INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Chironomus sancticaroli – do cultivo em laboratório ao
ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de
sedimento**

WILLIAM VIVEIROS

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Dr. Afonso Rodrigues de Aquino**

**São Paulo
2012**

Dedico à

Querida mamãe, presente em todos os momentos da minha vida. A Saudade é enorme, mas as lições de vida demonstradas, seu sorriso, amor e carinho a manterão sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À minha família que, continuamente, apóia todo o engajamento para o desenvolvimento do meu senso-crítico, em busca do crescimento profissional, emocional e acadêmico;

Aos colegas do laboratório e à CETESB pelo apoio, pela teoria e pela prática;

A prof. Dra. Maria Beatriz Bohrer Morel por iniciar a minha orientação e incentivar a minha permanência no programa;

Ao amigo Dr. Afonso Rodrigues de Aquino por compartilhar a sua experiência profissional e pessoal e cuja vontade de romper obstáculos para atingir seus objetivos não só o caracteriza como orientador, mas como ser humano.

***Chironomus sancticaroli* – DO CULTIVO EM LABORATÓRIO AO ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO COM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE SEDIMENTO**

William Viveiros

RESUMO

A qualidade do sedimento no estado de São Paulo tem sido caracterizada com o uso, dentre outras linhas de evidência, dos resultados obtidos com ensaios ecotoxicológicos utilizando o anfípoda *Hyalella azteca*. Protocolos internacionais como os da USEPA, ASTM, OECD e ENVIRONMENT CANADA descrevem procedimentos para o cultivo e realização desses ensaios utilizando também outros organismos bentônicos, como as larvas de inseto do gênero *Chironomus sp* (Insecta, Diptera). No Brasil, diversos estudos realizados com a espécie *Chironomus sancticaroli* não contam com metodologia nacional normatizada. Os protocolos descrevem metodologias para ensaios de sensibilidade à substância de referência como garantia da qualidade dos organismos antes de sua utilização, não estabelecendo outras metodologias para o monitoramento de variáveis biológicas em cultivo de organismos-teste ou ainda, critérios de aceitabilidade. Com o intuito de garantir a qualidade desses organismos cultivados em laboratório e adaptar uma metodologia para ensaios com sedimento, foram realizados ensaios para o monitoramento de variáveis biológicas em cultivo, determinação de critérios de aceitabilidade para essas variáveis e ensaios com amostras de rios e reservatórios do estado de São Paulo durante os anos 2006 a 2009. As variáveis sobrevivência, deformidade do mento em organismos cultivados e submetidos ao controle do ensaio, fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão, foram monitoradas e o critério de aceitabilidade para cada uma foi estabelecido com base no cálculo do percentil. As variações encontradas nesses resultados sugerem a existência de possíveis interferentes como a qualidade da água de cultivo utilizada e a consangüinidade. Os critérios de aceitabilidade, determinados com base em percentis, servirão de ferramenta para o controle da qualidade dos organismos cultivados sob condições específicas para cada laboratório. A metodologia de ensaio adaptada mostrou bom desempenho, superando o critério de aceitabilidade estabelecido para a sobrevivência dos organismos do controle do ensaio. O quironomídeo apresentou maior sensibilidade quando comparado ao anfípoda comumente utilizado em ensaios com sedimento, enfatizando a existência de diferentes respostas às características físico-químicas do sedimento, associada à biologia de cada organismo, permitindo-se recomendar a utilização conjunta desses organismos na avaliação da qualidade do sedimento.

***Chironomus sancticaroli* - CULTURING IN THE LABORATORY AND ECOTOXICOLOGICAL TEST WITH ENVIRONMENTAL SEDIMENT SAMPLES**

William Viveiros

ABSTRACT

The sediment of Sao Paulo state has been evaluated by using, among other lines of evidence, results obtained from ecotoxicological tests using the amphipod *Hyalella azteca*. International protocols such as the USEPA, ASTM, OECD and Environment Canada describe procedures for culturing and tests with other benthic organisms such as insect larvae of the genus *Chironomus sp* (Insecta, Diptera). In Brazil, several studies were conducted with the species *Chironomus sancticaroli* without the use of a national standardized methodology. The protocols describe methods for testing the sensitivity to the reference toxicant as quality assurance and do not describe other methodologies for monitoring the biological variables in culturing of test organisms, or establish acceptability criteria. In order to ensure the quality of the organisms cultured in the laboratory and adapt a methodology for sediment, tests were conducted to establish the variation of biological variables in culture and determine an acceptability criteria for these variables. Tests with sediment samples from rivers and reservoirs from Sao Paulo state were performed during the years 2006 to 2009. Variables such as survival, mentum deformity, fecundity, fertility and hatching rate were monitored and the acceptability criteria for each one was established using percentile calculations. Variations in the monitoring of variables results suggest the existence of possible interferences such as water quality and inbreeding in culturing. The acceptability criteria determined, based on the percentile, will serve as a tool for quality control of culturing organisms under specific conditions to each laboratory. The adapted test methodology showed good performance, exceeding the acceptability criteria established to organism survival in the control test. The high sensitivity of chironomids when compared to amphipods emphasizing the existence of different responses to physicochemical and chemical characteristics of the sediment, associated with the biology of each organism, indicating that the combined use of these organisms in sediment quality assessment can be recommended.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	16
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
3.1 Monitoramento da qualidade ambiental e ecotoxicidade no estado de São Paulo.....	17
3.2 Ecotoxicidade.....	21
3.3 Quironomídeo como organismo-teste.....	22
3.3.1 <i>Chironomus sancticaroli</i>	23
3.4 Variáveis biológicas observadas em organismos cultivados.....	26
3.4.1 Sensibilidade à substância química.....	27
3.4.2 Sobrevivência do lote dos organismos jovens.....	28
3.4.3 Deformidade do mento.....	29
3.4.4 Fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão.....	30
3.5 Ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Cultivo e manutenção de <i>Chironomus sancticaroli</i> em laboratório.....	32
4.1.1 Obtenção de organismos jovens.....	34
4.2 Monitoramento das variáveis biológicas do cultivo.....	35
4.2.1 Sensibilidade à substância química.....	35
4.2.2 Sobrevivência do lote dos organismos jovens.....	36
4.2.3 Deformidade do mento.....	36
4.2.4 Fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão.....	37
4.2.5 Análise estatística das variáveis monitoradas.....	39
4.3 Ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento.....	39
4.3.1 Análise estatística resultados do ensaio.....	44
4.3.1.1 Validade dos resultados.....	46
4.3.2 Classificação ecotoxicológica do sedimento.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47

5.1 Variáveis biológicas.....	47
5.1.1 Sensibilidade à substância química.....	47
5.1.2 Sobrevivência do lote dos organismos jovens.....	48
5.1.3 Deformidade do mento.....	50
5.1.4 Fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão.....	53
5.2 Estabelecimento dos critérios de aceitabilidade das variáveis monitoradas...	57
5.3 Ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento.....	65
6 CONCLUSÃO.....	72
APÊNDICE A – Pontos de coleta de sedimento.....	74
APÊNDICE B – Ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio.....	75
APÊNDICE C – Cartas-controle de sensibilidade ao cloreto de potássio.....	76
APÊNDICE D – Histograma das variáveis biológicas sobrevivência, deformidade do mento (1), fecundidade e fertilidade.....	77
APÊNDICE E – Histograma das variáveis biológicas eclosão e deformidade do mento (2).....	78
APÊNDICE F – Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento (2006)	79
APÊNDICE G - Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento (2007).....	80
APÊNDICE H - Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento (2008)	81
APÊNDICE I - Ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento (2009)	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Variáveis utilizadas para a avaliação da qualidade dos sedimentos	20
Tabela 2 – Condições utilizadas para o início e manutenção de culturas de <i>Chironomus sancticaroli</i>	34
Tabela 3 – Condições resumidas para a realização de ensaios ecotoxicológicos com amostras ambientais de sedimento em sistema semi-estático, com <i>Chironomus sancticaroli</i>	43
Tabela 4 - Cálculo da constante de proporcionalidade “r” utilizada no teste estatístico “t por bioequivalência”	45
Tabela 5 - Critério para diagnóstico da qualidade do sedimento de acordo com o resultado do ensaio ecotoxicológico com <i>Chironomus sancticaroli</i>	46
Tabela 6 - Resultados obtidos para elaboração da primeira carta-controle de sensibilidade ao cloreto de potássio	47
Tabela 7 – Percentual de sobrevivência do lote de organismos jovens entre outubro de 2008 a junho de 2010 onde n = Número de organismos; I = n inicial; F = n final	49
Tabela 8 – Percentuais de deformidade no mento de <i>C. sancticaroli</i> cultivados em laboratório entre janeiro de 2006 e setembro de 2010	50
Tabela 9 - Resultados dos ensaios para determinação da fecundidade (ovos), fertilidade (lávulas) e taxa de eclosão (eclosão), com suas respectivas temperaturas	54
Tabela 10 - Resultados do cálculo da normalidade dos dados	58

Tabela 11 - Resultados do cálculo das medidas de tendência central e de dispersão	58
Tabela 12- Intervalos de classe com as maiores frequências dos dados obtidos	60
Tabela 13 - Cálculo dos percentis para a sobrevivência	62
Tabela 14 - Resultados dos percentis calculados para cada variável monitorada	63
Tabela 15 - Pontos de coleta de sedimento submetidos aos ensaios entre 2006 e 2009. (R – amostras provenientes de rios, RS – amostras provenientes de reservatórios)	74
Tabela 16 – Resultados dos ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio (2006 a 2009)	75
Tabela 17 – Resultados dos ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio (2009 a 2010)	75
Tabela 18 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com <i>C.sancticaroli</i> realizados em 2006	79
Tabela 19 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com <i>C.sancticaroli</i> realizados em 2007	80
Tabela 20 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com <i>C.sancticaroli</i> realizados em 2008	81
Tabela 21 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com <i>C.sancticaroli</i> realizados em 2009	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Classificação das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos por vocação	19
Figura 2 - Critério de avaliação da qualidade dos sedimentos utilizado após 2008	20
Figura 3 – Ciclo de vida do gênero <i>Chironomus sp.</i> A- ovos, B- larvas, C- pupa (1 – recente empupamento e 2 – pupa madura) e D- adultos (fêmea à esquerda e macho à direita)	24
Figura 4 – Cultivo dos organismos. (A) Coleção das culturas, (B) Bandejas plásticas com tela protetora para retenção de adultos, (C) Quantidade de substrato arenoso e (D) Detalhe dos tubos formados pelas larvas – círculo azul	33
Figura 5 – Esquema resumido do ensaio de sobrevivência e deformidade do mento	37
Figura 6 – Procedimento adotado para a determinação da fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão. A: desova fotografada, B: contagem manual dos ovos em Microsoft Paint® versão 5.1 (ovos contados marcados em vermelho), C: eclosão dos ovos em placa, D: preservação das lárvulas eclodidas e E: contagem das lárvulas	38
Figura 7 – Deformidades no mento observadas (seta vermelha). Dentes quebrados não foram considerados deformidade	51
Figura 8 – Procedimentos adotados para a determinação dos critérios de aceitabilidade para as variáveis monitoradas	59
Figura 9 – Histograma dos dados de sobrevivência do lote de organismos jovens	61
Figura 10 – Percentuais de efeito observados em amostras coletadas entre 2006 a 2009	68
Figura 11 – Primeira carta-controle de sensibilidade ao cloreto de potássio, referente aos dados da Tabela 16	76
Figura 12– Carta-controle de sensibilidade ao cloreto de potássio, referente aos dados da Tabela 17	76
Figura 13 – Histogramas com a apresentação dos intervalos de classe (eixo X) com as maiores frequências de dados (eixo Y) para cada variável, identificados pela seta em vermelho	77

Figura 14 – Histogramas com a apresentação dos intervalos de classe (eixo X) com as maiores frequências de dados (eixo Y) para cada variável, identificados pela seta

1 INTRODUÇÃO

As águas superficiais e subterrâneas, segundo a United States Environmental Protection Agency - USEPA (1989), têm sido amplamente deterioradas por diversas situações como adição de produtos químicos, contaminação biológica, despejos industriais, domésticos, ou carreamento superficial dos solos urbanos e agrícolas (DORNFELD, 2006; CETESB, 2008) que, conseqüentemente, ocasionam o desequilíbrio dos ecossistemas, principalmente os aquáticos.

Esses ecossistemas apresentam uma série de mecanismos físicos, químicos e biológicos para a assimilação de substâncias tóxicas, que previnem danos à biota. No entanto, quando estas atingem níveis acima da capacidade assimilativa do corpo receptor podem afetar a sobrevivência, o crescimento, a reprodução ou o comportamento dos organismos neles presentes. (ANDERSON & D'APOLLONIA, 1978 *apud* COONEY 1995).

Dentre os compartimentos encontrados nos ecossistemas aquáticos, o sedimento atua como local de armazenamento de substâncias orgânicas e inorgânicas, como as misturas de metais encontradas em concentrações muito baixas (traço) introduzidas por processos naturais geoquímicos ou por atividade antropogênica. A cinética e os efeitos desses metais são dependentes da composição da mistura e das características físico-químicas do sedimento (PERY *et al*, 2008). Além disso, o sedimento representa o habitat de muitos organismos aquáticos, como os organismos bentônicos.

Esses organismos são sensores fundamentais de corpos d'água, pois refletem qualquer estresse que impacte esse ambiente (LOEB & SPACIE, 1994). Por isso, muitas espécies de invertebrados bentônicos são utilizadas como organismos-teste em bioensaios e em biomonitoramentos.

De acordo com ROSEMBERG & RESH (1993), dentre os organismos bentônicos, os invertebrados estão entre os mais utilizados em biomonitoramento, pois apresentam várias características que os tornam adequados para essa atividade, tais como:

- Abundância em todos os tipos de sistemas aquáticos, vivendo

sob ou sobre o substrato;

- Facilidade de coleta com equipamento relativamente barato;
- Rapidez na identificação;
- Baixa motilidade e preferência de habitat, que permitem uma análise espacial eficiente dos efeitos dos poluentes ou de perturbações físicas do meio;
- Suscetibilidade às alterações ambientais locais durante o seu ciclo de vida, possibilitando a compreensão dessas alterações;
- Ampla variedade de tolerâncias a vários graus e tipos de poluição.

Aliadas às alterações biológicas refletidas pelos organismos aquáticos, provocadas pelas atividades antrópicas, outras variáveis como as químicas, físicas, físico-químicas e ecotoxicológicas são constantemente acompanhadas nos programas de monitoramento para avaliação da qualidade dos ecossistemas.

Dentre essas variáveis, a ecotoxicológica destina-se a observação de respostas biológicas como consequência dos efeitos dos contaminantes sobre os seres vivos e ecossistemas (NEWMANN & UNGER, 2003), pois quando misturadas em meio aquoso, as substâncias químicas podem apresentar características e efeitos diferentes sobre os organismos e, uma mesma substância química pode ter efeitos diversos em organismos diferentes (JAGER *et al.*, 2007).

Essa ciência, a Ecotoxicologia, alerta para o risco de substâncias químicas, sugerindo a aplicação de medidas preventivas antes que ocorram graves danos aos ecossistemas naturais (PAASIVIRTA, 1991 *apud* FERNICOLA *et al.*, 2003).

A atuação do sedimento como depósito e eventual fonte de compostos químicos naturais aumentou o interesse no desenvolvimento de metodologias, como ensaios padronizados com organismos associados ao sedimento (ADAMS & ROWLAND, 2003).

Uma série de organismos (como anfípodas, larvas, poliquetas, oligoquetas, cladóceros), em ensaios padronizados, foram utilizados para avaliação da ecotoxicidade de contaminantes associados a sedimentos (USEPA,

2000), auxiliando na avaliação ambiental juntamente, com as análises químicas que apenas identificam e quantificam as substâncias presentes no ambiente.

Outras espécies, como as da Família Chironomidae (Insecta, Diptera), também têm sido utilizadas como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos, pois são boas indicadoras da qualidade ambiental e estão presentes abundantemente na fauna bentônica, em ambientes aquáticos continentais e marinhos. (WARWICK, 1990).

No Brasil, a espécie nativa *Chironomus sancticaroli* vêm sendo cultivada em laboratório e utilizada em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos por FONSECA, 1997; DORNFELD, 2006; DORNFELD, 2002; SILVA, 2005, entre outros. Nesses ensaios são observados efeitos na sobrevivência, crescimento, emergência, reprodução e na deformidade das peças bucais, como reflexo da presença de substâncias químicas potencialmente tóxicas.

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB vem cultivando essa espécie desde o ano de 2000 e implementando melhorias nos procedimentos de cultivo para a utilização da mesma em ensaios ecotoxicológicos com amostras coletadas para a rede de monitoramento da qualidade dos sedimentos do Estado de São Paulo.

O presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de contribuir para o estabelecimento de uma metodologia para o ensaio ecotoxicológico com amostras de sedimento utilizando *Chironomus sancticaroli* como organismo-teste, pois não existem normas nacionais nem diretrizes adequadas para a realização desse ensaio.

Além disso, a proposta de monitoramento de variáveis biológicas dos cultivos auxiliaria na obtenção de organismos com melhor qualidade para a realização desses ensaios e critérios para o início de novos cultivos. Essa proposta é inovadora, uma vez que protocolos internacionais existentes não aplicam critérios baseados nessas variáveis em seus procedimentos de cultivo, vinculando apenas a sobrevivência e o crescimento dos organismos utilizados no controle como critério de aceitabilidade do ensaio, diferentemente do que é estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (2010) para outros ensaios.

