016**. São Paulo, 2017.

CHANG, Y. C.; CHEN, D. H. Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for removal of Cu(II) ions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, n. 2, p. 446–451, 2005.

CHENG, K.-C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. **Cellulose**, v. 16, p. 1033–1045, 2009.

CHIOU, M. .; LI, H. . Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. **Chemosphere**, v. 50, n. 8, p. 1095–1105, 2003.

CLEENWERCK, I. et al. Differentiation of species of the family Acetobacteraceae by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 1771–1786, 2009.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução Conama nº 397, de 3 de abril de 2008. 2008, p. 68–69.

CONNON, R. E.; GEIST, J.; WERNER, I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12741–12771, 2012.

CORBI, J. J. 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. et al. Bioaccumulation of metals in aquatic insect of streams located in areas with sugar cane cultivation. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 644–648, 2010.

CORBI, J. J. et al. Assessment of chromium contamination in the Monte Alegre stream: A case study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 613–620, 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.; KLEINE, P.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Are aquatic insect species sensitive to banana plant cultivation? **Ecological Indicators**, v. 25, p. 156–161, 2013.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Influence of taxonomic resolution of stream macroinvertebrate communities on the evaluation of different land uses. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v. 18, n. 4, p. 469–475, 2006.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Effects of land use on lotic chironomid communities of Southeast Brazil: Emphasis on the impact of sugar cane cultivation. **Boletim do Museu Municipal do Funchal**, v. 13, p. 93–100, 2008a.

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, 2008b.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomid species are sensitive to sugarcane cultivation. **Hydrobiology**, 2016.

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 Soil Pollut**, v. 195, p. 325–333, 2008.

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

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 30, n. 1, p. 38–70, 2005.

CRINI, G. et al. Metal removal from aqueous media by polymer-assisted ultrafiltration with chitosan. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

CRINI, G.; BADOT, P. M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 4, p. 399–447, 2008.

CRUSCIOL, C. A. C. et al. Effects of surface application of calcium-magnesium silicate and gypsum on soil fertility and sugarcane yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 1, p. 1843–1854, 2014.

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

DANKS, H. V. Some effects of photoperiod, temperature, and food on emergence in three species of Chironomidae (Diptera). **Canadian Entomologist**, v. 110 __, n. 3, p. 289–300, 1978.

DE ALMEIDA, C. A. **Estudo Ecotoxicológico do Sedimento de Represas do Rio Tietê com o organismo-teste bentônico *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera)**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, 2002.

DE CARVALHO, L. A. et al. Spatial variability of soil potassium in sugarcane areas subjected to the application of vinasse. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1999–2011, 2014.

DE OLYVEIRA, G. M. et al. Bacterial Nanocellulose for Medicine Regenerative. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 2, n. 3, p. 34001, 2011.

DE PAULA, F. C. F.; MOZETO, A. A. Biogeochemical evolution of trace elements in a pristine watershed in the Brazilian southeastern coastal region. **Applied Geochemistry**, v. 16, n. 9–10, p. 1139–1151, 2001.

DE VLAMING, V. et al. Application of Whole Effluent Toxicity Test Procedures To Ambient Water Quality Assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 1,

p. 42–62, 2000.

DEZOTTI, M. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos**. Primeira E ed. Rio de Janeiro: E-papers, 2008.

DI NANNO, M. P.; CURUTCHET, G.; RATTO, S. Anaerobic sediment potential acidification and metal release risk assessment by chemical characterization and batch resuspension experiments. **Journal of Soils and Sediments**, v. 7, n. 3, p. 187–194, 2007.

DIJT, J. C. **Kinetics of polymer adsorption, desorption and exchange**. Wageningen: Grafisch Service Centrum, LUW, 1993.

DO HONG, L. C.; BECKER-VAN SLOOTEN, K.; TARRADELLAS, J. Tropical ecotoxicity testing with *Ceriodaphnia cornuta*. **Environmental Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 497–504, 2004.

DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DORNFELD, C. B. 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. 161–165, 2006.

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

DOS SANTOS, A. et al. Competition between humic substances and α -amino acids by metal species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 3, p. 437–440, 2004.

EL-SAIED, H. et al. Production and characterization of economical bacterial cellulose. **Bioresources**, v. 3, n. 4, p. 1196–1217, 2008.

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

ERDOĞAN, S. et al. Optimization of nickel adsorption from aqueous solution by using activated carbon prepared from waste apricot by chemical activation. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 5, p. 1324–1331, 2005.

ERSÉUS, C. et al. Molecular data reveal a tropical freshwater origin of Naidinae (Annelida, Clitellata, Naididae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 115, n. February, p. 115–127, 2017.

FEBRIANTO, J. et al. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2–3, p. 616–645, 2009.

FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 3, p. 359–370, 2003.

FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 155–163, 2016.

FIERRO, V. et al. Adsorption of phenol onto activated carbons having different textural and surface properties. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 111, n. 1–3, p. 276–284, 2008.

FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 317, n. 1–3, p. 207–233, 2003.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na Bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, 1997.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 2, p. 153–161, 2004.

FREEDMAN, B. Ecological Effects of Environmental Stressors. **Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science**, n. November, p. 1–29, 2016.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute and chronic effects of atrazine and sodium dodecyl sulfate on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1347–1357, 2012.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, 2014.

GARNIER, J. et al. Cr(VI) genesis and dynamics in ferralsols developed from ultramafic rocks: The case of Niquelândia, Brazil. **Geoderma**, v. 193–194, p. 256–264, 2013.

GAUSS, J. D. et al. Acute toxicity of copper to three life stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness- alkalinity. **Environmental Pollution**, v. 37, p. 149–157, 1985.

GOMES, L.; TROIANI, E. P.; NOZAKI, J. Analysis of the environmental impact on a stream: Is only tannery to blame? **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 173, n. 1–4, p. 489–498, 2011.

GONZALEZ, A. R.; NDUNG’U, K.; FLEGAL, A. R. Natural occurrence of hexavalent chromium in the Aromas Red Sands aquifer, California. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 15, p. 5505–5511, 2005.

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

GOVIND, P. Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. **Research Journal of Animal Res. J. Animal, Veterinary and Fishery Sci. International Science Congress Association**, v. 2, n. 2, p. 17–23, 2014.

GOY, R. C. **Estudos de Obtenção e Caracterização de Esferas Entrecruzadas de Quitosana e de Filmes Ultrafinos Depositados sobre Vidro**. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais - Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. Produção de Esferas de quitosana: Meio para interação com metais em fase aquosa. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 30–34, 2004.

GRANBERG, M. E.; FORBES, T. L. Role of sediment organic matter quality and feeding history in dietary absorption and accumulation of pyrene in the mud snail (*Hydrobia Ulvae*).

Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, n. 4, p. 995, 2006.

GREM, I. C. DA S. et al. Chitosan microspheres applied for removal of oil from produced water in the oil industry. **Polímeros**, v. 23, n. 6, p. 705–711, 2013.

GROMET, Z.; SCHRAMM, M.; HESTRIN. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. **The Journal of cell biology**, v. 67, p. 679–689, 1957.

GUIBAL, E. et al. Enhancement of metal ion sorption performances of chitosan: effect of the structure on the diffusion properties. **Langmuir**, v. 11, n. 2, p. 591–598, 1995.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, n. 1, p. 43–74, 2004.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: A review. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 30, n. 1, p. 71–109, 2005.

GUIBAL, E.; MCCARRICK, P.; TOBIN, J. M. Comparison of the sorption of anionic dyes on activated carbon and chitosan derivatives from dilute solutions. **Separation Science and Technology**, v. 38, n. 12–13, p. 3049–3073, 2003.

GUIBAL, E.; MILOT, C.; TOBIN, J. M. Metal-Anion sorption by chitosan beads: Equilibrium and kinetic studies. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 97, p. 1454–1463, 1998.

GUILLÉN, D. et al. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. **Science of the Total Environment**, v. 440, p. 236–252, 2012.

GUPTA, P.; DIWAN, B. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 58–71, 2017.

GUY, R. H. et al. Chromium. In: **Metals and the Skin: Topical Effects and Systemic Absorption**. 1st Editio ed. Basel, Switzerland: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 137–158.

GYANANATH, G.; BALHAL, D. K.; SCIENCES, L. Removal of Lead (II) From Aqueous Solutions by Adsorption onto Chitosan Beads. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 46,

n. 1–2, p. 121–124, 2012.

HAJJI, S. et al. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 298–306, 2014.

HAN, F. X. et al. Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. **New Phytologist**, v. 162, n. 2, p. 489–499, 2004.

HANDY, R. D. et al. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: Practical experiences and recommendations from the bench. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 15–31, 2012.

HEGAZI, H. A. Removal of heavy metals from wastewater using agricultural and industrial wastes as adsorbents. **HBRC Journal**, v. 9, n. 3, p. 276–282, 2013.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, p. 87–94, 1991.

HO, Y. S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 3, p. 681–689, 2006.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Sorption of dye from aqueous solution by peat. **Chemical Engineering Journal**, v. 70, p. 115–124, 1998a.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Kinetic Models for the Sorption of Dye From Aqueous Solution By Wood. **Institution of Chemical Engineers**, v. 76, n. May, 1998b.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 451–465, 1999.

HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of Ecotoxicology**. Second Edition. Boca Raton: Lewis Publisher, 2002.

HOSSAIN, M. S.; IQBAL, A. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. **J. Bangladesh Agril. Univ**, v. 12, n. 1, p. 153–160, 2014.

HUANG, C.; CHUNG, Y. C.; LIOU, M. R. Adsorption of Cu(II) and Ni(II) by pelletized biopolymer. **Journal of Hazardous Materials**, v. 45, n. 2–3, p. 265–277, 1996.

HUMPHREY, C.; HANLEY, J.; CAMILLERI, C. **A Compendium of ecological information on Australia's Northern Tropical Rivers: REPORT 6 Aquatic macroinvertebrates**. Darwin - NT: 2008.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose — a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 261–270, 2000.

INOUE, K.; BABA, Y.; YOSHIZUKA, K. Adsorption of metal ions on chitosan and crosslinked Copper(ii)-complexed chitosan. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, v. 66, p. 2915–2921, 1993.

IOELOVICH, M. Crystallinity and hydrophilicity of chitin and chitosan. **Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 7–14, 2014.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L. 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.

JAWEIR, H. J.; AL-JANABI, E. O. S. Biodiversity and abundance of aquatic oligochaetes-family Naididae in the middle sector of Euphrates river, al Al-Mussayab City/ Iraq. **Protection of environment and water quality: the basis for agricultural production, Food Security and sustainable development**, p. 123–130, 2012.

JINTAKOSOL, T.; NITAYAPHAT, W. Adsorption of Silver (I) from aqueous solution using chitosan/montmorillonite composite beads. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 19, n. 5, p. 1114–1121, 2016.

JOHNSON, W. W.; FINLEY, M. T. **Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates: summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78**. Washington D.C.: United States Department of The Interior Fish and Wildlife Service, 1980. v. 137

JORDÃO, C. P.; PEREIRA, J. L.; JHAM, G. N. Chromium contamination in sediment, vegetation and fish caused by tanneries in the State of Minas Gerais, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 207, n. 1, p. 1–11, 1997.

JUANG, R.-S.; SHAO, H.-J. A simplified equilibrium model for sorption of heavy metal ions from aqueous solutions on chitosan. **Water research**, v. 36, n. 12, p. 2999–3008, 2002.