Esse estudo foi dividido em três partes. A primeira referiu-se ao desenvolvimento de metodologias de ensaio para o monitoramento de variáveis biológicas em cultivo e determinação de seus valores basais em condições específicas; a segunda, na qual, a partir dos resultados obtidos com o monitoramento dessas variáveis biológicas, foram propostos critérios de aceitabilidade para as mesmas nos cultivos e, na terceira parte, a utilização de uma metodologia modificada para a realização de ensaios ecotoxicológicos com amostras ambientais de sedimento baseada em norma nacional e internacional.

2 OBJETIVOS

- Monitoramento de variáveis biológicas, em condições específicas, para o organismo-teste *Chironomus sancticaroli*, cultivado em laboratório para o estabelecimento de critérios de aceitabilidade para essas variáveis, incluindo a ocorrência de deformidade do mento em organismos do controle do ensaio.
- Realização de ensaios ecotoxicológicos com esse organismo para a verificação de sua aplicabilidade na rotina da rede de monitoramento e comparação com os resultados obtidos com *Hyalella azteca*.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Monitoramento da qualidade ambiental e ecotoxicidade no estado de São Paulo

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, de acordo com a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, classifica as águas de acordo com a qualidade requerida para os seus usos preponderantes (recreação, irrigação, abastecimento público, integridade ecológica, entre outros). As águas de melhor qualidade podem ser aproveitadas em usos menos exigentes e que não prejudiquem a qualidade da mesma, atendidos outros requisitos pertinentes.

Essa Resolução salienta ainda que o controle da poluição deve estar relacionado com a proteção da saúde, garantia do meio ambiente ecologicamente equilibrado e a melhoria da qualidade de vida, considerando-se os usos prioritários e classes de qualidade ambiental exigidos para um determinado corpo d'água.

Com o estabelecimento de ações de controle da poluição há a redução, eliminação e o próprio controle das descargas poluidoras, adequando o corpo receptor e emissor aos padrões existentes de qualidade da água e de emissão.

Outra ação vinculada ao controle da poluição é o monitoramento ambiental, caracterizado pelo CONAMA (2005) como medições e verificações de parâmetros de qualidade e quantidade de águas, de forma contínua ou periódica, para acompanhamento da condição e controle da qualidade do corpo d'água.

Com a necessidade de atender a diversos requisitos legais no Estado de São Paulo, a CETESB, iniciou em 1974 a rede de monitoramento do Estado, objetivando com a sua criação (CETESB, 2008):

- Avaliar a evolução da qualidade das águas interiores dos rios e

reservatórios do Estado;

- Fazer o levantamento de áreas prioritárias para o controle da poluição das águas;

- Subsidiar o diagnóstico e controle da qualidade das águas doces utilizadas para o abastecimento público e múltiplos usos;

- Fornecer subsídio técnico para a elaboração ou reformulação dos Planos de Bacia e Relatórios de Situação dos Recursos Hídricos e para implantação da cobrança pelo uso da água realizada pelos Comitês de Bacias Hidrográficas no território do Estado;

- Fornecer subsídios para implementação da Política Nacional de Saneamento Básico (lei 11.445/2007);

- Identificar trechos degradados de corpos d'água para a implementação de ações corretivas e preventivas da CETESB e de outros órgãos.

No processo de avaliação da qualidade das águas são estabelecidos índices e indicadores de qualidade que integram os resultados das variáveis analisadas, auxiliando na tomada de decisões. Desde 1975 a CETESB utiliza o Índice de Qualidade das Águas (IQA), responsável por fornecer a informação básica da qualidade da água bruta para o abastecimento público. Após 2002, outros índices específicos foram aplicados para cada uso do recurso hídrico como o IAP – Índice de Qualidade das Águas Brutas para fins de Abastecimento Público, o IVA – Índice de Qualidade das Águas para fins de Proteção da Vida Aquática e o IB – Índice de Balneabilidade.

A partir de 2002, a companhia estabeleceu a rede de monitoramento da qualidade dos sedimentos de rios e reservatórios do Estado de São Paulo e, consequentemente, os critérios para avaliação da qualidade desse compartimento, considerado pela USEPA (2005) como um ambiente de trocas e/ou interações de espécies químicas com a coluna d'água e a biota residente, podendo afetar o ecossistema, os recursos naturais e a saúde humana (CHAPMAN, *et al*, 2002).

As redes de monitoramento da CETESB possuem uma série de pontos de amostragem em corpos de água doce, salinas e salobras distribuídos nas Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs), classificadas por

vocação, de acordo com a Lei Estadual 9.034 de 1994 – Plano Estadual de Recursos Hídricos, como mostrado no mapa a seguir.

Fonte: CETESB, 2010

Figura 1- Classificação das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos por vocação

Os pontos de amostragem são vistoriados e caracterizados geograficamente para codificação do ponto e identificação das possíveis contribuições do uso do solo do entorno (CETESB, 2010).

Diferentemente da avaliação da qualidade das águas, a avaliação da qualidade do sedimento pela CETESB não faz uso de um índice integrado de qualidade. Baseia-se essencialmente, nos resultados das variáveis analisadas, interpretadas de acordo com os critérios de avaliação da qualidade dos sedimentos, descritas na Tabela 1 e Figura 2.

O critério químico ou relacionado às substâncias químicas determinadas nas amostras de sedimento é baseado nos valores estabelecidos pelo “Canadian Council of Ministers of the Environment” (CCME, 1999) para TEL (Threshold Effect Level – baixa probabilidade de efeito adverso à biota) e PEL (Probable Effect Level – provável efeito adverso à biota) e desde 2008 categorizam o sedimento em cinco classes (com a inserção de duas novas categorias: boa e péssima), de acordo com os percentuais que indicam a distância entre a concentração determinada e o valor de TEL ou PEL para a substância química.

Referências a esses valores, estabelecidos por critérios ecotoxicológicos, são encontrados na Resolução CONAMA nº 344/2004 que estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras.

Tabela 1 – Variáveis utilizadas para a avaliação da qualidade dos sedimentos

Variáveis			
Física	Química	Toxicológica	Hidrobiológica
Granulometria; Série de resíduos; Umidade	Inorgânicas: Al, As, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Zn Orgânicas: PAHs e Pesticidas organoclorados	Bioensaios: Ensaio ecotoxicológico com <i>Hyalella azteca</i> ; Ensaio de mutagenicidade (teste de Ames) e Ensaio de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	Estrutura da Comunidade Bentônica

Fonte: CETESB, 2008

Fonte: CETESB, 2008

Figura 2 - Critério de avaliação da qualidade dos sedimentos utilizado após 2008

No critério toxicológico, os ensaios ecotoxicológicos com *Hyalella azteca* (espécie de microcrustáceo), ensaios de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* e ensaios de mutagenicidade (teste de Ames) também são ponderados e categorizados. O primeiro, distribuído em quatro classes, considera o efeito observado sobre o crescimento (efeito subletal) e a sobrevivência dos organismos expostos. Já o segundo, ponderado em quatro classes, considera o efeito sobre a inibição da emissão de luz da bactéria enquanto, no terceiro, em cinco classes, observa-se o número de bactérias revertentes por grama seco de amostra. O critério hidrobiológico está representado pela comunidade bentônica e é categorizado em cinco classes de acordo com a estrutura da comunidade bentônica observada e demais índices multimétricos.

3.2 Ecotoxicidade

Os estudos ecotoxicológicos, de acordo com ABESSA (2002), podem ser utilizados para: o conhecimento da qualidade da água, sedimento, solo e ar, assim como, no monitoramento ambiental; estimar o efeito das descargas de poluentes em ambientes naturais; definir os limites máximos permissíveis para o lançamento de efluentes e para substâncias químicas; determinar áreas críticas; determinar o impacto inicial de compostos químicos; auxiliar na análise de risco ecológico; fornecer o significado de dados biológicos para dados de comunicação e, como prova legal.

Os bioensaios ou ensaios ecotoxicológicos realizados nesses estudos expõem organismos, em laboratório, a amostras ambientais de água, sedimento ou fortificadas com substâncias químicas, cujo objetivo é verificar os possíveis efeitos biológicos destes contaminantes. (FONSECA, 1997)

Os efeitos biológicos observados durante ou após os ensaios ecotoxicológicos são caracterizados em agudos ou crônicos. O efeito agudo se manifesta após curto período de exposição, de forma rápida e severa, causando a letalidade ou imobilidade dos organismos expostos, geralmente, após o período de 24 a 96 horas.

Contrariamente ao efeito agudo, o crônico é observado após um período longo de exposição, ou por um longo período do ciclo de vida do

organismo, geralmente, 10% ou mais (ADAMS & ROWLAND, 2003) podendo afetar uma ou mais funções biológicas, como a reprodução, o metabolismo, o crescimento, o desenvolvimento dos ovos, mutações, deformidades morfológicas e mesmo a morte dos organismos após a exposição por longos períodos (COONEY, 1995).

3.3 Quironomídeo como organismo-teste

A escolha do organismo-teste para a realização de ensaios ecotoxicológicos depende de alguns fatores, como proposto por ZAGATTO & BERTOLETTI (2006): sensibilidade do organismo a diferentes substâncias químicas, constância da sensibilidade, conhecimento da biologia do organismo, conhecimento de técnicas de cultivo e ensaios, disponibilidade de organismos, representatividade ecológica, estabilidade genética, entre outros. Uma vez selecionado, o organismo pode ser obtido por meio de coleta em ambientes naturais, em produtores especializados ou por cultivo em laboratório.

O gênero *Chironomus* representa uma porção significativa da biomassa bêntica, desempenhando um importante papel na cadeia alimentar, na ciclagem de resíduos encontrados no sedimento pelo processo de bioturbação, além de ser facilmente cultivado em laboratório (GIESY & HOKE, 1989; USEPA, 2000).

Todo o ciclo larval de quironomídeos ocorre em ambiente aquático e em contato direto com o sedimento, podendo permanecer enterrados a apenas poucos centímetros. O ciclo de vida desses organismos pode ser dividido em quatro fases: ovo, estágio larval (constituído por quatro ínstares), pupa e adulto.

Com relação à alimentação desse gênero, foram observados diferentes comportamentos alimentares, desde a filtração de partículas menores presentes na coluna d' água à predação direta de pequenos organismos (ARMITAGE *et al*, 1995). Os quironomídeos apresentam ainda, ampla distribuição geográfica e resistência às condições físico-químicas extremas como variações de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, velocidade de correntes, salinidade e profundidade.

Esses organismos têm sido utilizado em ensaios agudos e crônicos para a observação de efeitos no ciclo de vida e sobrevivência da geração F1

(GIESY & HOKE, 1989), na sobrevivência dos organismos expostos, no crescimento, na fecundidade e fertilidade, no desenvolvimento de deformidade do mento e de peças bucais, na bioacumulação de compostos orgânicos e inorgânicos, em estudos com biomarcadores, entre outros.

Existem protocolos internacionais descritos pela USEPA (2000), American Society for Testing and Material - ASTM (2005), Organization for Economic Co-operation and Development - OECD (2004a; 2004b; 2010), ENVIRONMENT CANADA (1997), entre outros, para a realização de ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento integral ou fortificado utilizando larvas de *Chironomus tentans*, *Chironomus riparius* e *Chironomus sp.*

3.3.1 *Chironomus sancticaroli*

A espécie *Chironomus sancticaroli* pertencente à Família Chironomidae tem grande relevância ecológica por ser uma espécie nativa, encontrada no Estado de São Paulo. Descrita por STRIXINO e STRIXINO em 1981, foi considerada por SPEIS & REISS (1996) sinônimo junior de *Chironomus xanthus* Rempel 1939 (CORREIA, 2004).

Os estudos da fisiologia e da biologia de organismos utilizados em ensaios ecotoxicológicos são de suma importância para a compreensão dos efeitos observados por meio de bioensaios e para a manutenção e cultivo em laboratório.

Como os demais quironomídeos, essa espécie apresenta quatro fases de desenvolvimento em seu ciclo de vida: ovo, estágio larval (constituído por quatro instares), pupa e adulto, conforme apresentado na Figura 3.

O comportamento reprodutivo dessa espécie foi descrito por STRIXINO (1980). Os ovos são depositados pela fêmea durante a manhã ou à tarde, dentro de um material gelatinoso, entumecido com o contato com a água. A fêmea permanece parada com a porção terminal do abdômen ligeiramente recurvada para baixo executando movimentos laterais à medida que a massa vai sendo eliminada. Esses movimentos laterais fazem com que a massa de ovos apresente disposição dos ovos em fileiras paralelas de “loops” alternados ao longo do eixo principal.

A massa gelatinosa, rica em nutrientes que serão utilizados pelas larvulas recém-eclodidas, possui um formato tubular recurvado com uma extremidade livre e outra fixa à parede das bandejas de cultivo, característico do gênero *Chironomus*.

Figura 3 – Ciclo de vida do gênero *Chironomus* sp. A- ovos, B- larvas, C- pupa (1 – recente empupamento e 2 – pupa madura) e D- adultos (fêmea à esquerda e macho à direita)

Após o período de incubação, ocorre a eclosão dos ovos e liberação das larvulas. Nos quatro estádios larvais (ínstares), exceção apenas para o primeiro estágio onde as larvulas apresentam comportamento planctônico, os organismos possuem comportamento bentônico e tecem tubos que os protegem contra a predação, unindo o material particulado presente no substrato com os fios produzidos pelas glândulas salivares.

Os organismos permanecem nos tubos durante o seu

desenvolvimento, com o aumento paulatino do tamanho do corpo e surgimento de características inerentes aos diferentes estádios larvais.

As larvas realizam movimentos ondulares com o corpo que, associados à presença de hemoglobina (responsável pela coloração avermelhada do organismo) possibilitam que esses organismos permaneçam em ambientes com baixas concentrações de oxigênio dissolvido.

Ao final do quarto estágio larval, na fase de empupamento, o organismo constrói um tubo mais resistente (casulo) onde sofre metamorfose, dando origem a pupa, de coloração avermelhada em sua fase inicial. Após a maturação da pupa, quando há alteração de sua coloração (castanho escuro), ela rompe o casulo e nada até a superfície da água para que ocorra a emergência do imago ou adulto alado (mosquito) em poucos segundos.

Os mosquitos permanecem sobre a superfície da água (devido a sua característica hidrofóbica) até que suas estruturas estejam secas e totalmente irrigadas, principalmente as asas. Nessa fase, observa-se o dimorfismo sexual entre os mosquitos. Os machos apresentam abdômen afilado, com hypopygium visível e antenas plumulosas enquanto as fêmeas possuem um alargamento abdominal e antenas simples. (Figura 3)

Após a emergência, os mosquitos se acasalam e as fêmeas iniciam o processo de ovoposição sobre o substrato, em contato com a água.

O período de desenvolvimento de todo o ciclo de vida varia em função da temperatura e da espécie, sendo de 21 dias a 23°C para *C. dilutus* (ASTM, 2005); de 28 a 30 dias para temperatura entre 15 e 19,5°C e de 15 a 17 dias em temperaturas compreendidas entre 21 e 24°C, para o desenvolvimento de *C. sancticaroli*. (STRIXINO & STRIXINO, 1985).

Ambas as autoras (STRIXINO e FONSECA) determinaram a duração de cada ínstar de desenvolvimento larval para *C. sancticaroli* bem como realizaram a medição da cápsula cefálica (comprimento e largura) durante os dias de desenvolvimento, sob temperatura controlada.

Estudos iniciais sobre a biologia da espécie *C. sancticaroli* foram conduzidos por STRIXINO (1973) e STRIXINO & STRIXINO (1985) para a verificação da fecundidade, além da descrição inicial de metodologias de cultivo

em laboratório e ciclo de vida da espécie. Nesses estudos, determinaram-se percentuais de sobrevivência das larvas, fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão, observando influências da temperatura, qualidade e quantidade de alimento fornecido aos organismos nas variáveis analisadas. Já FONSECA (1997), estabeleceu as condições de cultivo para *C. sancticaroli*, as quais são referenciadas em diversos estudos no Brasil.

Os protocolos internacionais citados anteriormente para a realização de ensaios ecotoxicológicos com o gênero *Chironomus* descrevem condições básicas para o cultivo desses organismos, sem que haja obrigatoriamente o monitoramento de variáveis biológicas condizentes com os efeitos a serem observados com os ensaios ecotoxicológicos.

3.4 Variáveis biológicas observadas em organismos cultivados

De acordo com ZAGATTO & BERTOLETTI (2006), alterações das variáveis biológicas em condições de cultivo, da habilidade do técnico na realização dos ensaios, das condições abióticas e da sensibilidade do lote dos organismos podem influenciar os resultados observados nos bioensaios.

USEPA (2000) e ASTM (2005) sugerem o acompanhamento das primeiras emergências dos organismos e a determinação do conteúdo de lipídeos dos mesmos como critérios para o monitoramento da saúde da cultura, assim como a determinação do peso seco médio e das características abióticas a que os organismos serão submetidos (ENVIRONMENT CANADA, 1997). O percentual de mortalidade, alimentação e comportamento dos organismos também devem ser observados. Os critérios de aceitabilidade utilizados nos ensaios ecotoxicológicos (como por exemplo, para sobrevivência e peso seco) também são considerados variáveis úteis para o acompanhamento da saúde dos organismos.

Além das variáveis citadas acima, ZAGATTO & BERTOLETTI (2006) sugere ainda o monitoramento da taxa de reprodução, observação da presença de formas resistentes e uso de substâncias de referência. Podendo também ser incluídas a fecundidade, fertilidade, taxa de eclosão, deformidades morfológicas, dentre outras.