JUNG, C. et al. Hexavalent chromium removal by various adsorbents: Powdered activated carbon, chitosan, and single/multi-walled carbon nanotubes. **Separation and Purification Technology**, v. 106, p. 63–71, 2013.

KAMINSKI, W.; TOMCZAK, E.; JAROS, K. Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads. **Desalination**, v. 218, n. 1–3, p. 281–286, 2008.

KANMANI, P. et al. Environmental applications of chitosan and cellulosic biopolymers : A comprehensive outlook. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 295–303, 2017.

KATHMAN, R. D.; WETZEL, M. J. *Allonais inaequalis* (Annelida: Oligochaeta: Tubificidae) in North America. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 116, n. 3, p. 548–556, 2003.

KATZ, S. A. The analytical biochemistry of chromium. **Environmental Health Perspectives**, v. 92, p. 13–16, 1991.

KAUSHAL, R.; WALKER, T. K. Formation of cellulose by certain species of *Acetobacter*. **The Biochemical journal**, v. 48, n. 5, p. 618–21, 1951.

KAWAMURA, Y.; MITSUHASHI, M.; TANIBE, H. Adsorption of metal ions on polyaminated highly porous resin. **Industrial & Engineering Chemistry Research (ACS Publications)**, v. 32, p. 386–391, 1993.

KAZAKIS, N. et al. Geogenic Cr oxidation on the surface of mafic minerals and the hydrogeological conditions influencing hexavalent chromium concentrations in groundwater. **Science of The Total Environment**, v. 514, p. 224–238, 2015.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. 7th. ed. Kansas: McGraw-Hill, 2013.

KOMÁREK, M.; ZEMAN, J. Dynamics of Cu , Zn , Cd , and Hg release from sediments at surface conditions. **Bulletin of Geosciences**, v. 79, n. 2, p. 99–106, 2004.

KOZLOWSKI, C. A.; WALKOWIAK, W. Removal of chromium(VI) from aqueous solutions by polymer inclusion membranes. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4870–4876, 2002.

KRAJEWSKA, B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. **Separation and Purification Technology**, v. 41, n. 3, p. 305–312, 2005.

KYZAS, G. Z.; BIKIARIS, D. N. Recent modifications of chitosan for adsorption applications: A critical and systematic review. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 312–337, 2015.

KYZAS, G. Z.; KOSTOGLU, M.; LAZARIDIS, N. K. Copper and Chromium(VI) removal by chitosan derivatives-Equilibrium and kinetic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 152, n. 2–3, p. 440–448, 2009.

LABIDI, A. et al. Adsorption of copper on chitin-based materials: Kinetic and thermodynamic studies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 65, p. 140–148, 2016.

LAGERGREN, S. Y. **Zur Theorie der sogenannten Adsorption gelöster Stoffe**. 4. ed. Stockholm: Handlingar, 1898.

LAMIM, A. P. B. et al. Chemical and physical characterization of coastal peat and evaluation of competitive adsorption of copper and zinc. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 18–23, 2001.

LANDRUM, P. F.; FAUST, W. R. Effect of variation in sediment composition on the uptake rate coefficient for selected PCB and PAH congeners by the amphipod *Diporeia sp.* **Aqu. Tox. & Hazard Assessment**, v. 14, n. ASTM STP 1124, p. 263–279, 1991.

LASHEEN, M. R. et al. Preparation and adsorption properties of nano magnetite chitosan films for heavy metal ions from aqueous solution. **Materials Research Bulletin**, v. 80, p. 344–350, 2016.

LAZARINI, S. C.; AQUINO, R. DE; LUSTRI, W. R. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities : a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. **Cellulose**, v. 23, p. 737–748, 2016.

LEE, S. T. et al. Equilibrium and kinetic studies of copper (II) ion uptake by chitosan-tripolyphosphate chelating resin. **Polymer**, v. 42, p. 1879–1892, 2001.

LELLI, M. et al. Natural Cr(VI) contamination of groundwater in the Cecina coastal area and its inner sectors (Tuscany, Italy). **Environmental Earth Sciences**, v. 71, n. 9, p. 3907–3919, 2014.

LI, H. et al. Effects of pH, temperature, dissolved oxygen, and flow rate on phosphorus release processes at the sediment and water interface in storm sewer. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

LIBONI, L. B.; CEZARINO, L. O. Social and environmental impacts of the sugarcane industry. **Future Studies Research Journal: Trends and Strategies**, v. 4, n. 1, p. 196–227, 2012.

LIN, D. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113–119, 2014.

LU, M. et al. Preliminary research on Cr(VI) removal by bacterial cellulose. **Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition**, v. 27, n. 3, p. 572–575, 2012.

LU, M. et al. Thermodynamics and kinetics of adsorption for heavy metal ions from aqueous solutions onto surface amino-bacterial cellulose. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 24, n. 6, p. 1912–1917, 2014.

LUSTRI, B. C. et al. Spectroscopic characterization and biological studies in vitro of a new silver complex with furosemide: Prospective of application as an antimicrobial agent. **Journal of Molecular Structure**, v. 1134, n. 3, p. 386–394, 2017.

LUSTRI, W. R. et al. **Processo de obtenção e utilização de membrana de celulose bacteriana em bicamada como biocurativo de liberação sustentada de fármacos e suporte para crescimento celular**. Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.escavador.com/patentes/41250/processo-de-obtencao-e-utilizacao-de-membrana-de-celulose-bacteriana-em?page=3>>.

LUSTRI, W. R. et al. Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. In: POLETO, M.; ORNAGHI JR., H. L. (Eds.). **Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends**. [s.l.] InTech, 2015. p. 282.

MA, H. et al. Ultra-fine cellulose nanofibers: new nano-scale materials for water purification. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 7507, 2011.

MACKEY, A. A. P. Growth and development of larval Chironomidae. **OIKOS**, v. 28, n. 2, p. 270–275, 1977.

MAJEKODUNMI, S. O. Current development of extraction , characterization and evaluation of properties of chitosan and its use in medicine and pharmaceutical industry. **American Journal of Polymer Science**, v. 6, n. 3, p. 86–91, 2016.

MAMLOUK, D.; GULLO, M. Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 377–384, 2013.

MARSH, T. L.; MCINERNEY, M. J. Relationship of hydrogen bioavailability to chromate reduction in aquifer sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1517–1521, 2001.

MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and social challenges. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p. 885–898, 2008.

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.

MASEL, R. I.; 1951-. **Principles of adsorption and reaction on solid surfaces**. Urbana, Illinois: Wiley, 1996.

MASRI, M. S.; REUTER, F. W.; FRIEDMAN, M. Binding of metal cations by natural substances. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 18, n. 3, p. 675–681, 1974.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.

MCKAY, G.; BLAIR, H. S.; GRANT, S. Desorption of copper from a copper-chitosan complex. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 63–74, 1987.

MEILI, M. et al. Critical levels of atmospheric pollution: Criteria and concepts for operational modelling of mercury in forest and lake ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 304, n. 1–3, p. 83–106, 2003.

MENEGHETTI, E. et al. Dynamic adsorption of chromium ions onto natural and crosslinked chitosan membranes for wastewater treatment. **Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 89–94, 2010.

MICERA, G. et al. Copper(II) complexation by D-glucosamine. Spectroscopic and potentiometric studies. **Inorganica Chimica Acta**, v. 107, n. 1, p. 45–48, 1985.

MILLS, C. T. et al. Chromium(VI) generation in vadose zone soils and alluvial sediments of the southwestern Sacramento Valley, California: A potential source of geogenic Cr(VI) to groundwater. **Applied Geochemistry**, v. 26, n. 8, p. 1488–1501, 2011.

MITANI, T.; MORIYAMA, A.; ISHII, H. Heavy metal uptake by swollen chitosan beads. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 8451, n. September, p. 20–21, 1992.

MÓDENES, A. N. et al. **Avaliação do Efeito do Tratamento Químico da Macrófita *S. auriculata* na Bio sorção de Íons Cr(III)**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Fortaleza: COBEQ, 2016.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Bacterial cellulose of *Gluconoacetobacter hansenii* as a potential bioadsorption agent for its green environment applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 25, n. 18, p. 2053–2065, 2014.

MONIRI, M. et al. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering. **Nanomaterials**, v. 7, n. 9, p. 257, 2017.

MOON, S. H. et al. Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 1, p. 26–31, 2006.

MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. Chromium. In: DESANTO, R. S. (Ed.). . **Heavy metals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment**. New York: Springer - Verlag, 1984. p. 269.

MORTENSEN, J. L. Complexing of metals by soil organic matter¹. **Soil Science Society of America Journal**, v. 27, p. 179–186, 1963.

MÜHLETHALER, K. The structure of bacterial cellulose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 3, p. 527–535, 1949.

MUIR, D. C. G.; HOWARD, P. H. Are there other persistent organic pollutants? A challenge for environmental chemists. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 23, p. 7157–7166, 2006.

MUZZARELLI, R. A. A.; TUBERTINI, O. Chitin and chitosan as chromatographic supports and adsorbents for collection of metal ions from organic and aqueous solutions and sea-water. **Talanta**, v. 16, n. 12, p. 1571–1577, 1969.

NAIDU, R. et al. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, 2016.

NASCIMENTO, R. F. DO et al. **Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

NEBEKER, A. V.; CAIRNS, M. A.; WISE, C. M. Relative sensitivity of *Chironomus tentans* life stages to copper. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 151–158, 1984.

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, n. April, p. 139–187, 2004.

NGAH, W. S. W.; AB GHANI, S.; KAMARI, A. Adsorption behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution on chitosan and cross-linked chitosan beads. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 4, p. 443–450, 2005.

NGAH, W. S. W.; ENDUD, C. S.; MAYANAR, R. Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive and Functional Polymers**, v. 50, n. 2, p. 181–190, 2002.

NISHI, N. et al. Highly phosphorylated derivatives of chitin, partially deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, n. 5, p. 311–317, 1986.

NOVELLI, A. 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 COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for the Testing of Chemicals - *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test**.

OECD Publishing: Paris, 2011. Disponível em: http://biotecnologiebvt.com/guide/OECD_227.pdf.

OGAWA, K. et al. X-Ray diffraction study on chitosan-metal complexes. **Chitin, Chitosan, and Related Enzymes**, p. 327–345, 1984.

OHGA, K.; KURAUCHI, Y.; YANASE, H. Adsorption of Cu^{2+} or Hg^{2+} ion on resins prepared by crosslinking metal-complexed chitosans. **The Chemical Society of Japan**, v. 60, p. 444–446, 1987.

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

OMWOMA, S. **Environmental impacts of sugarcane farming, Kenya: Effects of nitrogenous fertilizer use on soil and water chemistry within the sugarcane farms**. Saarbrücken, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2017.

OSHIMA, T. et al. Preparation of phosphorylated bacterial cellulose as an adsorbent for metal ions. **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, p. 376–383, 2008.

PADILLA, A. P.; TAVANI, E. L. Treatment of an industrial effluent by reverse osmosis. **Desalination**, v. 126, p. 219–226, 1999.

PAMPLIN, P. A. Z.; ROCHA, O.; MARCHESE, M. Riqueza de espécies de Oligochaeta (Annelida). **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1, p. 63–70, 2005.

PANAGIOTAKIS, I. et al. Forensic investigation of a Chromium(VI) groundwater plume in Thiva, Greece. **Journal of Hazardous Materials**, v. 281, p. 27–34, 2015.

PARDO, L. H. . et al. Assessment of N deposition effects and empirical critical loads of N for ecoregions of the United States. **USDA Forest Service General Technical Report**, v. 21, n. April, p. 3049–3082, 2010.