Além da identificação e monitoramento das variáveis que possam refletir a saúde dos organismos em condições de cultivo, torna-se necessário o estabelecimento de critérios de aceitabilidade para as mesmas, garantindo a utilização de organismos saudáveis para o início de novas culturas e para a realização de ensaios ecotoxicológicos.

Como citado anteriormente, variáveis biológicas são monitoradas para acompanhar a saúde dos organismos cultivados e dos utilizados em ensaios ecotoxicológicos, adquiridos em fornecedores externos ou coletados em campo.

Diferentemente dos efeitos observados nos organismos submetidos ao controle em ensaios ecotoxicológicos, cujos critérios de aceitabilidade já estão bem estabelecidos nas normas nacionais e protocolos internacionais, as variáveis biológicas identificadas em organismos cultivados são apenas descritas e não quantificadas, principalmente para o gênero *Chironomus*.

As variáveis que serão abordadas a seguir incluem a sensibilidade à substância química, sobrevivência, fertilidade, fecundidade, taxa de eclosão e a deformidade no mento em *C. sancticaroli*.

3.4.1 Sensibilidade à substância química

Os laboratórios de ecotoxicologia que possuem um programa de qualidade analítica implementado desenvolvem, como requisito de controle da qualidade dos organismos e nos casos onde é necessária a padronização dos procedimentos, os ensaios de sensibilidade à substância química (ou substância de referência), permitindo a identificação e correção de eventuais variações analíticas e verificação da sensibilidade dos organismos cultivados à essa substância.

Esses ensaios demonstram a relação concentração-resposta de um agente tóxico isolado ou em misturas, sendo estabelecida, graficamente, uma curva de concentração-resposta quando os dados são plotados (ADAMS & ROWLAND, 2003).

A escolha da substância química deve ser condizente com o objetivo do estudo e a mesma deve apresentar rastreabilidade e qualidade garantida. ADAMS & ROWLAND (2003) estabelece a necessidade de que sejam

conhecidas, para a substância escolhida, as diferentes toxicidades aos organismos aquáticos e ao técnico durante a sua manipulação, bem como sua solubilidade, disponibilidade no mercado, nível de pureza, entre outros aspectos.

A determinação da sensibilidade dos organismos-teste à substância de referência tem sido realizada com o uso de cloreto de potássio para a espécie *C. sancticaroli* (FONSECA, 1997 e DORNFELD, 2006). Nesse ensaio é possível quantificar o efeito observado aos organismos expostos, de acordo com as concentrações da substância química. Geralmente, determina-se a CL50, ou seja, a concentração letal observada para 50% dos organismos inicialmente expostos.

Os resultados das CL50 obtidos são utilizados para a elaboração de cartas-controle onde são estabelecidas faixas de aceitabilidade dos resultados para a sensibilidade dos organismos que serão utilizados em ensaios. (ABNT, 2010)

A variabilidade dos resultados dentro das faixas estabelecidas é geralmente observada, no entanto, a extrapolação dos resultados além dos limites indica alterações na sensibilidade e ou nos procedimentos padronizados adotados, sendo necessário identificar tais alterações para que a sensibilidade dos organismos retorne a valores aceitáveis e, até mesmo, o descarte dos organismos ou cancelamento dos ensaios realizados.

3.4.2 Sobrevivência do lote dos organismos jovens

A sobrevivência é uma variável quantificável e indica o número final de organismos vivos encontrados, em relação ao inicial, após a exposição dos mesmos a determinadas condições. Expressa em porcentagem, é o efeito comumente observado em ensaios ecotoxicológicos agudos, independente da matriz testada.

Quando há o cultivo de organismos, torna-se uma variável de importância para o monitoramento da saúde e da qualidade dos mesmos, seja para produção em larga escala ou qualquer outro uso específico.

A ABNT (2007; 2009; 2010) sugere, nas normas para a realização de ensaios ecotoxicológicos com microcrustáceos e anfípodas, a sobrevivência do lote de organismos jovens como variável a ser monitorada e estabelece o critério

de aceitabilidade dos organismos cultivados tanto para a manutenção dos cultivos quanto para a utilização dos jovens produzidos em ensaios ecotoxicológicos.

3.4.3 Deformidade do mento

As cápsulas cefálicas das larvas de quironomídeos são compostas principalmente de quitina, material biológico de alta resistência onde estão inseridas, dentre outras, estruturas sensoriais e peças bucais como antena, mandíbula, pré-mandíbula, pente epifaríngeo e mento.

A indução de deformidade está relacionada aos estádios mais sensíveis do ciclo de vida de quironomídeos, ou seja, o estágio larval (ENVIRONMENT CANADA, 1990). Nesse estágio, foi observado que o comportamento alimentar de larvas do gênero *Chironomus*, com a ingestão de sedimentos altamente contaminados, foi o maior contribuinte para o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de deformidades no mento (10 a 15 vezes maior que outros gêneros), de acordo com estudos citados por HUDSON & CIBOROWSKI (1996b).

Durante o processo de desenvolvimento dessas estruturas, a presença de compostos químicos potencialmente tóxicos como radionuclídeos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais (Ni, Co, Cr, Ag, Cd, Pb, Zn, entre outros), semi-metais (As) e pesticidas orgânicos clorados podem provocar alterações nas morfologias naturais dando origem as deformidades (BIRD *et al*, 1995; HUDSON & CIBOROWSKI, 1996a e b; JANSSENS DE BISTHOVEN *et al*, 1998; 2001; SÉRVIA, 2000; MEREGALLI *et al*, 2002; ENVIRONMENT CANADA, 1997; WISE *et al*, 2001; MARTINEZ *et al*, 2006; VEDAMANIKAM & SHAZILI, 2009; BONANI, 2010). Esses mesmos autores relatam altas frequências de deformidade no mento de quironomídeos em seus diferentes ínstares larvais, evidenciando tal estrutura como uma das mais sensíveis e importantes para uso em biomonitoramento.

Nesses estudos, a deformidade é observada como efeito da ação de substâncias tóxicas, no entanto, não há um protocolo padronizado nacional, ou internacional, para sua utilização como efeito observado em ensaios ecotoxicológicos.

3.4.4 Fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão

A utilização dessas variáveis foi relatada por STRIXINO (1980) em estudos sobre a biologia, principalmente do aparelho reprodutor de quironomídeos e sobre a dinâmica populacional, relacionando as suas oscilações com variações bióticas e abióticas a que foram submetidas e encontradas as espécies estudadas.

A fecundidade é conceituada pela autora como a capacidade das fêmeas em produzir determinado número de óvulos ou ovos, podendo ser desmembrada em fecundidade potencial (número de ovos da primeira desova presentes nos ovários das fêmeas) e fecundidade realizada (número de ovos presente em desovas depositadas). Já a fertilidade é definida como o número de ovos férteis postos por fêmea que são capazes de eclodirem e gerar larvas. A relação entre o número de ovos férteis e o número de ovos/óvulos produzidos determina a taxa de eclosão (%).

Alguns protocolos internacionais utilizam essas variáveis em ensaios de ciclo de vida com quironomídeos com observação do efeito, entre outros, sobre a reprodução, como o descrito por USEPA (2000), OECD (2010) e SIBLEY *et al* (2001) pois a presença de compostos tóxicos reduzem o número de ovos produzidos, o número de ovos férteis e, conseqüentemente, diminuem a taxa de eclosão.

É importante ressaltar ainda que, de acordo com STRIXINO (1980), a temperatura, a qualidade e a quantidade de alimento fornecido às larvas de *C. sancticaroli*, podem interferir no número de ovos produzidos e no número de ovos férteis, resultando em uma variação significativa na quantidade de larvas que serão disponibilizadas para uso em ensaios ou mesmo em novos cultivos. A mesma autora identificou e quantificou apenas as variáveis em questão em diferentes tratamentos, não estabelecendo critérios de aceitabilidade para as mesmas.

As massas ovígeras produzidas pelas fêmeas de quironomídeos são os objetos de estudo para a determinação da fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão. O número de ovos produzidos e a frequência de ovoposição variam de acordo com a espécie estudada.

Os protocolos internacionais citados anteriormente e que orientam o cultivo em laboratório de organismos do gênero *Chironomus* sugerem apenas a observação das ovoposições e emergências de adultos, não orientando quanto a quantificação dessas variáveis nos cultivos.

3.5 Ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento

Na rede de monitoramento da qualidade dos sedimentos do estado de São Paulo os ensaios ecotoxicológicos são realizados com *Hyalella azteca*, uma espécie exótica de microcrustáceo (ARAÚJO, 2005), com comportamento alimentar tipicamente epibentônico e mantida facilmente em cultivo sob condições controladas. Os efeitos observados com os ensaios refletem a presença de contaminantes isolados ou em misturas na matriz testada.

A ABNT normatizou o procedimento para a realização de ensaios ecotoxicológicos com o gênero *Hyalella* com observação de efeito na sobrevivência e no crescimento (ABNT, 2007), sendo essa norma a atualmente utilizada para a avaliação ecotoxicológica de amostras de sedimento pela CETESB. (CETESB, 2009).

Diversos estudos têm sido realizados com a utilização de *C. sancticaroli* como organismo-teste, entre outros se destacam os de FONSECA (1997); DORNFELD (2002); BRAMORSKI (2004); SILVA (2005); DORNFELD (2006); COSTA (2007); BARBOSA (2008); PUSCEDDU (2009); SALES (2009) e BONANI (2010) para observação de efeito tóxico em ensaios ecotoxicológicos com amostras de diferentes matrizes como sedimento integral ou água/sedimento fortificado.

Essa espécie foi selecionada como organismo-teste para a realização de ensaios ecotoxicológicos com as amostras de sedimento da rede de monitoramento da CETESB, paralelamente aos ensaios com *Hyalella azteca*, organismo-teste já utilizado nos ensaios da rede de monitoramento. A metodologia de ensaio aplicada para o ensaio com o quironomídeo baseou-se na descrita pela USEPA (2000) e pela ABNT (2007), para observação de efeito agudo sobre a sobrevivência e a deformidade do mento, como efeito subletal, uma vez que não há a padronização do ensaio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As larvas de *Chironomus sancticaroli*, originalmente obtidas no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Escola de Engenharia de São Carlos - USP foram cultivadas no laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB, com base no procedimento elaborado por FONSECA (1997) e USEPA (2000).

4.1 Cultivo e manutenção de *Chironomus sancticaroli* em laboratório

Os organismos foram cultivados em bandejas plásticas (47cm de comprimento x 32,5cm de largura x 8,5cm de altura) contendo até 0,5cm de areia tratada como substrato. Sobre as bandejas foi colocado um suporte telado (50cm de comprimento x 34,5cm de largura x 51cm de altura) para evitar a fuga dos adultos alados (Figura 4).

Foram utilizados seis litros de água de diluição em cada bandeja, proveniente da Represa do Ribeirão do Piraí - Salto/SP, previamente ajustada em relação ao pH (7,0 a 7,6), dureza (40 a 48 mg/L de CaCO₃), condutividade (72 a 212 µS/cm) e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg/L. As bandejas foram colocadas em ambiente aclimatado, com temperaturas entre 23 e 26°C, 16 horas luz e aeração branda.

A alimentação diária fornecida constituiu-se de 7 mL de solução de ração de peixe (20g de Tetramim® para cada litro de água destilada, com validade de 07 dias sob refrigeração e sólidos totais entre 16,2 e 20,4 g/L).

A troca de 50% da água foi realizada semanalmente, tomando-se o cuidado de manter a diferença da temperatura da água de diluição em apenas 1°C. Durante a troca de água, todos os resíduos (restos de alimento, organismos mortos e exúvios) foram sifonados. Com o auxílio de uma gaze limpa, as laterais das bandejas foram higienizadas. Após 21 dias as culturas foram descartadas e substituídas por novas culturas.

Nas bandejas cujos organismos entraram na fase reprodutiva, foram realizadas as contagens e retirada das desovas produzidas em cada bandeja um dia antes da manutenção semanal, no dia efetivo e um dia após, garantindo assim, jovens com idade adequada (entre 2º e 3º ínstar) para os ensaios e cultivo.

As condições resumidas para a manutenção de culturas de *Chironomus sancticaroli* foram descritas na Tabela 2.

Figura 4 – Cultivo dos organismos. (A) Coleção das culturas, (B) Bandejas plásticas com tela protetora para retenção de adultos, (C) Quantidade de substrato arenoso e (D) Detalhe dos tubos formados pelas larvas – círculo azul

Tabela 2 – Condições utilizadas para o início e manutenção de culturas de *Chironomus sancticaroli*

	VARIÁVEL	CONDIÇÃO
INÍCIO DO CULTIVO	TEMPERATURA AMBIENTE/ÁGUA	23 A 26°C
	LUMINOSIDADE	100 A 1000 LUX
	FOTOPERÍODO	16 HORAS LUZ
	RECIPIENTE	BANDEJAS PLÁSTICAS COM CAPACIDADE APROXIMADA DE 10000 mL
	VOLUME DO SEDIMENTO	AREIA ATÉ 0,5 cm DA BANDEJA
	TIPO DE ÁGUA	ÁGUA NATURAL (AJUSTE DE pH, DUREZA E CONDUTIVIDADE)
	VOLUME DE ÁGUA	6000 mL
	IDADE DOS ORGANISMOS	2º A 3º ÍNSTAR
	NÚMERO DE ORGANISMOS POR CULTURA	300 A 330
	TROCA DE ÁGUA	METADE DO VOLUME DE ÁGUA, UMA VEZ POR SEMANA
MANUTENÇÃO	ALIMENTAÇÃO	DIARIAMENTE COM 7,0 mL DE SOLUÇÃO DE RAÇÃO DE PEIXE
	LIMPEZA	SEMANAL, DAS LATERAIS DA BANDEJA
	AERAÇÃO	BRANDA
	DURAÇÃO DA CULTURA	21 DIAS
	RETIRADA DAS DESOVAS	SEMANAL (3 VEZES)

4.1.1 Obtenção de organismos jovens

As desovas produzidas foram separadas de acordo com o item 4.1 e dispostas em novas bandejas com pelo menos 4 litros de água de diluição, uma fina camada de areia peneirada no fundo (<500 µm) e aeração branda. Foram fornecidos 3 mL de solução de ração de peixe (20g/L) diariamente, após 48 horas da retirada das desovas (período para início da eclosão). As características da qualidade da água e do ambiente foram idênticas às adotadas nos cultivos.

As bandejas com as desovas permaneceram incubadas por uma semana para o amadurecimento das larvulas até atingirem a idade adequada

para uso em ensaios e novos cultivos (primeiro a segundo ínstar). Essas lárvulas constituíram o lote semanal de organismos.

Após o período de incubação, a bandeja foi cuidadosamente agitada para a separação dos organismos dos grãos de areia facilitando, assim, a contagem e a manipulação das lárvulas.

A identificação dos ínstaes dessa espécie baseou-se apenas na duração, em dias, de cada ínstar conforme o identificado por FONSECA (1997). Essa espécie desenvolve todo o seu ciclo larval em apenas 13 dias, à temperatura média de 25°C sendo 4 dias para o primeiro ínstar, 2 para o segundo, 2 para o terceiro e 5 para o quarto.

4.2 Monitoramento das variáveis biológicas do cultivo

4.2.1 Sensibilidade à substância química

A substância química ou de referência utilizada para a realização do ensaio de sensibilidade foi o cloreto de potássio (marcas Cromoline, lote 10855/07 e Carlo Erba, lote 5C4962351), de acordo com o proposto pela USEPA (2000) com a adequação apenas do tempo de exposição ao agente tóxico de 96h para 48h, como o realizado pelo Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB para a cultura de *Hyalella azteca*.

Quatro réplicas contendo 200 mL de solução teste foram utilizadas para cada concentração (2,8; 3,7; 4,8; 6,2 e 8,0 mg/L de cloreto de potássio) e para o controle, apenas água de diluição. Os volumes foram distribuídos em frascos descartáveis com capacidade para 395 mL, cobertos com tampa ou filme plástico. A água de diluição foi a mesma utilizada nos cultivos, sem o uso de substrato.

Em cada réplica foram colocados 10 organismos do lote semanal de jovens, alimentados com 0,5 mL de solução de ração de peixe e incubados por 48h a temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 16h luz. Ao final do período de exposição, os organismos vivos foram recuperados e contados.

Os resultados foram analisados estatisticamente com o uso do programa Trimmed Spearmann-Karber (USEPA, 2006) para a determinação da

CL50 – concentração responsável pela mortalidade de 50% dos organismos expostos e elaboração da carta controle de sensibilidade (ABNT, 2007).

4.2.2 Sobrevivência do lote dos organismos jovens

A determinação do percentual de sobrevivência do lote dos organismos jovens foi realizada com a amostragem aleatória de 50 organismos do lote semanal de jovens descrito no item 3.1.1 e transferência dos mesmos para bandejas plásticas contendo areia em quantidade suficiente para cobrir o fundo, 1,5L de água de cultivo, aeração branda e 2mL diários de solução de ração de peixe, como fonte de alimento. A luminosidade e temperatura foram as mesmas utilizadas nas culturas.

A Norma ABNT (2007) sugere a utilização de 50 organismos para a determinação da sobrevivência do lote de jovens de *Hyalella sp.*

Após uma semana, os organismos foram recuperados, contados e preservados em álcool 70º para a determinação dos percentuais de sobrevivência e de deformidade do mento, como apresentado na Figura 5.

4.2.3 Deformidade do mento

Os organismos recuperados no ensaio de sobrevivência foram preservados em álcool 70º para preparo das lâminas e observação da deformidade do mento de acordo com o descrito por KUHLMANN *et al* (2000). As cápsulas cefálicas foram retiradas e dispostas dorso-ventralmente em lâminas contendo meio de Hoyer, cobertas por lamínula e pressionadas para a exposição do mento. As lâminas preparadas permaneceram em temperatura ambiente por pelo menos 24h para secagem do meio até a leitura em microscópio óptico com aumento de 200X (Figura 5).

As deformidades analisadas compreenderam apenas alterações numéricas do mento (excesso de dentes, falta de dentes, presença de pontes – gap- e bifurcação do dente central mediano). Organismos com dentes quebrados ou ocultos por qualquer estrutura bucal não foram utilizados para o cálculo de deformidade. Após a leitura das lâminas, os percentuais de deformidade foram calculados para os organismos cultivados.

Figura 5 – Esquema resumido do ensaio de sobrevivência e deformidade do mento

4.2.4 Fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão

Metodologias foram descritas por USEPA (2000) e STRIXINO (1980) para a determinação dessas variáveis em *Chironomus*. No entanto, essas metodologias demonstraram alto grau de dificuldade para a manipulação e contagem dos ovos produzidos. Sendo assim, foi proposta uma nova metodologia baseada em imagens fotográficas, descrita a seguir e esquematizadas na Figura 6.

- Determinação da fecundidade:

As desovas dispostas nas bandejas de cultivo foram retiradas e colocadas em lâmina de vidro escavada. Com o auxílio de uma lamínula, foram manipuladas com o objetivo de reduzir a sobreposição das fileiras de ovos.

As lâminas prontas foram observadas em estéreo microscópio para obtenção da imagem fotográfica digital sem o uso de aumento óptico ou digital. O arquivo obtido foi visualizado em Microsoft Paint® versão 5.1 para a contagem manual do número de ovos. Essa contagem correspondeu à fecundidade.

- Determinação da fertilidade:

As desovas fotografadas foram colocadas em placas de Petri descartáveis, contendo 25 mL de água de diluição. As placas foram incubadas sob as mesmas condições do cultivo por 72h, período adequado para a eclosão dos ovos e liberação das larvulas para o meio líquido.

A Figura 6 apresenta os procedimentos utilizados para a análise dessas três variáveis.

Figura 6 – Procedimento adotado para a determinação da fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão. A: desova fotografada, B: contagem manual dos ovos em Microsoft Paint® versão 5.1 (ovos contados marcados em vermelho), C: eclosão dos ovos em placa, D: preservação das larvulas eclodidas e E: contagem das larvulas

Após a incubação, foram acrescentados em cada placa, 5 mL de solução de álcool 70º e do corante rosa de bengala para preservar e corar as larvulas

recém-eclodidas. No dia seguinte à preservação, as larvulas foram contadas manualmente sobre placa de luz.

O número de larvulas obtido representou a fertilidade ou o número de ovos férteis.

- Determinação da taxa de eclosão:

Obtido o número de ovos produzidos (fecundidade) e o número de larvulas eclodidas (fertilidade), foi calculada a taxa de eclosão pela relação entre a fertilidade e a fecundidade, ou seja, dividindo-se o número de larvulas eclodidas pelo número de ovos produzidos, multiplicados por 100, para a obtenção do percentual ou taxa de eclosão.

4.2.5 Análise estatística das variáveis monitoradas

Os resultados obtidos com os ensaios para o monitoramento das variáveis biológicas foram avaliados isoladamente para a determinação de um valor representativo a ser utilizado como critério de aceitabilidade para cada variável, de acordo com a ferramenta estatística mais adequada para o conjunto de dados. Esse procedimento poderá ser aplicado e reproduzido em estudos futuros com o mesmo objetivo.

As análises estatísticas dos resultados obtidos para cada variável foram realizadas com o programa estatístico SPSS 13.0, para o cálculo da normalidade com os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk; para a elaboração dos histogramas e observação das frequências por intervalos de classe e para o cálculo dos percentis.

O programa Microsoft Office Excel 2007 foi utilizado para o cálculo das medidas de tendência central (média, mediana e moda) e das medidas de dispersão (desvio padrão e coeficiente de variação) e para a elaboração dos gráficos da carta-controle de sensibilidade.

4.3 Ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento

A CETESB iniciou a rede de monitoramento da qualidade do sedimento em 2002, com avaliação ecotoxicológica do sedimento somente após 2003, com o uso do anfípoda *Hyalella azteca* como organismo-teste nos ensaios

ecotoxicológicos. Os efeitos observados nesses ensaios auxiliaram na elaboração do critério de avaliação da qualidade do sedimento, como descrito anteriormente.

A implementação do cultivo e o início dos ensaios com *Chironomus sancticaroli* no laboratório de ecotoxicologia da CETESB durante esse período auxiliou na possibilidade de escolha do organismo mais representativo para a avaliação da qualidade do sedimento. Assim, ensaios ecotoxicológicos foram realizados paralelamente com o quironomídeo e com o anfípoda, com amostras coletadas para a rede de monitoramento da qualidade dos sedimentos, para a comparação dos resultados.

Durante os anos de 2006 a 2009 foram selecionados 41 pontos para coleta de amostras de sedimento, sendo 17 situados em reservatórios e 24 em rios do Estado de São Paulo, totalizando 63 amostras para ensaio com os organismos devido a repetição de alguns pontos de amostragem durante o período de estudo, conforme descrito no APÊNDICE A.

A coleta de sedimentos foi realizada no período de estiagem, de maio a setembro, na margem deposicional de rios e reservatórios com pegador van Veen em triplicatas, compostas a partir de volumes iguais de cada réplica do local. Nos reservatórios foram considerados apenas os 6 cm superiores da coluna de sedimento (CETESB, 2010). As triplicatas foram homogeneizadas para compor a amostra que foi mantida sob refrigeração, de acordo com o descrito em CETESB (2007).

Os procedimentos adotados para a realização dos ensaios com o quironomídeo em sistema semi-estático e observação do efeito agudo sobre a sobrevivência foram baseados na norma ABNT para o anfípoda *Hyalella sp* (ABNT, 2007) e nos descritos por USEPA (2000) para *Chironomus tentans* enquanto, para a observação da deformidade do mento, adotou-se o procedimento proposto por KHULMANN (2000).

O período de exposição adotado pela USEPA (2000), ASTM (2005), ENVIRONMENT CANADA (1997), OECD (2004a; 2004b) e FONSECA (1997) é de 10 dias para a observação de efeito sobre a sobrevivência, emergência e crescimento dos organismos. No entanto, na exposição por 09 dias a $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram observados altos percentuais de organismos em quarto ínstar, ideal para a

observação da deformidade do mento sendo esse período de exposição o adotado para o ensaio.

Serão descritos a seguir os procedimentos adotados para o ensaio ecotoxicológico.

- Preparo das amostras:

Os sedimentos coletados foram homogeneizados e distribuídos na proporção de 1:2 (ou seja, uma parte de sedimento para duas partes de água de diluição), em quatro réplicas de frascos descartáveis com capacidade para 1000 mL (300g de sedimento e 600 mL de água de diluição, a mesma usada nos cultivos). A areia utilizada como substrato nas bandejas das culturas foi adotada como sedimento controle.

Após a distribuição do sedimento e adição da água de diluição de forma a evitar a ressuspensão do sedimento, os frascos foram devidamente tampados e mantidos em incubadora a temperatura de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 16h luz, para a estabilização do sedimento (7 a 12 horas) antes da adição dos organismos.

- Início do ensaio:

No dia seguinte ao preparo das amostras, foram retiradas alíquotas de água de cada réplica para a determinação dos parâmetros físico-químicos iniciais (pH, OD, condutividade e amônia total), antes da adição dos organismos.

Embora esses organismos apresentem hemoglobina, o monitoramento das concentrações de oxigênio dissolvido (O.D.) foi importante para que não ocorresse alta mortalidade dos mesmos durante o ensaio e, conseqüentemente, a observação de falsos-positivos.

Para tanto, foram adotados procedimentos para o monitoramento do oxigênio dissolvido. Amostras cujas concentrações iniciais estiveram abaixo de 2,5 mg/L foram submetidas a aeração constante até o final do ensaio. Nos três primeiros dias, foram realizadas leituras do OD nas demais amostras. Naquelas cujas concentrações permaneceram entre 2,5 e 3,0 mg/L o OD foi monitorado diariamente enquanto nas amostras cujas concentrações excederam 3,0 mg/L, o monitoramento foi realizado apenas nos dias em que houve troca de água.

Após a verificação desses parâmetros iniciais, foram adicionados trinta organismos do lote semanal de jovens em todas as réplicas de cada amostra,

juntamente com 0,5 mL da solução de ração de peixe. Os frascos com os organismos foram novamente incubados a $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 16h luz durante nove dias de exposição.

- Trocas de água:

O ensaio foi realizado em sistema semi-estático, ou seja, com trocas parciais da água de diluição em períodos determinados. Foram efetuadas trocas de 2/3 do volume inicial de água (aproximadamente 400 mL) em dias alternados, totalizando quatro trocas até o final do ensaio.

Em cada troca foram coletadas alíquotas das réplicas para a determinação do OD. O volume retirado dos frascos foi substituído por nova água de diluição com o auxílio de um aparador para evitar a ressuspensão do sedimento. A variação da temperatura entre as águas não foram superiores a 1°C para que os organismos não fossem submetidos a choque térmico, o que poderia prejudicar o resultado do ensaio. Nas amostras onde houve a sucção dos organismos durante o processo de sifonamento, os mesmos foram realocados em suas respectivas réplicas. Ao término da troca de água, foi adicionado 0,5 mL da ração de peixe em cada réplica sendo os frascos reincubados.

- Encerramento do ensaio:

Ao final de nove dias de exposição foram coletadas alíquotas em cada réplica para a determinação do pH, OD, condutividade e amônia total. O sedimento contido em cada réplica foi peneirado em malha de 425 μm e lavado com água corrente.

O material retido na peneira foi colocado em bandejas plásticas e observado sobre placa de luz para a recuperação dos organismos vivos. Os organismos recuperados em cada réplica foram contados e preservados em álcool 70^o para determinação da deformidade do mento.

As larvas de cada réplica, preservadas para a determinação da deformidade do mento, foram manipuladas de acordo com o procedimento descrito anteriormente, registrando-se o número de larvas normais e o de deformadas. A Tabela 3 mostra as condições resumidas em que foram realizados os ensaios ecotoxicológicos.

Tabela 3 – Condições resumidas para a realização de ensaios ecotoxicológicos com amostras ambientais de sedimento em sistema semi-estático, com *Chironomus sancticaroli*

VARIÁVEL	CONDIÇÃO
TEMPERATURA	23 ± 1°C
LUMINOSIDADE	100 A 1000 LUX
FOTOPERÍODO	16 HORAS LUZ
RECIPIENTE TESTE	FRASCOS DESCARTÁVEIS DE 1000 mL
QUANTIDADE DE SEDIMENTO/RÉPLICA	300 g
TIPO DE ÁGUA	ÁGUA DE CULTIVO
VOLUME DE ÁGUA/RÉPLICA	600 mL
TROCA DE ÁGUA	2/3 DO VOLUME DE ÁGUA DE CADA RÉPLICA, 04 VEZES DURANTE O PERÍODO DO ENSAIO
PROPORÇÃO DE SEDIMENTO/ÁGUA	1:2
IDADE DOS ORGANISMOS	2º A 3º ÍNSTAR
NÚMERO DE ORGANISMOS POR RÉPLICA	30
NÚMERO DE RÉPLICAS POR AMOSTRA	04
ALIMENTAÇÃO POR RÉPLICA	0,5 mL DE RAÇÃO DE PEIXE A CADA TROCA DE ÁGUA
AERAÇÃO	SOMENTE PARA OD ABAIXO DE 2,5 mg/L
PARÂMETROS ANALISADOS: ÁGUA	INICIAL E FINAL: pH, OD, CONDUTIVIDADE, AMÔNIA TOTAL E TEMPERATURA A CADA TROCA: OD, TEMPERATURA
DURAÇÃO DO ENSAIO	09 DIAS
EFEITOS OBSERVADOS	SOBREVIVÊNCIA e DEFORMIDADE DO MENTO
CRITÉRIO DE ACEITABILIDADE DO ENSAIO	MORTALIDADE NO CONTROLE ABAIXO DE 30%

4.3.1 Análise estatística dos resultados do ensaio

Os resultados da sobrevivência foram transformados dividindo-se o número de organismos vivos recuperados em cada réplica pelo número de organismos expostos em cada uma. Esses resultados foram analisados estatisticamente com o uso do programa estatístico TOXSTAT 3.5 (WEST & GULLEY, 1996).

A normalidade dos dados foi avaliada com o uso dos testes Qui quadrado e Shapiro-Wilks enquanto a homogeneidade das variâncias foi avaliada com o teste F. Nesse programa foi aplicado o “teste t por bioequivalência” e utilizada a constante de proporcionalidade (“r”) para comparação da sobrevivência obtida entre o controle do ensaio e as amostras.

Essa constante minimiza a ocorrência de resultados falsos positivos observados nos resultados calculados pelo teste de hipótese tradicional, considerando a variabilidade admissível dos resultados obtidos (BERTOLETTI *et al*, 2007). Na Tabela 4 são apresentados os dados obtidos para cálculo dessa constante para *C. sancticaroli*.

As amostras foram consideradas tóxicas, ou seja, com a observação de efeito agudo sobre a sobrevivência dos organismos, quando apresentaram diferença estatística significativa entre a sobrevivência dos organismos expostos ao controle e a sobrevivência nas amostras.

Os resultados da deformidade do mento em cada réplica foram transformados aplicando-se a relação entre larvas deformadas e o total de larvas por réplica. (deformidade do mento = larvas deformadas / total de larvas). O mesmo programa estatístico foi utilizado para a avaliação da normalidade e homogeneidade das variâncias, mas com a aplicação do Teste “t-Student” para a observação da significância estatística entre os resultados obtidos no controle e nas amostras.

As amostras foram consideradas tóxicas, ou seja, com a observação de efeito agudo ou subletal nas análises onde houve diferença estatística na comparação desses resultados.

Tabela 4 - Cálculo da constante de proporcionalidade “r” utilizada no teste estatístico “t por bioequivalência”

DATA DO ENSAIO	DIFERENÇA DO PERCENTUAL DE MORTALIDADE ENTRE CONTROLE E AMOSTRA
13/06/2006	13,9 16,3 12,7 9,5
03/07/2006	7,2 7,4 12,3
24/07/2006	10,8 8,6
21/08/2006	16
18/09/2006	21,3 18
25/09/2006	8,9 7,8 7,1
10/10/2006	20,2 8,6 8,1
17/10/2006	20,4 16,4
05/06/2007	17,1
19/06/2007	17,8 14,4 17
03/07/2007	8,1 6,8 13,2
24/07/2007	17 19,8 14,3
31/07/2007	14,8 7,3
07/08/2007	25,7 21 16,9
14/08/2007	11,7 9,4 11,1 8,4
11/09/2007	19,1 19
18/09/2007	6,7 8,2 5,7
percentil (75º)	17,025
100-75º	82,975
Valor do “r”	0,830

4.3.1.1 Validade dos resultados

Os resultados foram considerados válidos ou aceitos apenas nos ensaios onde a sobrevivência dos organismos no controle atendeu ao critério de aceitabilidade estabelecido de 70%.

4.3.2 Classificação ecotoxicológica do sedimento

A classificação ecotoxicológica do sedimento com o uso do quironomídeo como organismo-teste foi estabelecida de acordo com o efeito observado (não tóxico, subletal e tóxico agudo) e o percentual de mortalidade obtido nas amostras, seguindo a mesma classificação atualmente utilizada pela CETESB para *Hyalella azteca*. Desta forma, os sedimentos foram categorizados em quatro classes: Ótimo, Regular, Ruim e Péssimo, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Critério para diagnóstico da qualidade do sedimento de acordo com o resultado do ensaio ecotoxicológico com *Chironomus sancticaroli*

CATEGORIA	EFEITO OBSERVADO
ÓTIMO	NÃO TÓXICO
REGULAR	SUBLETAL - DEFORMIDADE DO MENTO
RUIM	TÓXICO AGUDO (MORTALIDADE < 50%)
PÉSSIMA	TÓXICO AGUDO (MORTALIDADE ≥ 50%)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Variáveis Biológicas

5.1.1 Sensibilidade à substância química

Conforme descrito no item 3.4.1, o ensaio com substância de referência visou à verificação da sensibilidade do organismo-teste a uma determinada substância química. O aumento das concentrações da substância testada resultou no aumento dos percentuais de mortalidade desses organismos, estabelecendo-se assim, uma relação entre a concentração e o percentual de efeito observado, com a determinação das CL50.

A elaboração da carta-control de sensibilidade foi realizada com esses valores sendo os seis primeiros resultados das CL50 utilizados para a elaboração da primeira carta-control (conforme Tabela 6). Para tanto, calculou-se a média, o limite mínimo (dois desvios padrões subtraídos da média) e o máximo (dois desvios padrões somados à média).

No APÊNDICE B são apresentados os valores das CL's 50 obtidos até o início de 2011 e as cartas-control do mesmo período (APÊNDICE C).