PATWARDHAN, V.; GHASKADBI, S. **Invertebrate alternatives for toxicity testing: Hydra stakes its claim**. Proceedings of Animal Alternatives in Teaching, Toxicity Testing and Medicine. **Anais...**2013.

PETRONI, S. L. G.; PIRES, M. A. F.; MUNITA, C. S. Adsorção de zinco e cádmio em colunas de turfa. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 477–481, 2000.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers : Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641–678, 2009.

PIMENTA, S. M. et al. Estudo da qualidade da água por meio de bioindicadores bentônicos em córregos da área rural e urbana. **Revista Ambiente e Água - An interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 1, p. 198–210, 2016.

PIRON, E.; ACCOMINOTTI, M.; DOMARD, A. Interaction between chitosan and uranyl ions. Role of physical and physicochemical parameters on the kinetics of sorption. **Langmuir**, v. 13, n. 14, p. 1653–1658, 1997.

POSCH, M.; VRIES, W. Dynamic modelling of metals - Time scales and target loads. **Environmental Modelling and Software**, v. 24, n. 1, p. 86–95, 2009.

PRITCHARD, J. B. Aquatic toxicology: Past, present, and prospects. **Environmental Health Perspectives**, v. 100, p. 249–257, 1993.

PUJALS, M. A. Comentarios sobre *Allonais inaequalis* (Stephenson, 1911) y *Aeolosoma marcusii* Van der Land, 1971 (Oligochaeta, Naididae y Aelosomatidae). **HIERINGIA Série Zoologia**, v. 67, p. 123–126, 1988.

RASMUSSEN, J. B. Comparison of gut contents and assimilation efficiency of fourth instar larvae of two coexisting chironomids, *Chironomus riparius* Meigen and *Glyptotendipes paripes* (Edwards). **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 6, p. 1022–1026, 1984.

REBECHI, D. Efeitos Ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera, Chironomidae) Expostos ao Malathion. Dissertação (Mestrado em Entomologia) Departamento de Zoologia - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

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 (Curitiba)**, v. 29, n. 2, p. 167–171, 2012.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal Brasileira. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601–616, 2010.

REIS, A.; PARKER, A.; ALENCOÃO, A. Storage and origin of metals in active stream sediments from mountainous rivers: A case study in the River Douro basin (North Portugal).

Applied Geochemistry, v. 44, p. 69–79, 2013.

RICHARDI, V. S. 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.

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

RIGHI, G.; HAMOUI, V. Oligochaeta, Naididae of the West Indies and adjacent regions. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 42, n. 6, p. 119–167, 2002.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: The Macmillan Press Ltd, 1992.

ROBERTSON, F. N. Hexavalent Chromium in the ground water in Paradise Vally, Arizona. **Ground Water**, v. 13, n. 6, p. 516–527, 1975.

RODRIGUES, B. K. **Caracterização ambiental da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu (Experimentos Laboratoriais e *in situ*): Elaboração de sedimentos sintéticos para avaliação da toxicidade do cádmio**. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

ROJAS, G. et al. Adsorption of chromium onto cross-linked chitosan. **Separation and Purification Technology**, v. 44, n. 1, p. 31–36, 2005.

ROQUE, F. D. O. 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.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

SAĞ, Y.; AKTAY, Y. Kinetic studies on sorption of Cr(VI) and Cu(II) ions by chitin, chitosan and *Rhizopus arrhizus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 2, p. 143–153, 2002.

SAHA, R. et al. Removal of hexavalent chromium from water by adsorption on mosambi (*Citrus limetta*) peel. **Research on Chemical Intermediates**, v. 39, n. 5, p. 2245–2257, 2013.

SANTOS, A. et al. Distribuição e biodisponibilidade de crômio em solos contaminados por resíduos de couro. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1693–1697, 2009.

SCHMUHL, R.; KRIEG, H. M.; KEIZER, K. Adsorption of Cu(II) and Cr(VI) ions by chitosan: Kinetics and equilibrium studies. **Water SA**, v. 27, n. 1, p. 1–7, 2001.

SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 3. Substrates and Inhibitors. **The Journal of cell biology**, v. 67, p. 669–679, 1957.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/ liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 123–129, 1954.

SHAIN, D. H. et al. A survey of freshwater annelids in the Peruvian Amazon , South America. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 31, p. 47–51, 2007.

SHETTY, A. R. **Metal anion removal from wastewater using chitosan in a polymer enhanced diafiltration system**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biotecnológicas) Departamento de Biotecnologia - Faculty of Worcester Polytechnic Institute. Worcester, 2006.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2005.

SHUHAIMI-O, M. 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.

SINGH, A. K. Nanoparticle Ecotoxicology. In: **Engineered Nanoparticles**. Minneapolis: Elsevier, 2016. p. 343–450.

SINGH, K. et al. Functionalization of nanocrystalline cellulose for decontamination of Cr(III) and Cr(VI) from aqueous system : computational modeling approach. **Clean Technologies Environmental Policy**, v. 16, p. 1179–1191, 2014.

SINGH, R. P.; ZAHRA, F. Mixing kinetics in batch adsorption of Chromium (VI) by *Emblica*

officinalis leaf powder. **International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science**, v. 2, n. 1, p. 349–357, 2014.

SISSONA, W. A. X-Ray studies of crystallite orientation in cellulose fibers II - Synthetic fibers from bacterial cellulose membranes. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 40, n. 3, p. 343–359, 1935.

SITE, A. D. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent / water systems and sorption coefficients for selected pollutants . A review. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 187, n. 1, p. 187–439, 2001.

SKJÅK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. A. (EDS.). **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties, and applications**. Trondheim, Norway: Elsevier Applied Science, 1989.

SOBOL, Z.; SCHIESTL, R. H. Intracellular and extracellular factors influencing Cr(VI) and Cr(II) genotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, p. 94–100, 2012.