Tabela 6 - Resultados obtidos para elaboração da primeira carta-control de sensibilidade ao cloreto de potássio

Nº ENSAIO	DATA	CL 50 g/L
1	20/06/2006	4,02
2	27/06/2006	5,32
3	25/07/2006	3,83
4	03/10/2006	4,23
5	29/08/2007	5,33
6	13/09/2007	4,15
média		4,48
desvio padrão (dp)		0,67
coeficiente de variação		14,92
limites da primeira carta-control: (média +- 2dp)		3,14 a 5,82 g/L

Os valores obtidos foram semelhantes aos calculados por FONSECA (1997) e DORNFELD (2006), respectivamente, 4,5 g/L e 4,11 g/L de cloreto de potássio. É importante ressaltar que tais valores condizem com as condições específicas de cada cultivo, não sendo possível estimar uma faixa padrão a ser adotada em todos os laboratórios que cultivam quironomídeos.

Os valores da CL50 permaneceram dentro dos limites calculados e estabelecidos possibilitando identificar o bom estado da saúde dos organismos cultivados, de acordo com o procedimento de cultivo adotado e o bom desempenho técnico durante o ensaio como o proposto por ZAGATTO & BERTOLETTI (2006).

5.1.2 Sobrevivência do lote de organismos jovens

O sistema de cultivo estabelecido para *C. sancticaroli* inviabilizou a manipulação dos mesmos para a quantificação e acompanhamento da sobrevivência durante as manutenções devido à utilização de substrato arenoso, diferentemente do realizado em culturas de cladóceros e anfípodos.

O estresse físico provocado pela manipulação potencializou a redução do percentual de sobrevivência. Por isso, houve a necessidade de introduzir a realização de sub-amostragem do lote produzido para o ensaio de sobrevivência, semelhante ao proposto pela ABNT (2007) para *Hyalella*, citado anteriormente.

O período de exposição de 07 dias permitiu o desenvolvimento dos organismos até os estádios tardios da larva onde também foram observados, além da sobrevivência, independente dos percentuais obtidos, o empupamento e a emergência dos organismos em alguns ensaios. Essas evidências foram importantes e garantiram a continuidade dos cultivos.

Os resultados da sobrevivência do lote dos organismos jovens foram descritos na Tabela 7 e apresentaram valor médio de 89,2% durante os anos de 2008 a 2010. Dentre esses dados, aproximadamente 84% apresentaram percentuais maiores ou iguais a 80% de sobrevivência.

Em estudos desenvolvidos por STRIXINO (1980) sobre a fecundidade de *C. sancticaroli* foi observado baixo percentual médio de sobrevivência (43%) dos organismos quando expostos a sedimento natural (sedimento controle) e a

diferentes qualidades e quantidades de alimento.

Tabela 7 – Percentual de sobrevivência do lote de organismos jovens entre outubro de 2008 a junho de 2010 onde n = Número de organismos; I = n inicial; F = n final

DATA	I	F	%	DATA	I	F	%	DATA	I	F	%
14/10/2008	50	35	70	12/05/2009	50	48	96	05/01/2010	50	50	100
21/10/2008	50	48	96	19/05/2009	50	48	96	12/01/2010	50	48	96
27/10/2008	50	50	100	26/05/2009	50	48	96	19/01/2010	50	48	96
04/11/2008	50	44	88	02/06/2009	50	48	96	26/01/2010	50	50	100
02/12/2008	50	48	96	22/07/2009	50	48	96	02/02/2010	50	47	94
02/12/2008	50	48	96	04/08/2009	50	47	94	09/02/2010	50	50	100
08/12/2008	50	39	78	11/08/2009	50	49	98	16/02/2010	50	50	100
16/12/2008	50	48	96	18/08/2009	50	46	92	23/02/2010	50	45	90
23/12/2008	50	49	98	25/08/2009	50	48	96	02/03/2010	50	49	98
30/12/2008	50	49	98	01/09/2009	50	47	94	09/03/2010	50	50	99
06/12/2009	50	45	90	08/09/2009	50	48	96	16/03/2010	50	46	92
13/01/2009	50	34	68	15/09/2009	50	49	98	23/03/2010	50	42	84
20/01/2009	50	46	92	22/09/2009	50	49	98	30/03/2010	50	48	96
03/02/2009	50	41	82	29/09/2009	50	50	100	06/04/2010	50	38	76
10/02/2009	50	50	100	06/10/2009	50	46	92	13/04/2010	50	23	46
17/02/2009	50	42	84	13/10/2009	50	47	94	20/04/2010	50	35	69
25/02/2009	50	50	100	03/11/2009	50	46	92	27/04/2010	50	34	68
03/03/2009	50	43	86	10/11/2009	50	40	80	04/05/2010	50	24	48
10/03/2009	50	49	98	18/11/2009	50	50	100	11/05/2010	50	29	58
17/03/2009	50	43	86	24/11/2009	50	46	92	18/05/2010	50	36	72
24/03/2009	50	49	98	01/12/2009	50	47	94	25/05/2010	50	24	48
31/03/2009	50	47	94	08/12/2009	50	44	88	01/06/2010	50	35	70
22/04/2009	50	46	92	15/12/2009	50	45	90				
29/04/2009	50	48	96	22/12/2009	50	44	88				
05/05/2009	50	50	100	29/12/2009	50	43	86				
										Média	89,2
										Desvio padrão	12,9

A influência da temperatura na sobrevivência das larvas também foi observada pela autora como fator abiótico a ser considerado em cultivos dessa espécie em laboratório (95% de sobrevivência a 25°C).

Altos percentuais de sobrevivência (90%) foram descritos por FONSECA (1997) em estudos com a mesma espécie e condições semelhantes às adotadas neste trabalho. No entanto, nenhuma das autoras descreveu a metodologia utilizada para a determinação dessa variável nos cultivos.

O percentual médio obtido com o ensaio neste trabalho foi semelhante ao estabelecido pela ABNT (2007; 2009; 2010), sobrevivência mínima de 80%,

em cultivos de outras espécies de organismos para uso em ensaios ecotoxicológicos.

É importante ressaltar que os organismos utilizados para o ensaio de sobrevivência foram amostrados do lote semanal produzido. Dessa forma, providências deverão ser tomadas caso sejam verificados altos percentuais de mortalidade nesse ensaio, como o cancelamento de ensaios com sedimento ou substância de referência iniciados no período ou, até mesmo, encerramento da cultura montada com esse lote de organismos.

5.1.3 Deformidade do mento

Na Tabela 8 são apresentados os percentuais de deformidade nos organismos cultivados no laboratório e provenientes dos ensaios de sobrevivência. A média de deformidade obtida foi de 13% sendo encontrados valores entre zero e 47%. Os tipos de deformidade encontrados foram exemplificados na Figura 7.

Tabela 8 – Percentuais de deformidade no mento de *C. sancticaroli* cultivados em laboratório entre janeiro de 2006 e setembro de 2010

DATA DO ENSAIO	N	D	%	DATA DO ENSAIO	N	D	%
10/01/2006	107	4	3,6	19/02/2008	72	57	44,2
17/01/2006	107	8	7,0	04/03/2008	60	24	28,6
23/01/2006	111	9	7,5	11/03/2008	89	18	16,8
07/02/2006	114	6	5,0	13/05/2010	68	2	2,9
02/01/2007	90	17	15,9	19/05/2010	51	3	5,6
jan/07	97	11	10,2	18/05/2010	16	0	0,0
20/02/2007	91	43	32,1	25/05/2010	28	0	0,0
06/03/2007	132	24	15,4	08/06/2010	31	2	6,1
20/03/2007	129	10	7,2	01/06/2010	17	0	0,0
20/03/2007	125	3	2,3	22/06/2010	71	2	2,7
27/03/2007	127	12	8,6	29/06/2010	46	2	4,2
21/08/2007	158	2	1,3	06/07/2010	52	0	0,0
09/10/2007	44	19	30,2	13/07/2010	82	2	2,4
13/11/2007	89	24	21,2	20/07/2010	32	10	23,8
21/11/2007	98	3	3,0	27/07/2010	25	6	19,4
11/12/2007	57	10	14,9	03/08/2010	28	0	0,0
18/12/2007	44	37	45,7	14/09/2010	27	13	32,5
26/12/2007	77	8	9,4				
22/01/2008	72	64	47,1				
				Média			13,2
				Desvio padrão			13,9

N – mento normal; D – mento deformado.

Mento normal: tridente central e 6 dentes laterais em cada lado.

Mento com excesso de dentes

Mento com falta de dentes

Mento com GAP

Mento com bifurcação do dente central

Mento com quebras de dentes. (desconsiderados)

Figura 7 – Deformidades no mento observadas (seta vermelha). Dentes quebrados não foram considerados deformidade

O gênero *Chironomus*, de acordo com HUDSON & CIBOROWSKI (1996b), apresentou de 10 a 15 vezes mais suscetibilidade a desenvolver deformidade no mento que os demais gêneros encontrados no local estudado por ele como consequência da ingestão de sedimentos altamente contaminados. Essa deformidade é influenciada pela presença de compostos químicos potencialmente tóxicos como metais e compostos orgânicos que, segundo BIRD *et al* (1995), induzem mutações; interferem em processos de transcrições e translações; promovem disrupções em divisões celulares e distúrbios metabólicos, como a disrupção do controle de proteínas durante o desenvolvimento do organismo.

A observação desse efeito tem sido utilizada nos programas de monitoramento na Bélgica e no Reino Unido pela UK Environment Agency (MEREGALLI & OLLEVIER, 2001a) devido à simplicidade e rapidez da avaliação da deformidade que a torna um potencial biomarcador da qualidade do sedimento.

Neste trabalho registrou-se uma grande variação nos percentuais de deformidade do mento ao longo do tempo, também evidenciada por BIRD (1997) em culturas de *C. tentans* independente da característica do substrato utilizado, assim como, por JANSSENS DE BISTHOVEN *et al* (2001) e VERMEULEN *et al* (2000), como resultado da idade dos organismos cultivados, sem renovação dos indivíduos, resultando no processo de “inbreeding” ou consanguinidade.

O último autor, no entanto, observou em diversos estudos que o percentual de deformidade em organismos cultivados variou entre zero e 52% como consequência do uso de diferentes substratos; número de réplicas; número de organismos e tipos de alimento.

O processo de consanguinidade citado anteriormente aumenta a expressão de características recessivas incluindo anomalias morfológicas (BIRD *et al*, 1995). Esse mesmo autor evidenciou, em estudos realizados com organismos coletados em área contaminada, a redução do percentual de deformidade da geração seguinte quando cultivados em sedimento limpo, caracterizando o efeito teratogênico na incidência da deformidade. Experimentos realizados no laboratório da CETESB (dados não publicados) também

demonstraram redução do percentual de deformidade dos parentais para as gerações seguintes de uma mesma cultura, não condizendo com a característica hereditária proporcionada pela consanguinidade.

A mesma redução de frequência foi observada por JEYASINGHAM & LING (1997) em organismos cultivados até F2, sustentando a hipótese de interferência do local de origem dos organismos e tipo de substrato utilizado nos cultivos e por DICKMAN *et al* (1992) quando cultivou organismos em sedimento limpo, provenientes de local contaminado por HPA's.

Outros estudos como os realizados por SERVIA *et al* (2000) demonstraram que além do efeito hereditário, as deformidades foram induzidas pela qualidade da água em que os ovos estavam eclodindo e pela contaminação secundária dos mesmos como resultado da acumulação de contaminantes pela fêmea progenitora.

Procedimentos padronizados e condições controladas auxiliam na manutenção de cultivos com qualidade conhecida, no entanto, a utilização de água natural como água de diluição nos cultivos do laboratório pode não garantir a estabilidade da qualidade dos organismos relativa à algumas variáveis como a deformidade do mento.

A qualidade da água para uso em cultivos de organismos em laboratório deve ser melhor investigada pois, alterações químicas e físico-químicas podem ocorrer naturalmente em corpos d' água ou, por influência antrópica, como dito anteriormente. Essas alterações podem ser as responsáveis pelas variações nos percentuais de deformidade encontrados nos organismos cultivados.

Observando a metodologia empregada para o cultivo dos organismos e obtenção dos jovens, há a possibilidade de sustentação da hipótese de indução de deformidades pela qualidade da água de cultivo uma vez que os parentais e os jovens obtidos foram sempre cultivados nessa água.

5.1.4 Fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão

Essas variáveis foram analisadas em 23 desovas nos meses de abril e maio de 2010 cujos resultados estão apresentados na Tabela 9. A fecundidade

(realizada) média, ou seja, número de ovos depositados, foi de 530 ovos (com número mínimo de 340 e máximo de 812 ovos). Estudos realizados por STRIXINO (1980) apresentaram média de 744,9 ovos, com mínimo de 500 e máximo de 1045, enquanto FONSECA (1997) obteve valor de 500 a 600 ovos nas primeiras posturas. O valor observado pela primeira autora foi um pouco inferior ao obtido pela mesma autora para a fecundidade potencial, ou seja, número de ovos presentes no ovário da fêmea, uma vez que se verifica a retenção de ovos nas fêmeas durante a ovoposição.

Tabela 9 - Resultados dos ensaios para determinação da fecundidade (ovos), fertilidade (lárvas) e taxa de eclosão (eclosão), com suas respectivas temperaturas

DATA	NÚMERO DE			TEMPERATURAS MÁXIMAS E MÍNIMAS (°C)			
	OVOS	LÁRVULAS	TAXA DE ECLOSÃO (%)	dia1	dia2	dia3	dia4
05/04/2010	572	184	32,2	24/25	23/25	22/23	22/24
05/04/2010	461	200	43,4	24/25	23/25	22/23	22/24
23/04/2010	524	24	4,6	25/26	25/26	25/26	25/26
23/04/2010	362	180	49,7	25/26	25/26	25/26	25/26
23/04/2010	340	215	63,2	25/26	25/26	25/26	25/26
23/04/2010	604	492	81,5	25/26	25/26	25/26	25/26
23/04/2010	406	262	64,5	25/26	25/26	25/26	25/26
23/04/2010	401	171	42,6	25/26	25/26	25/26	25/26
23/04/2010	500	221	44,2	25/26	25/26	25/26	25/26
29/04/2010	600	240	40,0	25/25	24/25	24/25	23/24
07/05/2010	567	229	40,4	24/26	24/26	24/26	22/24
07/05/2010	668	161	24,1	24/26	24/26	24/26	22/24
07/05/2010	721	416	57,7	24/26	24/26	24/26	22/24
13/05/2010	586	274	46,8	21/24	21/22	22/23	22/23
13/05/2010	513	296	57,7	21/24	21/22	22/23	22/23
21/05/2010	812	523	64,4	23/23	22/23	22/23	22/23
28/05/2010	533	30	5,6	22/23	22/22	22/22	22/22
28/05/2010	592	323	54,6	22/23	22/22	22/22	22/22
28/05/2010	510	235	46,1	22/23	22/22	22/22	22/22
28/05/2010	461	40	8,7	22/23	22/22	22/22	22/22
28/05/2010	542	222	41,0	22/23	22/22	22/22	22/22
28/05/2010	390	20	5,1	22/23	22/22	22/22	22/22
Médias	530	225	42	MÍNIMA	23	MÁXIMA	24

A variação na quantidade de ovos produzidos foi relatada pelas autoras como resultante da influência de fatores que atuam durante a fase larval e adulta dos organismos. As interferências encontradas no ambiente aquático, além das características genéticas e renovação das culturas, agiram diretamente sobre a fecundidade potencial, enquanto a temperatura, a luz e o vento são considerados fatores que dificultam o enxameamento, o acasalamento e a ovoposição, influenciando a fecundidade realizada (número de ovos postos pela fêmea).

No estágio larval, os organismos precisam absorver uma grande quantidade de nutrientes, pois na fase adulta não se alimentam. A variação da temperatura, segundo STRIXINO (1980) E STRIXINO & STRIXINO (1985), interfere no tempo de desenvolvimento das larvas, pois, quando cultivadas a baixas temperaturas, há um desaceleramento do metabolismo e as larvas permanecem por maior período de tempo nessa fase, acumulando maior quantidade de nutrientes. Consequentemente apresentaram alta mortalidade e fecundidade potencial relacionada à disponibilidade de alimento. Em temperaturas entre 15 e 18°C verificou-se o atraso na maturação dos ovos nas fêmeas adultas, com diminuição da fecundidade potencial pela utilização da energia para a própria manutenção.

Em ensaios com alimentação controlada, conduzidos pela mesma autora, verificou-se elevada sobrevivência (95%) e número razoável de ovos produzidos (média de 623) quando os organismos foram submetidos a temperaturas ótimas (25°C). Nesse mesmo estudo foi observada uma redução do número de ovos ao longo do ciclo reprodutivo, sendo que as fêmeas foram capazes de produzir até três desovas.

Neste trabalho, os organismos foram cultivados em laboratório com condições controladas de temperatura (média de 25°C), qualidade e quantidade de alimento conhecida, Tetramim[®], como o proposto por FONSECA (1997). A variação na quantidade de ovos produzidos quando comparados com os dados obtidos pelas autoras citadas anteriormente pode ser justificada pela quantidade de alimento diferenciada fornecida para essas culturas, ausência de renovação das mesmas e retirada de desovas originadas de segundas ou terceiras ovoposições para monitoramento da fecundidade.

A fertilidade média encontrada foi de 225 larvulas, variando de 24 a 523, enquanto STRIXINO (1980) obteve em seus experimentos, 496,7 larvulas. Baseando-se nos resultados da fecundidade e fertilidade, a taxa de eclosão média calculada foi de 42%, muito inferior ao encontrado pela mesma autora, de 99,7%.