SORLIER, P. et al. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 3, p. 765–772, 2001.

SOUNDARRAJAN, M.; GOMATHI, T.; SUDHA, P. . Understanding the adsorption efficiency of chitosan coated carbon on heavy metal removal. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013.

SPIES, M.; REISS, F. Catalog and bibliography of neotropical and mexican Chironomidae (Insecta, Diptera). **Spixiana Supplement**, v. 22, p. 61–119, 1996.

STANIN, F. T. The transport and fate of Chromium (VI) in the environment. In: GUERTIN, J.; AVAKIAN, C. P.; JACOBS, J. A. . (Eds.). . **Chromium(VI) Handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 85–116.

STEVENS, M. M. Larval development in *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) under laboratory conditions. **Environmental entomology**, v. 22, p. 776–80, 1993.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.

STRIXINO, G.; TRIVINHO-STRIXINO, S. A Temperatura e o Desenvolvimento Larval de

Chironomus sancticaroli (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, n. 4, p. 177–180, 1985.

STRUSZCZYK, M. H. Chitin and chitosan. **Polimery**, v. 47, n. 5, p. 316–325, 2002.

SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1819–1846, 2015.

TESTA, S. M. Sources of chromium contamination in soil and groundwater. In: GUERTIN, J.; AVAKIAN, C. P. ; JACOBS, J. A. . (Eds.). . **Chromium(VI) Handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 143–163.

THANOU, M.; VERHOEF, J. ; JUNGINGER, H. . Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 117–126, 2001.

TONKES, M.; BESTEN, P. J. DEN; LEVERETT, D. Bioassays and tiered approaches for monitoring surface water quality and effluents. In: DEN BESTEN, P. J.; MUNAWAR, M. (Eds.). . **Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: Emerging techniques, trends and strategies**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 43–86.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos Sobre a Fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (DIPTERA:CHIRONOMIDAE)**. Tese (Doutorado em Ciências, na área de Biologia) Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, 1981.

TRIVINHO-STRIXINO, S. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. suppl. 1, p. 675–684, 2011.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; CORREIA, L. C. S.; SONODA, K. Phytophilous Chironomidae (Diptera) and other macroinvertebrates in the ox-bow Infernã Lake (Jataí Ecological Station, Luiz Antônio, SP, Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 3, p. 527–535, 2000.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Chironomidae (Diptera) do Rio Ribeira (Divisa dos Estados de São Paulo e Paraná) numa avaliação ambiental faunística. **Entomologia y Vectores**, v. 12, n. 2, p. 243–253, 2005.

TRUNG, T. S.; NG, C. H.; STEVENS, W. F. Characterization of decrystallized chitosan and its application in biosorption of textile dyes. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 14, p. 1185–1190, 2003.

TSAL, W.-C. et al. Removal of copper, nickel, lead, and zinc using chitosan-coated montmorillonite beads in single- and multi-metal system. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 21, p. 9799–9812, 2016.

TSOUKO, E. et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015.

UDAYBHASKAR, P.; IYENGAR, L.; RAO, A. V. S. P. Hexavalent chromium interaction with chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 39, n. 3, p. 739–747, 1990.

UDDIN, M. K. A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. **Chemical Engineering Journal**, v. 308, p. 438–462, 2017.

URBANO, A. M.; RODRIGUES, C. F. D.; ALPOIM, M. C. Hexavalent chromium exposure, genomic instability and lung cancer: Review article. **Gene Therapy and Molecular Biology**, v. 12, n. Vi, p. 219–238, 2008.

VANSTEELANT, J. Y. et al. Conditions d'apparition du ruissellement dans les cultures annuelles de la région lémanique: Relation avec le fonctionnement des exploitations agricoles. **Agronomie: agriculture and environment**, v. 17, p. 65–82, 1997.

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 77–93, 2004.

VAZQUEZ, A. et al. Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013.

VENCES-ALVAREZ, E. et al. Gold recovery from very dilute solutions from a mine in closing process: Adsorption-desorption onto carbon materials. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, p. 549–555, 2017.

VERDONSCHOT, P. F. M.; SMIES, M.; SEPERS, A. B. J. The distribution of aquatic oligochaetes in brackish inland waters in the SW Netherlands. **Hidrobiologia**, v. 38, p. 29–38, 1982.

VIARSAGH, M. S. et al. Chitosan preparation from Persian Gulf shrimp shells and investigating the effect of time on the degree of deacetylation. **Journal of Paramedical Sciences (JPS)**, v. 1, n. 2, p. 2–7, 2010.

VOISIN, H. et al. Nanocellulose-based materials for water purification. **Nanomaterials**, v. 7, n. 3, p. 57, 2017.

WAGNER, C.; LØKKE, H. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data. **Water Research**, v. 25, n. 10, p. 1237–1242, 1991.

WANG, J. J.; HARRELL, D. L. Effect of ammonium, potassium, and sodium cations and phosphate, nitrate, and chloride anions on zinc sorption and lability in selected acid and calcareous soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 69, n. 4, p. 1036, 2005.

WATANABE, K. et al. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187–200, 1998.

WEBSTER, A.; HALLING, M. D.; GRANT, D. M. Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 9, p. 1189–1201, 2007.

WHITACRE, D. M. **Reviews of environmental contamination and toxicology**. British Colombia, Canada: Springer International Publishing Switzerland, 2015. v. 233

WIEGAND, H. J.; OTTENWÄLDER, H.; BOLT, H. /M. Fast uptake kinetics in vitro of $^{51}\text{Cr(VI)}$ by red blood cells of man and rat. **Archives of Toxicology**, v. 57, p. 31–34, 1985.

WILLIAMS, W. S.; CANNON, R. E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2448–2452, 1989.

WU, J. M.; LIU, R. H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 116–121, 2012.

WU, S.-C.; LIA, Y. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 54, p. 103–108, 2008.

YAN, Z. et al. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of multi-walled carbon nanotubes. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 1, p. 73–80, 2008.

YANG, T. C.; ZALL, R. R. Absorption of metals by natural polymers generated from seafood processing wastes. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and**

Development, v. 23, n. 1, p. 168–172, 1984.

YOLCUBAL, I.; AKYOL, N. H. Retention and transport of hexavalent chromium in calcareous karst soils. **Turkish Journal of Earth Sciences**, v. 16, n. 3, p. 363–379, 2007.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

YUAN, X.; CHENG, G. From cellulose fibrils to single chains: understanding cellulose dissolution in ionic liquids. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 17, n. 47, p. 31592–31607, 2015.

ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

ZHANG, X.; WANG, X. Adsorption and desorption of Nickel(II) ions from aqueous solution by a lignocellulose/montmorillonite nanocomposite. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–21, 2015.

ZIMMERMANN, T.; BORDEANU, N.; STRUB, E. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1086–1093, 2010.

APÊNDICE A – Resultados dos ensaios ecotoxicológicos

Tabela 21 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de curta duração com *C. sancticaroli* com quitosana

Concentração de cromo (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Taxa de aplicação de adsorvente* (g L ⁻¹)	Total de organismos	Sobrevivência média	Taxa de sobrevivência (%)	Taxa de adsorção de Cr (mg/kg)
0	0	0	6	5,92	98,61	-
0	0	1,02	6	5,50	100,00	-
0	24	1,02	6	5,50	100,00	-
0	48	1,02	6	5,50	100,00	-
2	0	0	6	2,67	44,44	-
2	0	1,02	6	4,00	66,67	63,11
2	24	1,02	6	4,50	75,00	64,28
2	48	1,02	6	5,67	94,44	64,17
2,5	0	0	6	4,20	70,00	-
2,5	0	1,02	6	4,33	72,22	77,75
2,5	24	1,02	6	4,67	77,78	75,07
2,5	48	1,02	6	5,33	88,89	75,63
3	0	0	6	3,67	61,11	-
3	0	1,02	6	3,33	55,56	88,77
3	24	1,02	6	3,83	63,89	94,32
3	48	1,02	6	4,67	77,78	90,54
3,5	0	0	6	3,57	59,52	-
3,5	0	1,02	6	3,33	55,56	144,30
3,5	24	1,02	6	4,28	71,43	154,55
3,5	48	1,02	6	5,57	92,86	153,35
4	0	0	6	2,40	40,00	-
4	0	1,02	6	3,20	53,33	161,85
4	24	1,02	6	3,00	50,00	173,35
4	48	1,02	6	4,71	78,57	169,55
4,5	0	0	6	1,87	31,21	-
4,5	0	1,02	6	2,10	35,00	166,50
4,5	24	1,02	6	3,28	54,76	192,10
4,5	48	1,02	6	4,57	76,19	196,80

* Taxa de aplicação em relação à massa de quitosana seca

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 22 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de longa duração com *C. sancticaroli* com quitosana

Concentração de cromo (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Taxa de aplicação de adsorvente* (g L ⁻¹)	Total de organismos	Sobrevivência média	Taxa de sobrevivência (%)	Taxa de adsorção de Cr (mg/kg)
0	0	0	6	5,22	87,04	-
0	0	1,02	6	5,55	91,67	-
0	24	1,02	6	5,33	88,88	-
0	48	1,02	6	5,33	88,88	-
1,5	0	0	6	2,17	36,11	-
1,5	0	1,02	6	1,75	29,17	49,75
1,5	24	1,02	6	2,25	37,5	45,40
1,5	48	1,02	6	5,5	91,67	-
2	0	0	6	0,67	11,11	-
2	0	1,02	6	1,00	16,67	66,83
2	24	1,02	6	2,50	41,67	67,39
2	48	1,02	6	4,6	76,67	69,04
2,5	0	0	6	1,67	27,78	-
2,5	0	1,02	6	0	0	82,38
2,5	24	1,02	6	0,75	12,50	84,78
2,5	48	1,02	6	4,00	66,67	92,80

* Taxa de aplicação em relação à massa de quitosana seca

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 23 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de curta duração com *A. inaequalis* com quitosana

Concentração de cromo (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Taxa de aplicação de adsorvente* (g L ⁻¹)	Total de organismos	Sobrevivência média	Taxa de sobrevivência (%)	Taxa de adsorção de Cr (mg/kg)
0	0	0	6	5,67	94,44	-
0	0	1,02	6	5,60	93,33	-
0	24	1,02	6	5,60	93,33	-
0	48	1,02	6	5,60	93,33	-
1	0	0	6	0,83	13,89	-
1	0	1,02	6	1,50	25,00	27,52
1	24	1,02	6	2,67	44,44	23,27
1	48	1,02	6	3,83	63,89	22,33
1,5	0	0	6	0,17	2,78	-
1,5	0	1,02	6	1,33	22,22	30,07
1,5	24	1,02	6	1,33	22,22	38,17
1,5	48	1,02	6	1,67	27,78	38,32
2	0	0	6	0	0	-
2	0	1,02	6	0,83	13,89	52,82
2	24	1,02	6	2,50	41,67	61,28
2	48	1,02	6	1,33	22,22	54,83
2,5	0	0	6	0	0	-
2,5	0	1,02	6	0,50	8,33	69,39
2,5	24	1,02	6	1,00	16,67	73,62
2,5	48	1,02	6	0,50	8,33	61,62
3	0	0	6	0	0	-
3	0	1,02	6	0,50	8,33	82,6
3	24	1,02	6	0,17	2,78	86,62
3	48	1,02	6	0	0	81,75

* Taxa de aplicação em relação à massa de quitosana seca

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 24 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de longa duração com *A. inaequalis* com quitosana