A princípio, a autora relatou que a taxa de eclosão (representando a fertilidade) pode não sofrer influências de fatores ambientais embora cite a influência nesse processo, da temperatura (98% a 12°C) e da predação. Baixa mortalidade na fase de ovo (2%) também foi relatada e, justificada pela presença da massa gelatinosa onde os ovos estão inseridos. Essa massa gelatinosa é utilizada como fonte de alimento das larvulas recém-eclodidas e proteção para as mesmas contra a predação (por hidracarinos, por exemplo).

Os valores obtidos no experimento desenvolvido no laboratório da CETESB parecem não condizer com essa realidade, sendo necessária uma melhor investigação. A contagem das larvulas eclodidas foi realizada para a determinação da fertilidade e não a dos ovos não eclodidos, como o realizado por STRIXINO (1980). Essa diferença metodológica pode justificar a variação desses dados quando comparados aos da autora, pois se verificou que as maiores mortalidades das larvulas ocorriam no momento em que estas abandonam a massa gelatinosa para a construção dos casulos, resultando em valores menores para as taxas de eclosão.

A contagem adotada neste estudo levou em consideração a mortalidade das larvulas pós-eclosão sendo, portanto considerada a metodologia que mais representa a realidade no laboratório pois foram obtidos os valores reais de organismos-teste.

O baixo percentual de eclosão, no ensaio realizado no laboratório também sugere a interferência de compostos químicos presentes na água de diluição utilizada nos cultivos por ser uma água natural e não reconstituída, uma vez que as condições de cultivo foram muito semelhantes às expostas pelas autoras citadas.

5.2 Estabelecimento dos critérios de aceitabilidade das variáveis monitoradas

Os dados obtidos com o monitoramento das variáveis biológicas são específicos para cada laboratório e dependem da metodologia utilizada para o cultivo dos organismos. Portanto, os critérios de aceitabilidade que foram determinados também podem ser considerados específicos para estas condições. Os resultados foram tratados estatisticamente e os parâmetros escolhidos para compor os critérios de aceitabilidade poderão ser utilizados em outros estudos.

Na Figura 8 encontram-se os procedimentos e observações necessárias e adotadas para a determinação dos critérios de aceitabilidade para cada variável monitorada. No conjunto de variáveis monitoradas foi incluída a deformidade do mento em organismos expostos ao controle do ensaio ecotoxicológico com sedimento, pois assim como nos cultivos, não existem critérios de aceitabilidade para esse efeito no controle desse ensaio.

Inicialmente, foi verificada a normalidade dos dados para cada variável. A escolha do teste estatístico para a determinação da normalidade baseou-se no número amostral. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para número amostral acima de 50 dados como a sobrevivência (73) e a deformidade do mento em organismos expostos ao controle do ensaio (64). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para as demais variáveis com número amostral menor que 50 (deformidade do mento em organismos cultivados, 36; fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão, 22). Na Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos com o cálculo da normalidade dos dados.

Após a verificação da distribuição dos dados foram calculadas as medidas de tendência central (média, mediana e moda) e as medidas de dispersão, como apresentado na Tabela 11. As medidas de tendência central foram calculadas com o objetivo de representar dados de forma condensada sendo a média uma medida de tendência central não resistente, ou seja, fortemente influenciada por “outliers” e pela magnitude dos dados analisados, diferentemente da mediana, caracterizada como medida resistente (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Os valores obtidos para a primeira medida podem ser iguais ou muito semelhantes à mediana quando a distribuição dos dados é normal ou quase

normal, evidenciando uma pequena variação entre os dados obtidos, como o observado para fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão.

Tabela 10 - Resultados do cálculo da normalidade dos dados

Variável	n	Kolmogorov-Smirnov sig	Shapiro-Wilk sig	Distribuição Normal (*)
Sobrevivência	73	0	-	NÃO
Deformidade do mento (1)	36	-	0	NÃO
Deformidade do mento (2)	64	0	-	NÃO
Fecundidade	22	-	0,672	SIM
Fertilidade	22	-	0,096	SIM
Taxa de eclosão	22	-	0,11	SIM

n = número de dados

(*) valores de sig maiores que 0,05 consideram distribuição normal dos dados.

(1) Deformidade do mento dos organismos em cultivo.

(2) Deformidade do mento dos organismos no controle de ensaio.

O desvio padrão e o coeficiente de variação foram escolhidos e calculados como medidas de dispersão. Com esses valores é possível obter a variação apresentada pelo conjunto de dados para cada variável. Altos coeficientes de variação indicam maior amplitude entre os dados e, conseqüentemente, valores diferenciados para as medidas de tendência central, fato geralmente observado em grande parte dos dados que não apresentam distribuição normal, como a deformidade do mento (1 e 2), no entanto, os menores valores para as medidas de dispersão foram verificados para a sobrevivência cuja distribuição não é normal.

Tabela 11 - Resultados do cálculo das medidas de tendência central e de dispersão

Variável	Tendência central			Dispersão	
	Média	Mediana	Moda	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Sobrevivência (%)	89	94	96	12	13
Deformidade do mento (%) (1)	13	7	0	13	100
Deformidade do mento (%) (2)	17	9,5	0	18	106
Fecundidade (ovos)	530	528	461	116	22
Fertilidade (lárvas)	225	221	20	134	60
Taxa de eclosão (%)	41	43	57	21	51

(1) Deformidade do mento dos organismos em cultivo.

(2) Deformidade do mento dos organismos no controle de ensaio.

Figura 8 – Procedimentos adotados para a determinação dos critérios de aceitabilidade para as variáveis monitoradas

A distribuição dos dados de cada variável foi representada graficamente por um histograma (APÊNDICE D e E) possibilitando verificar os intervalos de classes com as maiores frequências, os quais representam melhor o conjunto de dados obtido.

Usualmente são utilizadas a média e o desvio padrão para representar o conjunto de dados, no entanto, HELSEL & HIRSCH (1992) contrapõem essa escolha uma vez que, em dados com distribuição assimétrica essa prática pode não representar o conjunto de dados uma vez que estes resultados são influenciados pelos outliers, contrariamente ao observado pela mediana e percentis.

Após a elaboração do histograma, os intervalos de classe com as maiores frequências foram analisados para cada variável para determinar qual limite (inferior ou superior) desses intervalos seriam utilizados como precursores para a escolha do critério, conforme descrito na tabela a seguir.

Tabela 12- Intervalos de classe com as maiores frequências dos dados obtidos

VARIÁVEL	INTERVALO DE CLASSE	
	INFERIOR	SUPERIOR
Sobrevivência (%)	90	100
Deformidade do mento (%) (1)	0	10
Deformidade do mento (%) (2)	0	20
Fecundidade (ovos)	500	600
Fertilidade (lárvas)	200	300
Taxa de eclosão (%)	40	60

Limite do intervalo selecionado

Uma das ferramentas de importância na análise estatística é o percentil e tem sido utilizado em diversos estudos ambientais que envolvem o estabelecimento de padrões de qualidade de água (HELSEL & HIRSCH, 1992); valores de referência para contaminantes em saúde humana (KUNO, 2009); estabelecimento de níveis de efeitos relevantes em ensaios ecotoxicológicos com o cálculo da constante de bioequivalência (BERTOLETTI *et al*, 2007), entre outros.

Embora o percentil represente a frequência acumulada dos dados obtidos, pré-determinar um percentil como critério pode não representar o valor adequado para o conjunto de dados obtido. Para definir o percentil adequado, foram calculados os percentis de 5 a 95, a cada intervalo de 5, pois não há um padrão para a determinação do percentil adequado para esse estudo.

Os valores obtidos para cada percentil foram comparados com os limites inferior ou superior dos intervalos de classe de maior frequência, determinados pelo programa estatístico SPSS versão 13.0. Os percentis com resultados mais próximos desses limites selecionados e menos restritivos foram adotados como critério de aceitabilidade para cada variável, como descrito no exemplo a seguir.

Exemplo 1: Determinação do critério de aceitabilidade para sobrevivência do lote de organismos jovens.

Na Figura 9 representou-se o histograma dos dados de sobrevivência. Observa-se o intervalo entre 90% e 100% como o de maior frequência desses dados. Assim, o valor de 90% é o limite inferior do intervalo de classes selecionado.

Figura 9 – Histograma dos dados de sobrevivência do lote de organismos jovens

↔ Intervalo de classe com maior frequência

O cálculo dos percentis entre 5 e 95 para os mesmos dados resultou nos percentuais apresentados na tabela a seguir.

Tabela 13 - Cálculo dos percentis para a sobrevivência

Percentil	Sobrevivência (%)
5	55
10	69,4
15	76,2
20	83,6
25	86
30	88,4
35	91,8
40	92
45	92,6
50	94
55	96
60	96
65	96
70	96
75	98
80	98
85	98,9
90	100
95	100

O limite do intervalo de classe escolhido é o que representa a linha de corte, ou seja, abaixo desse valor, para a sobrevivência, os dados não serão aceitos. Nesse caso, o limite inferior do referido intervalo selecionado foi 90%.

Analisando a Tabela 13, com os percentis calculados, aquele que mais se aproxima do limite 90% e é o menos restritivo é o P30 cujo percentual é 88,4.

Aplicando-se o exemplo descrito anteriormente para as demais variáveis, foi possível determinar os percentis que mais se aproximam dos limites selecionados e, conseqüentemente, estabelecer o critério de aceitabilidade para as mesmas, como descrito na Tabela 14.

O limite do intervalo de classe selecionado para a sobrevivência do lote de organismos jovens foi 90%. O percentil calculado mais próximo desse valor e menos restritivo foi representado pelo P30 = 88,4%, com isso, o critério de aceitabilidade adotado foi o de 88,4%, ou seja, a sobrevivência ótima dos organismos deve ser mantida acima desse valor.

Na deformidade do mento (1), as maiores frequências estiveram entre o intervalo de classe zero e 10%. Adotou-se o limite máximo do intervalo de classe para comparação com os percentis calculados. O valor mais próximo desse limite e menos restritivo foi representado pelo P60 = 11,14%, sendo o mesmo adotado como critério de aceitabilidade.

Tabela 14 - Resultados dos percentis calculados para cada variável monitorada

Percentil	Sobrevivência (%)	Valores obtidos		Fecundidade (ovos)	Fertilidade (lârvulas)	Taxa de eclosão (%)
		Deformidade do mento (%) (1)	Deformidade do mento (%) (2)			
5	55	0	0	343,3	20,6	4,675
10	69,4	0	0	370,4	25,8	5,25
15	76,2	0,715	3	394,95	34,5	6,995
20	83,6	2,34	4	404	112,6	17,94
25	86	2,75	4	447,25	168,5	30,175
30	88,4	3,06	7	461	179,1	39,22
35	91,8	4,17	7	500,5	184,8	40,43
40	92	5,48	8	510,6	203	41,32
45	92,6	6,685	8,25	516,85	217,1	42,88
50	94	7,35	9,5	528,5	221,5	43,8
55	96	8,88	13,75	538,85	226,55	45,435
60	96	11,14	16	562	233,8	46,66
65	96	15,425	17	571,75	239,75	49,555
70	96	16,71	18,5	586,6	263,2	54,91
75	98	20,75	20	594	279,5	57,7
80	98	26,68	25	601,6	306,8	59,9
85	98,9	31,055	29,5	639,2	374,15	63,86
90	100	36,01	48	705,1	469,2	64,47
95	100	45,91	56,5	798,35	518,35	78,95

Intervalo de classe com maior frequência.

Percentil adotado como critério de aceitabilidade, baseado no limite do intervalo de classe escolhido.

(1) Deformidade do mento dos organismos em cultivo.

(2) Deformidade do mento dos organismos no controle de ensaio.

A deformidade do mento (2) apresentou percentuais que se concentraram no intervalo entre zero e 20%. O percentil mais próximo e menos restritivo ao limite máximo do intervalo foi representado pelo P75, no valor de 20%, adotado como critério para essa variável.

O intervalo entre 500 e 600 ovos para a fecundidade apresentou a maior frequência. Comparando aos percentis calculados, o P30, no valor de 461,

foi o escolhido como critério de aceitabilidade.

As maiores frequências para a fertilidade foram observadas no intervalo entre 200 e 300 lárvulas. O P35, no valor de 184,8, foi o selecionado para representar o critério de aceitabilidade para essa variável.

As eclosões entre 40 e 60% foram as mais representativas na distribuição da frequência dos dados da taxa de eclosão, adotando-se o P30 (39,22) como critério.

A determinação do critério de aceitabilidade para as variáveis com distribuição normal ou quase normais poderá ser realizada com o cálculo das medidas de tendência central, média e mediana, uma vez que ambas apresentam valores iguais ou muito semelhantes, exceção feita apenas para a moda que no estudo apresentou valores diferentes das demais para as variáveis com distribuição normal.

Utilizando esse conceito para a fecundidade, fertilidade e taxa de eclosão, variáveis com distribuição normal neste estudo, o critério de aceitabilidade escolhido corresponderia ao P50, uma vez que esse percentil representa o valor da mediana. Para essas variáveis, as medianas nos valores de 528, 221 e 43, respectivamente, foram muito semelhantes às médias, nos valores de 530, 225 e 41 e, praticamente, correspondentes ao P50, nos valores de 528,5, 221,5 e 43,8.

Observa-se, no entanto, que a metodologia utilizada neste trabalho para a determinação do critério de aceitabilidade para as variáveis biológicas com normalidade dos dados, pela comparação dos intervalos de classe e percentis, é menos restritiva, representando o maior número de dados.

Após a determinação dos critérios, as variáveis deverão ser continuamente monitoradas e os dados analisados criticamente, observando a tendência dos mesmos sob as condições adotadas.

A periodicidade do monitoramento deverá ser estabelecida pelo laboratório. A ABNT (2007) descreve os procedimentos para elaboração e análise crítica das cartas-controle de sensibilidade, como as apresentadas anteriormente, baseadas nos resultados mensais dos ensaios de sensibilidade à substância de referência. As demais variáveis biológicas estudadas neste trabalho também

poderão ser plotadas em carta-controle, de modo a facilitar a observação da tendência dos dados, utilizando os critérios de aceitabilidade adotados como limite das cartas-controles.

A partir de então, o atendimento ao critério para cada variável será avaliado como satisfatório, ou seja, os dados serão aceitos de acordo com o critério estabelecido ou, insatisfatório, quando não há aceitabilidade dos mesmos para o respectivo critério.

Nos casos onde a avaliação é insatisfatória, tornar-se-á necessária uma revisão dos procedimentos de cultivo adotados. Essa revisão auxiliará na identificação de fatores bióticos ou abióticos que estejam fortemente influenciando a variável estudada para então, realizar novos ensaios, monitorar a variável e assim, estabelecer novos critérios de aceitabilidade.

5.3 Ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento

Visando verificar a aplicabilidade do ensaio com quironomídeo em atividades de rotina e a comparação com os resultados dos ensaios com *Hyalella azteca*, foram realizados, em paralelo, os dois ensaios com amostras de sedimento da rede de monitoramento para os anos de 2006, 2007, 2008 e 2009, totalizando 63 amostras.

Em todos os ensaios, a sobrevivência dos organismos utilizados no controle foram superiores ao critério de aceitabilidade, descrito em 4.3.11, correspondente a 70%, evidenciando o bom desempenho da metodologia adotada para o uso desse organismo-teste (APÊNDICE F, G, H e I).

Em 2006, foram utilizados sedimentos-controle coletados no Reservatório de Ponte Nova e no Rio Biritiba Mirim nos ensaios com ambos os organismos. No entanto, em 2007, a areia utilizada nos cultivos do quironomídeo foi adotada como sedimento-controle, pois oscilações na sobrevivência dos organismos do controle dos ensaios com *Hyalella* foram observadas sugerindo alterações na qualidade dos sedimentos utilizados como controle.

Os Relatórios da Qualidade de Águas Interiores da CETESB (2007, 2008, 2009 e 2010) forneceram informações sobre a classificação química e ecotoxicológicas do sedimento. A interpretação dos resultados do ensaio

ecotoxicológico com o quironomídeo baseou-se nos critérios descritos anteriormente.

Nos APÊNDICES F à I foram apresentados os resultados do ensaio ecotoxicológico com *C. sancticaroli* e com *H. azteca*. Dentre os ensaios realizados em 2006, apenas dois pontos apresentaram efeito o tóxico agudo para o quironomídeo: PASG 02800 e PCAB 02130 e foram classificados como Ruins pela avaliação ecotoxicológica proposta, baseada no percentual de mortalidade dos organismos (respectivamente, 45,8% e 46,6%).

A classificação química Péssima para ambos foi observada pela presença de cromo e níquel no primeiro ponto e cobre, no segundo, em concentrações acima de PEL (provável efeito) o que poderia justificar o efeito tóxico. Apenas o ponto PCAB 02130 apresentou também efeito tóxico subletal para *Hyalella azteca* (CETESB, 2007) com observação da redução no crescimento desse organismo ao final do período de ensaio. Já no ponto GUAR 00900, embora tenha sido observado efeito subletal para *H. azteca*, a amostra não apresentou toxicidade para o quironomídeo.

Nesse mesmo ano, outros três pontos apresentaram efeito tóxico subletal para o quironomídeo, com a observação de deformidade do mento: BILL 02100, TIBA 02800 e GADE 02900 e foram classificados como Regulares, pela presença significativa dessa deformidade. Não foram observados efeitos para o anfípoda. Nesses pontos a classificação química do sedimento foi Péssima, com a determinação de concentrações acima de PEL para chumbo, cobre, cádmio, níquel, cromo, zinco e mercúrio em BILL 02100; para níquel em TIBA 02800 e para mercúrio em GADE 02900, o que justificaria o efeito subletal observado. Esses metais foram citados como um dos principais indutores de deformidade por JANSSENS DE BISTHOVEN *et al* (1998) em quironomídeos.