Concentração de cromo (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Taxa de aplicação de adsorvente* (g L ⁻¹)	Total de organismos	Sobrevivência média	Taxa de sobrevivência (%)	Taxa de adsorção de Cr (mg/kg)
0	0	0	6	5,67	94,44	-
0	0	1,02	6	6	100,00	-
0	0	1,02	6	6	100,00	-
0	0	1,02	6	6	100,00	-
0,5	0	0	6	4,33	72,22	
0,5	0	1,02	6	4,25	70,83	18,97
0,5	24	1,02	6	5,92	98,61	18,36
0,5	48	1,02	6	6	100,00	15,97
1	0	0	6	0,67	11,11	
1	0	1,02	6	3	50,00	39,91
1	24	1,02	6	5	83,33	39,56
1	48	1,02	6	4	66,67	33,07
1,5	0	0	6	0,67	11,11	
1,5	0	1,02	6	1,25	20,83	56,21
1,5	24	1,02	6	3,5	58,33	57,14
1,5	48	1,02	6	4,5	75,00	50,27

* Taxa de aplicação em relação à massa de quitosana seca

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 25 - Condições experimentais e médias dos resultados dos ensaios de curta duração com *C. sancticaroli* com celulose

Concentração de cromo (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Taxa de aplicação de adsorvente* (g L ⁻¹)	Total de organismos	Sobrevivência média	Taxa de sobrevivência (%)	Taxa de adsorção de Cr (mg/kg)
0	0	0,94	6	6,00	100%	
3,5	0	1,08	6	0,00	0%	18,06
3,5	24	0,94	6	2,00	33%	59,51
3,5	48	0,99	6	0,67	11%	
4	0	1,06	6	0,00	0%	
4	24	1,05	6	1,33	22%	25,16
4	48	1,01	6	0,33	6%	-
4,5	0	1,05	6	0,00	0%	31,33
4,5	24	1,06	6	2,00	33%	37,11
4,5	48	1,01	6	0,67	11%	19,24

Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE B – Produção bibliográfica

Artigos aceitos para publicação:

1. Corbi, Juliano José; Costa, Camila Geromel; Gorni, Guilherme Rossi; Colombo-Corbi, Vanessa; Rios, Leonardo. **Environmental diagnosis of metals in streams near sugarcane cultivation areas: current and historical analysis in the central region of the State of São Paulo.** Annals of the Brazilian Academy of Sciences.

Artigos completos submetidos à publicação em periódicos:

2. GEROMEL-COSTA, C. G. A.; CORREA, R.; FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CORBI, J. J. **Metals adsorption by crosslinked chitosan beads in streams contaminated sediments.** Ecotoxicology and Environmental Safety.
3. GEROMEL-COSTA, C.; BERNEGOSI, A. C.; CARDOSO, B. N. P.; MOURA, L.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CORBI, J. J. **Effects of chitosan application in the mortality of *Chironomus sancticarloi* (Diptera: Chironomidae) larvae exposed to contaminated sediments from sugarcane cultivation areas.** Ecotoxicology and Environmental Contamination Journal.

Resumos publicados em Anais de eventos:

1. GEROMEL-COSTA, C. G. A.; CORBI, J. J. ; CAMPANA-FILHO, P. S. ; CORREA, R. C. . **Complexação de Cr⁶⁺ por Quitosana.** In: III Simpósio de Ecotoxicologia, 2016, Rio Claro. III Simpósio de Ecotoxicologia. Rio Claro, 2016.
2. GEROMEL-COSTA, C. G. A.; CORBI, J. J. ; LUSTRI, W. R. ; LAZARINI, S. . **Hexavalent chromium ion complexation by microbial cellulose.** In: SIL 2016 -

- XXXIII Congress, 2016, Torino- Italy. SIL 2016 - XXXIII Congress - Book of Abstracts. Torino: International Society of Limnology, 2016. p. 112-112.
3. GEROMEL-COSTA, C. G. A.; FELIPE, M. C. ; DARTORA, A. ; CORBI, J. J. ; CAMPANA-FILHO, P. S. **Efeitos da Aplicação de Esferas de Quitosana na Imobilidade de *D. magna* em Exposição a Cromo Hexavalente.** In: Ecotox 2016 - XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2016, Curitiba - PR. XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - Anais de Resumos, 2016. p. 1643.
 4. GEROMEL-COSTA, C. G. A.; FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, P. S. CORBI, J. J.. **Adsorção de metais por hidrogéis à base de quitosana em sedimentos de córregos impactados por cultivo de cana-de-açúcar.** In: Recursos Hídricos em Crise: Sustentabilidade, Biodiversidade, e Integração de Conhecimentos Face a Mudanças Globais, 2017. p. 389.
 5. GEROMEL-COSTA, C. G. A.; SILVA, M. R. L. ; CORBI, J. J. . **Contact time influences Cr(VI) solution adsorption by chitosan beads: An ecotoxicity assay with *Allonais inaequalis*.** In: SETAC - Latin America 12th Biennial Meeting, 2017, Santos. SETAC - Latin America 12th Biennial Meeting: Abstract Book, 2017. p. 17-18.
 6. ARAÚJO, H. A. S.; GEROMEL-COSTA, C. G. A.; CORBI, J. J. . **Evaluation of Cr(VI) removal by fixed-bed column filled with chitosan beads.** In: SETAC - Latin America 12th Biennial Meeting, 2017, Santos. SETAC - Latin America 12th Biennial Meeting: Abstract Book, 2017. p. 101.
 7. CORBI, J. J.; GEROMEL-COSTA, C. G. A.; COLOMBO, V.; CORREA, R.; FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P.; **Metal adsorption by crosslinked chitosan beads in sugarcane contaminated stream sediments.** In: Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference – BBEST 2017, Campos do Jordão. Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference – BBEST 2017: Abstract Book, 2017.