No ano de 2007, seis pontos apresentaram efeito tóxico agudo para *C. sancticaroli*: BILL 02100, PARN 02900, PARB 02950, PCAB 02130 (como o observado em 2006), JUNA 04600 e ATIB 02800. Apenas o sedimento coletado em BILL 02100 recebeu classificação ecotoxicológica Ruim (25% de mortalidade) e química, Péssima, com a determinação da concentração de arsênio acima de PEL.

Os sedimentos dos demais pontos apresentaram classificação ecotoxicológica Péssima (53,3%, 51,6%, 60,8%, 77,5% e 83,3% de mortalidade, respectivamente) e química Regular, com a determinação de concentrações de contaminantes acima dos limites de TEL (baixa probabilidade de efeito): cromo em PARN 02900, ATIB 02800 e PARB 02950; cobre, zinco e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em PCAB 02130; cromo e níquel em JUNA 04600.

Em JUNA 04600 também foi observado efeito sobre o crescimento de *Hyalella azteca* e, em ATIB 02800, efeito tóxico agudo ao mesmo organismo (CETESB, 2008). No ponto PARN 02080 houve apenas a redução do crescimento de *H. azteca*.

Nesse mesmo ano, outros três pontos apresentaram efeito sobre a deformidade do mento: ATSG 02800 (observado também efeito agudo para o anfípoda), TIPR 02800 e GREI 02950 e foram classificados como Regulares. O primeiro ponto, com classificação química Péssima do sedimento, apresentou concentrações de chumbo, arsênio, cromo, níquel e zinco acima de PEL. Essas concentrações não foram suficientes para causar efeito agudo aos quironomídeos, mas podem ter induzido a presença de deformidades no mento. Em TIPR 02800, com classificação química Regular, foi observado cromo acima dos limites de TEL, enquanto em GREI 02950 não foram determinadas concentrações acima dos limites de referência adotados pela CETESB.

Em 2008 e 2009 não foram observados efeitos tóxicos em quironomídeos. Os pontos analisados receberam classificação ecotoxicológica Ótima. Apenas em SOIT 02850 foi observado efeito agudo para *H. azteca* (CETESB, 2009).

Os percentuais de efeitos observados nas amostras analisadas e submetidas ao ensaio com quironomídeo foram comparados aos resultados obtidos pela CETESB com o uso do anfípoda e estão apresentados na Figura 10.

As amostras coletas em rios do estado de São Paulo durante o período de estudo apresentaram efeito tóxico (agudo ou subletal) em 24% com o ensaio com *Chironomus sancticaroli* e 14% com *Hyalella azteca*. Já as amostras coletadas em reservatórios apresentaram 21% e 12%, respectivamente.

Apenas nos pontos PCAB 02130, ATIB 02800, JUNA 04600 e ATSG

02800 foram observados efeitos tóxicos a ambos os organismos expostos, *Hyalella azteca* e *Chironomus sancticaroli*.

Estudos realizados com quironomídeos e anfípodas (USEPA, 2000; ENVIRONMENT CANADA, 1997; INGERSOLL *et al*, 1996; 2001; STOUGHTON *et al*, 2008, entre outros) observaram diferentes efeitos ao serem realizados ensaios com amostras de uma mesma procedência ou, com mesma composição química, o que reforça a presença da variabilidade da disponibilidade dos compostos químicos à biota exposta.

Esses compostos podem comprometer o metabolismo e os mecanismos fisiológicos dos organismos expostos resultando nos efeitos observados no presente estudo. É importante considerar também, as diferenças existentes na sensibilidade, comportamentos alimentares e habitats de cada organismo (CETESB, 2009).

Figura 10 – Percentuais de efeito observados em amostras coletadas entre 2006 a 2009. Efeitos tóxicos em vermelho e não tóxicos em azul. A e B: Amostras coletadas em rios (n= 29. A – ensaio com *Hyalella azteca* e B – ensaio com *Chironomus sancticaroli*). C e D: Amostras coletadas em reservatórios (C- ensaio com *H. azteca*, n= 33 e D- ensaio com *C. sancticaroli*, n=34)

A ingestão de partículas do sedimento bruto, característica inerente aos quironomídeos e a interação das mesmas durante os processos digestivos podem promover a disponibilização de compostos químicos e sua absorção pelos organismos, resultando em efeitos observáveis (LEE *et al*, 2000) em sedimentos cujas concentrações de compostos químicos solubilizados não causariam efeitos significativos.

Outro fator a ser considerado diz respeito às interações entre os compostos químicos analisados, como sinergismo e antagonismo, à presença de compostos químicos não analisados e o desconhecimento da toxicidade causada pela interação entre esses compostos nas amostras ambientais. Processos de degradação e transformação como hidrólise, fotólise e oxidação, como descrito por VERMEULEN (1995) aliados as interações químicas podem produzir novos compostos e contribuir para a complexidade da carga tóxica total da amostra.

A avaliação da deformidade de larvas foi proposta por HUDSON & CIBOROWSKI (1996a e 1996b) como um complemento às pesquisas com bioensaios em laboratório de sedimentos contaminados em programas de monitoramento na Bélgica e no Reino Unido pela UK Environment Agency (MEREGALLI & OLLEVIER, 2001a) e por diversos pesquisadores tais como, JANSSENS DE BISTHOVEN *et al* (1992, 1994, 1998), LENAT (1993) MARTINEZ *et al* (2003; 2004), MEREGALLI *et al* (2001b), WATTS *et al* (2003), BURT *et al* (2003), dentre outros citados anteriormente, identificando a influência de compostos químicos metálicos e orgânicos na indução de deformidade do mento, sendo considerada positiva a utilização desse biomarcador em biomonitoramentos.

JANSSENS DE BISTHOVEN *et al* (1998) salienta que invertebrados aquáticos desenvolvem tolerâncias a metais, resistindo e se desenvolvendo em ambientes contaminados, mas podem apresentar efeitos subletais como o desenvolvimento de anomalias, tais como as deformidades no mento.

Correlações positivas lineares entre as concentrações de compostos químicos e deformidades têm sido frequentes em estudos com substâncias isoladas, como descritas no levantamento realizado por VERMEULEN (1995), no entanto, a observação das deformidades em amostras ambientais pode não

apresentar essas correlações.

Em ensaios realizados em laboratório o mesmo autor relata que a indução de deformidades pode estar relacionada à disponibilidade e quantidade de alimento e à temperatura. O aumento da temperatura acelera o metabolismo das larvas e conseqüentemente, aumenta o consumo de alimento. A presença de compostos químicos adsorvidos ao alimento e ao sedimento faz com que a ingestão seja a principal via de exposição aos organismos, resultando no acúmulo dos contaminantes e propiciando o desenvolvimento de deformidades.

A grande maioria das amostras em que foram observados efeitos sobre o mento dos quironomídeos apresentou classificação química de regular a péssima, indicando que este efeito pode estar associado às concentrações dos compostos químicos determinadas.

Ambientes limpos ou com concentrações baixas de contaminantes podem induzir o desenvolvimento de deformidades associado às características do próprio sedimento como o observado por JEYASINGHAM (1997) o que pode justificar o ocorrido no ponto GREI 02950 onde a classificação química do sedimento apresentou-se Ótima.

A utilização de organismos cultivados em laboratório em ensaios ecotoxicológicos com amostras ambientais de sedimento para observação de efeito subletal, como a deformidade do mento, não é comprometida pela incidência natural ou induzida de deformidades observadas nos controles do ensaio, pois as frequências iniciais de deformidade nos organismos expostos ao controle do ensaio e às amostras são as mesmas.

A deformidade do mento foi estatisticamente significativa e observada em algumas amostras apenas com a aplicação do Teste t-Student, mesmo possuindo menor sensibilidade, ou capacidade de apresentar significância estatística, quando comparado ao Teste t por bioequivalência.

Essa menor capacidade pode resultar falsos positivos por não levar em consideração a variação normal da deformidade do mento esperada na população de organismos utilizada no controle dos ensaios. Sendo assim, é importante estabelecer a constante de proporcionalidade ("r") para essa variável para aplicação do Teste t por bioequivalência, o que permitirá maior confiabilidade

da significância estatística.

6 CONCLUSÕES

- As variáveis biológicas de importância para o monitoramento da qualidade dos organismos cultivados em laboratório apresentaram os seguintes valores basais médios para as condições a que foram submetidas: sensibilidade ao cloreto de potássio, CL 50 em 4,53 g/L; sobrevivência de 89% dos organismos; 530 ovos produzidos em cada massa ovígera (fecundidade); 225 larvulas eclodidas por cada massa de ovos (fertilidade); taxa de eclosão de 42% e 13 % de organismos com deformidade do mento.
- Os critérios de aceitabilidade calculados para as variáveis biológicas monitoradas foram: 88,4% para a sobrevivência dos organismos; 11% para deformidade do mento dos organismos em cultivo; 20% para a deformidade do mento dos organismos do controle do ensaio; 461 ovos para a fecundidade; 184 larvulas para a fertilidade e 39% para taxa de eclosão.
- A metodologia adotada para a realização dos ensaios ecotoxicológicos com *Chironomus sancticaroli* apresentou bom desempenho ao ser observada a sobrevivência dos organismos expostos ao sedimento controle do ensaio acima do critério de aceitabilidade estabelecido (70%) para o ensaio.
- Dentre as amostras submetidas ao ensaio com o quironomídeo, 22% (14 amostras das 63 analisadas) apresentaram algum efeito tóxico (agudo ou subletal) durante o período de estudo, de acordo a metodologia utilizada e 12% (8 das 62) apresentaram efeito para *H. azteca*, de acordo com os dados da CETESB. A diferença da sensibilidade observada entre os organismos comparados torna possível a utilização do quironomídeo como organismo-teste na rotina da rede de monitoramento da qualidade do sedimento.

É importante ressaltar a necessidade de desenvolver estudos para a verificação dos fatores responsáveis pela variação observada no monitoramento das variáveis biológicas e implementação de melhorias de forma a garantir a qualidade dos organismos cultivados.

Os procedimentos descritos poderão auxiliar na elaboração de documentos normalizados relacionados ao cultivo e ensaio ecotoxicológico com sedimento utilizando essa espécie.

Além disso, os resultados obtidos com o ensaio com o quironomídeo *C. sancticaroli*, associado aos obtidos com o anfípoda *H. azteca* ou outro organismo-teste representativo do sedimento podem ser utilizados para a implantação futura de um novo critério de qualidade ecotoxicológica, na avaliação da qualidade do sedimento da CETESB, uma vez que foi verificada diferença da sensibilidade entre os organismos.

APÊNDICE A

Tabela 15 - Pontos de coleta de sedimento submetidos aos ensaios entre 2006 e 2009. (R – amostras provenientes de rios, RS – amostras provenientes de reservatórios)

CÓDIGO	UGRHI	CORPO HÍDRICO	TIPO DE VOCAÇÃO	COLETA	AMOSTRA
ATIB 02065	5	RIO ATIBAIA	INDUSTRIAL	2007 e 2008	R
ATIB 02605	5	RIO ATIBAIA	INDUSTRIAL	2006	R
ATIB 02800	5	RIO ATIBAIA	INDUSTRIAL	2006 e 2007	R
ATSG 02800	5	RESERVATÓRIO SALTO GRANDE	INDUSTRIAL	2006 à 2009	RS
BILL 02100	6	RESERVATÓRIO BILLINGS	INDUSTRIAL	2006 à 2009	RS
COTI 03840	6	RIO COTIA	INDUSTRIAL	2006	R
CPIV 02600	5	RIO CAPIVARI	INDUSTRIAL	2006	R
GADE 02800	6	RIO GRANDE	INDUSTRIAL	2007	R
GADE 02900	6	RIO GRANDE	INDUSTRIAL	2006	R
GREI 02950	14	RIBEIRÃO GUAREÍ	CONSERVAÇÃO	2007	R
GUAR 0900	6	RESERVATÓRIO DO GUARAPIRANGA	INDUSTRIAL	2006 e 2007	RS
ITAP 02450	14	RIO ITAPETININGA	CONSERVAÇÃO	2008	RS
JAGR 02900	5	RIO JAGUARI	INDUSTRIAL	2008	R
JAIN 02600	11	RIO JACUPIRANGUINHA	CONSERVAÇÃO	2008	R
JAPI 02100	11	RIO JACUPIRANGUINHA	CONSERVAÇÃO	2006	R
JARI 00800	5	RIO JAGUARI	INDUSTRIAL	2009	RS
JNDI 00450	6	RIO JUNDIAÍ	INDUSTRIAL	2006 e 2007	RS
JUNA 04600	5	RIO JUNDIAÍ	INDUSTRIAL	2007	R
JUNA 04900	5	RIO JUNDIAÍ	INDUSTRIAL	2006	R
JUQI 00810	11	RIO JUQUIÁ	CONSERVAÇÃO	2009	R
PADO 02950	17	RIO PARDO	AGROPECUÁRIA	2008	R
PARB 02680	2	RIO PARAÍBA DO SUL	INDUSTRIAL	2008	R
PARB 02950	2	RIO PARAÍBA DO SUL	INDUSTRIAL	2006 e 2007	R
PARD 02780	12	RIO PARDO	EM INDUSTRIALIZAÇÃO	2006	R
PARN 02080	19	RIO PARANÁ	AGROPECUÁRIA	2007	RS
PARN 02900	22	RIO PARANÁ	AGROPECUÁRIA	2007 e 2008	RS
PARP 02700	22	RIO PARANAPANEMA	AGROPECUÁRIA	2007 à 2009	RS
PASG 02800	17	RESERVATÓRIO DE SALTO GRANDE	AGROPECUÁRIA	2006 e 2007	RS
PCAB 02130	5	RIO PIRACICABA	INDUSTRIAL	2006 e 2007	R
RGDE 02900	6	RESERVATÓRIO DO RIO GRANDE	INDUSTRIAL	2006 e 2007	RS
RIBE 02650	11	RIO RIBEIRA	CONSERVAÇÃO	2009	R
RIBE 02750	11	RIO RIBEIRA	CONSERVAÇÃO	2006 e 2007	R
RIIG 02200	11	RIO RIBEIRA DO IGUAPE	CONSERVAÇÃO	2007	R
SAPU 02750	8	RIO SAPUCAÍ	EM INDUSTRIALIZAÇÃO	2006	R
SDOM 03700	15	RIBEIRÃO SÃO DOMINGOS	AGROPECUÁRIA	2006	R
SOIT 02850	10	RESERVATÓRIO DE ITUPARARANGA	INDUSTRIAL	2008 e 2009	RS
TIBA 02800	13	RESERVATÓRIO DE BARIRI	EM INDUSTRIALIZAÇÃO	2006 e 2007	RS
TIBB 02900	10	RESERVATÓRIO DE BARRA BONITA	INDUSTRIAL	2006 e 2007	RS
TIBI 02900	13	RESERVATÓRIO DE IBITINGA	EM INDUSTRIALIZAÇÃO	2008	RS
TIPR 02800	16	RESERVATÓRIO DE PROMISSÃO	AGROPECUÁRIA	2007	RS
TITR 02100	19	RESERVATÓRIO DE TRÊS IRMÃOS	AGROPECUÁRIA	2006 e 2007	RS

APÊNDICE B

Tabela 16 – Resultados dos ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio (2006 a 2009)

Nº ENSAIO	DATA	CL 50 g/L
1	20/06/2006	4,02
2	27/06/2006	5,32
3	25/04/2006	3,83
4	03/10/2006	4,23
5	29/08/2007	5,33
6	13/09/2007	4,15
7	11/10/2007	4,24
8	21/11/2007	4,78
9	26/12/2007	3,84
10	02/01/2008	5,21
11	26/02/2008	5,36
12	03/06/2008	4,05
13	31/07/2008	4,48
14	09/08/2008	4,51
15	02/12/2008	4,59
16	13/01/2009	4,54
média		4,53
desvio padrão (dp)		0,53
coeficiente de variação		11,76
limites da próxima carta-controle: (média $\pm 2dp$)		3,47-5,59 g/L

Tabela 17 – Resultados dos ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio (2009 a 2010)

Nº ENSAIO	DATA	CL 50 g/L
1	12/02/2009	5,48
2	31/03/2009	5,11
3	12/05/2009	5,27
4	04/08/2009	5,18
5	01/09/2009	5,14
6	08/09/2009	4,17
7	27/10/2009	5,17
8	01/12/2009	4,2
9	05/01/2010	4,73
10	02/02/2010	4,58
11	02/03/2010	5,43
12	04/05/2010	4,73
13	29/06/2010	5,41
14	20/07/2010	4,17
15	16/11/2010	4,4
16	28/12/2010	5,14
17	18/01/2011	5,31
18	08/02/2011	5,11
média		4,93
desvio padrão (dp)		0,45
coeficiente de variação		9,19
limites da próxima carta-controle: (média $\pm 2dp$)		4,03 a 5,83 g/L

APÊNDICE C

Figura 11 – Primeira carta-control de sensibilidade ao cloreto de potássio, referente aos dados da Tabela 16

Figura 12– Carta-control de sensibilidade ao cloreto de potássio, referente aos dados da Tabela 17

APÊNDICE D

Figura 13 – Histogramas com a apresentação dos intervalos de classe (eixo X) com as maiores frequências de dados (eixo Y) para cada variável, identificados pela seta em vermelho

APÊNDICE E

Figura 14 – Histogramas com a apresentação dos intervalos de classe (eixo X) com as maiores frequências de dados (eixo Y) para cada variável, identificados pela seta em vermelho

APÊNDICE F

Tabela 18 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *C.sancticaroli* realizados em 2006

<i>Chironomus sancticaroli</i>							
TOXICIDADE							
DATA	CÓDIGO	QUÍMICO *	<i>H. azteca</i> *	Classificação**	Sobrevivência	Deformidade	%
13/06/2006	PONTE NOVA				92,5%		4,2
	BILL 02100	PÉSSIMO	ÓTIMO	REGULAR	NT	TOX	21,7
	RGDE 02900	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	5,8
	TIBB 02900	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	7,5
	TIBA 02800	PÉSSIMO	ÓTIMO	REGULAR	NT	TOX	8,8
03/07/2006	PONTE NOVA				95%		20,9
	GUAR 00900	PÉSSIMO	REGULAR	ÓTIMO	NT	NT	23,4
	JNDI 00450	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	26,1
	ATSG 02800	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	21,1
24/07/2006	B. MIRIM				94,7%		8,8
	PARB 02950	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	7,1
	GADE 02900	PÉSSIMO	ÓTIMO	REGULAR	NT	TOX	21,4
21/08/2006	PONTE NOVA				97,5%		5,8
	PASG 02800	PÉSSIMO	ÓTIMO	RUIM	TOX	-	-
	TITR 02100	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	6,2
26/09/2006	B. MIRIM				94,2%		53,3
	SAPU 02750	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	41,8
	SDOM 03700	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	42,9
	PARD 02780	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	54,9
18/09/2006	B. MIRIM				88,4%		10,7
	JUNA 04900	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	7,9
	COTI 03840	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	13,4
10/10/2006	B. MIRIM				93,4%		69,2
	RIBE 02750	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	59,2
	JAPI 02100	ÓTIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	56,3
	ATIB 02800	PÉSSIMO	RUIM	ÓTIMO	NT	NT	62,0
17/10/2006	B. MIRIM				88,4%		29,5
	PCAB 02130	PÉSSIMO	REGULAR	RUIM	TOX	-	-
	ATIB 02065	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	26,7
	CPIV 02720	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	33,3
PONTE NOVA: SEDIMENTO CONTROLE PARA RESERVATÓRIOS						MÉDIA	10,3
B. MIRIM: SEDIMENTO CONTROLE PARA RIOS						MÉDIA	34,3

* classificação química e ecotoxicológica de acordo com a CETESB (2007)

** classificação ecotoxicológica proposta pelo estudo

NT - não tóxico, ausência de efeito TOX - tóxico, presença de efeito sobre a sobrevivência ou deformidade do mento

% - porcentagem de deformidade do mento observada

APÊNDICE G

Tabela 19 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *C.sancticaroli* realizados em 2007

<i>Chironomus sancticaroli</i>							
TOXICIDADE							
DATA	CÓDIGO	QUÍMICO *	<i>H. azteca</i> *	Classificação**	Sobrevivência	Deformidade	%
19/06/2007	AREIA				91,7%		6,4
	GUAR 00900	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	10,3
	RGDE 02900	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	7,8
	ATSG 02800	PÉSSIMO	RUIM	REGULAR	NT	TOX	13,4
03/07/2007	AREIA				86,7%		45,3
	BILL 02100	PÉSSIMO	nr	RUIM	TOX	-	-
	JNDI 00450	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	31,2
	TITR 02100	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	42,1
24/07/2007	AREIA				78,4%		27,3
	TIPR 02800	REGULAR	ÓTIMO	REGULAR	NT	TOX	41,7
	PARN 02900	REGULAR	ÓTIMO	PÉSSIMO	TOX	-	-
	PARN 02080	PÉSSIMO	REGULAR	ÓTIMO	NT	NT	25,0
31/07/2007	AREIA				90,9%		7,0
	PASG 02800	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	5,8
	PARP 02700	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	6,0
07/08/2007	AREIA				97,5%		11,5
	TIBA 02800	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	12,7
	TIBB 02900	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	6,5
	PARB 02950	REGULAR	ÓTIMO	PÉSSIMO	TOX	-	-
14/08/2007	AREIA				95%		6,1
	PCAB 02130	REGULAR	ÓTIMO	PÉSSIMO	TOX	-	-
02/10/2007	AREIA				75%		29,9
	JUNA 04600	REGULAR	REGULAR	PÉSSIMO	TOX	-	-
	GADE 02800	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	40,2
	RIBE 02750	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	37,2
030/10/2007	AREIA				85%		53,4
	RIIG 02500	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	49,6
	GREI 02950	ÓTIMO	ÓTIMO	REGULAR	NT	TOX	60,4
	ATIB 02065	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	58,8
	ATIB 02800	REGULAR	RUIM	PÉSSIMO	TOX	-	-
AREIA: SEDIMENTO CONTROLE PARA RIOS E RESERVATÓRIOS						MÉDIA	23,4

ADOTADO APÓS 2007

nr: NÃO REALIZADO

* classificação química e ecotoxicológica de acordo com a CETESB (2008)

** classificação ecotoxicológica proposta pelo estudo

NT - não tóxico, ausência de efeito TOX - tóxico, presença de efeito sobre a sobrevivência ou deformidade do mento

% - porcentagem de deformidade do mento observada

APÊNDICE H

Tabela 20 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *C.sancticaroli* realizados em 2008

				<i>Chironomus sancticaroli</i>			
				TOXICIDADE			
DATA	CÓDIGO	QUÍMICO *	<i>H. azteca</i> *	Classificação**	Sobrevivência	Deformidade	%
23/06/2008	AREIA				83,4%		13,3
	ATSG 02800	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	9,3
08/07/2008	AREIA				85,9%		10,8
	BILL 02100	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	21,8
29/08/2008	AREIA				92,7%		9,8
	PARP 02700	RUIM	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	4,3
	PARN 02900	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	11,2
19/08/2008	AREIA				92,5%		2,7
	PADO 02950	RUIM	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	2,6
	TIBI 02900	RUIM	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	2,8
	ITAP 02450	ÓTIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	3,5
09/09/2008	AREIA				91,7%		21,2
	ATIB 02065	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	29,3
	JAGR 02900	ÓTIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	25,2
30/09/2008	AREIA				nr		12,1
	JAIN 02600	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	12,5
	PARB 02680	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	5,2
	SOIT 02850	REGULAR	RUIM	ÓTIMO	NT	nr	nr
AREIA: SEDIMENTO CONTROLE PARA RIOS E RESERVATÓRIOS						MÉDIA	11,6

ADOTADO A PARTIR DE 2007

nr: NÃO REALIZADO

* classificação química e ecotoxicológica de acordo com a CETESB (2009)

** classificação ecotoxicológica proposta pelo estudo

NT - não tóxico, ausência de efeito TOX - tóxico, presença de efeito sobre a sobrevivência ou deformidade do mento

% - porcentagem de deformidade do mento observada

APÊNDICE I

Tabela 21 - Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *C.sancticaroli* realizados em 2009

					<i>Chironomus sancticaroli</i>		
					TOXICIDADE		
DATA	CÓDIGO	QUÍMICO *	<i>H. azteca</i> *	Classificação**	Sobrevivência	Deformidade	%
10/11/2009	AREIA				97,5%		2,7
	PARP 02700	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	3,7
	JUQI 0810	ÓTIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	1,0
	RIBE 02650	ÓTIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	NT	5,0
	AREIA				98,4%		
22/09//2009	ATSG 02800	REGULAR	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	nr	nr
	SOIT 02850	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	nr	nr
13/10/2009	AREIA				98,4%		
	BILL 02100	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	nr	nr
	JARI 0800	PÉSSIMO	ÓTIMO	ÓTIMO	NT	Nr	nr
AREIA: SEDIMENTO CONTROLE PARA RIOS E RESERVATÓRIOS						MÉDIA	2,7

ADOTADO A PARTIR DE 2007

nr: NÃO REALIZADO

* classificação química e ecotoxicológica de acordo com a CETESB (2010)

** classificação ecotoxicológica proposta pelo estudo

NT - não tóxico, ausência de efeito TOX - tóxico, presença de efeito sobre a sobrevivência ou deformidade do mento

% - porcentagem de deformidade do mento observada

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, R. P. A. **Teste de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo**. 2005. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ABESSA, D.M.S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil**. 2002. Tese (Doutorado) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade em sedimentos - Método de ensaio com *Hyalella ssp* (Amphipoda)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2007. (NBR 15470)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia ssp* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2009. (NBR 12713)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia ssp* (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2010. (NBR 13373)
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C.D. Aquatic toxicology test methods. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton, FL: CRC, 2003.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. **Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. West Conshohocken: ASTM, 2005. (E1706-05).
- ARMITAGE, P.D.; CRANSTON, P.S. & PINDER, L.C.V. (Eds) **The Chironomidae. Biology and Ecology of non-biting midges**. 7ed. .London: Chapman & Hall, 1995.
- BARBOSA, D. S. **Análise da interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos: proposta para a geração de tecnologias de detoxificação aquática**. 2008. Tese (Doutorado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- BERTOLETTI, E; BURATINI, S.V.; PRÓSPERI, V.A.; ARAÚJO, R.P.A.; WERNER, L.I. Selection of relevant effect levels for using Bioequivalent Hypothesis Testing. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v.2, n.2, p. 139-145, 2007.

BIRD, G. A.; SCHWARTZ, W.J.; JOSEPH, D.L. The effect of ^{210}Pb and lead on the induction of menta deformities in *Chironomus tentans* larvae and on their growth and survival. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 14, n. 12, p. 2125-2130, 1995.

BIRD, G. A. Deformities in cultured *Chironomus tentans* larvae and the influence of substrate on growth, survival and mentum wear. **Environ. Monit. Assess.**, v. 45, p. 273-283, 1997.

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

BRAMORSKI, J. **Avaliação da qualidade de sedimentos dos rios Tietê e Piracicaba nos seus compartimentos de entrada no reservatório de Barra Bonita, SP.** 2004. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 344, de 25 de março de 2004. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação de material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras e dá outras providências. **Diário Oficial da União:** República Federativa de Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 maio 2004. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>>. Acesso em: jun. 2010.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras diretrizes. **Diário Oficial da União:** República Federativa de Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Comissão Mista do Saneamento. Lei ordinária nº 11.445, de 05 de janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico; altera as leis 6.766, de 19 de dezembro de 1979, 8.036, de 11 de maio de 1990, 8.666, de 21 de junho de 1993, 8.987, de 13 de fevereiro de 1995; revoga a lei 6.528, de 11 de maio de 1978; e dá outras providências. **Diário Oficial da União:** República Federativa de Brasil, Poder Legislativo, Brasília, DF, 8 jan. 2007. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Lei/L11445.htm>. Acesso em: jun.2010.

BURT, J.; CIBOROWSKI, J.J.H.; REYNOLDSON, T.B. Baseline incidence of mouthpart deformities in Chironomidae (Diptera) from the Laurentian Great Lakes, Canada. **J. Great Lakes Res.** v. 29, n. 1, p. 172-180, 2003.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. **Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life – Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. Ontario: CCME, 1999. (EPC-98E)

CHAPMAN, P.M.; HO, K.; MUNNS Jr, W.R.; SOLOMON, K.; WEINSTEIN, M.P. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, p. 271-278, 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2006**. São Paulo: CETESB, 2007.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2007**. São Paulo: CETESB, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2008**. São Paulo: CETESB, 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo 2009**. São Paulo: CETESB, 2010.

COONEY, J.D. Freshwater tests. In: RAND, G. M. (Ed) **Fundamentals of aquatic toxicology**. Florida: Taylor & Francis, 1995.

CORREIA, L.C.S. **Contribuição para o conhecimento do gênero *Chironomus* Meigen, 1803 na região Neotropical**. 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

COSTA, J. B. **Avaliação ecotoxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta**. 2007. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

DICKMAN, M.; BRINDLE, I.; BENSON, M. Evidence of teratogens in sediments of the Niagara river watershed as reflected by chironomid (Diptera: Chironomidae) deformities. **J. Great Lakes Res.** v. 18, n. 3, p. 467-480, 1992.

DORNFELD, C. B. **Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande.** 2002. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

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

ENVIRONMENT CANADA. **The use of morphological deformities in chironomid larvae for biological effects monitoring.** Saskatoon: National Hydrology Research Centre, 1990.

ENVIRONMENT CANADA. **Biological test method: test for survival and growth in sediment using the larvae of freshwater midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*).** Ontario: Environment Canada, 1997. (EPS 1/RM/32).

FERNICOLA, N.A.G.C.; BOHRER-MOREL, M.B.C.; BAINY, A.C.D. Ecotoxicologia. IN: AZEVEDO, F.A. & CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RiMa, 2003.

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

GIESY, J. P. & HOKE, R. A. Freshwater sediment toxicity bioassessment rationale for species selection and test design. **J. Great Lakes Res.**, v.15, n. 4, p. 539-569, 1989.

HELSEL, D.R. & HIRSCH, R. M. **Statistical Methods in Water Resources.** Netherlands: Elsevier Science Publishing Company Inco, 1992.

HUDSON, L. A. & CIBOROWSKI, J. J. H. Teratogenic and genotoxic responses of larval *C. salinarius* group (Diptera: Chironomidae) to contaminated sediment. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 15, n. 8, p. 1375-1381, 1996a.

HUDSON, L. A. & CIBOROWSKI, J. J. H. Spatial and taxonomic variation in incidence of mouthpart deformities in midge larvae (Diptera: Chironomidae: Chironomini). **An. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 53, p. 297-304, 1996b.

INGERSOLL, C. G.; HAVERLAND, P.; BRUNSON, E.L.; CANFIELD, T.J.; DWYER, J.; HENKE, C.E.; KEMBLE, N.E.; MOUNT, D.R.; FOX, R.G. Calculation and evaluation of sediment effect concentrations for the amphipod *Hyaella azteca* and the midge *Chironomus riparius*. **J. Great Lakes Res.**, v. 22, n. 3, p. 602-623, 1996.

INGERSOLL, C. G.; MACDONALD, D.D.; WANG, N.; CRANE, J.L.; FIELD, L.J.; HAVERLAND, P.S.; KEMBLE, N.E.; LINDSKOOG, R.A.; SEVERN, C.; SMORONG, D.E. Predictions of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, n. 1, p. 8-21, 2001.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L. TIMMERMANS, K.R.; OLLEVIER, F. The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in *Chironomus gr. thummi* larvae (Diptera, Chironomidae) with deformed versus normal menta. **Hydrobiol.**, v. 239, p. 141-149, 1992.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L.; VAN SPEYBROECK, D. Some observations of deformity midge larvae (Diptera, Chironomidae) in Kenya. **Verh Internat Verein Limnol** v. 25, p. 2485-2489, 1994.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L.; NUYTS, P.; GODDERIS, B.; OLLEVIER, F. Sublethal parameters in deformed *Chironomus* larvae: clues to understanding their biomarker value. **Freshw. Biol.**, v. 39, p. 179-191, 1998.

JANSSENS DE BISTHOVEN, L.; POSTMA, J.; VERMEULEN, A.; GOEMANS, G.; OLLEVIER, F. Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. **Water, Air and Soil Pollut.**, v. 129, p. 167-179, 2001.

JAGER, T; POSTHUMA. L.; ZWART, D.; MEENT, D. Novel view on predicting acute toxicity: Decomposing toxicity data in species vulnerability and chemical potency. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 67, n. 3, p. 311-322, 2007.

JEYASINGHAM, K.; LING, N. Head capsule deformities in *Chironomus zealandicus* (Diptera: Chironomidae): influence of site and substrate. **New Zealand J. Mar. Freshw. Res.**, v. 31, p. 175-184, 1997.

KUHLMANN, M.L.; HAYASHIDA, C.Y. & ARAUJO, R. P. A. Using the *Chironomus* (Chironomidae: Díptera) mentum deformities in environmental assessment. **Acta Limnol. Bras.** n.12, p. 55-61, 2000.

KUNO, R. **Valores de referência para chumbo, cádmio e mercúrio em população adulta da Região Metropolitana de São Paulo.** 2009. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LEE, B. G.; GRISCOM, S.B.; LEE, J.S.; CHOI, H.J.; KOH, C.H.; LUOMA, S.N.; FISHER, N.S. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. **Science** n. 287, p. 282-284, 2000.

LENAT, D.R. Using mentum deformities of *Chironomus* larvae to evaluate the effects of toxicity and organic loading in streams. **J. N. Am. Benthol. Soc.** v. 12, n. 3, p. 265-269, 1993.

LOEB, S.L.; SPACIE, A. **Biological Monitoring of Aquatic Systems.** Boca Raton: Lewis/CRC, 1994.

MARTINEZ, E. A.; MOORE, B.C.; SCHAUMLOFFEL, J.; DASGUPTA, N. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and cooper-spiked sediments. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 55, p. 204-212, 2003.

MARTINEZ, E.A.; WOLD, L.; MOORE, B.C.; SCHAUMLOFFEL, J.; DASGUPTA, N. Morphologic and growth responses in *C. tentans* to arsenic exposure. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 47, p. 193-198, 2004.

MARTINEZ E. A.; MOORE, B.C.; SCHAUMLOFFEL, J.; DASGUPTA, N. Teratogenic versus mutagenic abnormalities in chironomid larvae exposed to zinc and lead. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 51, p. 529-536, 2006.

MEREGALLI, G.; OLLEVIER, F. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17 α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. **Sci. Total Environ.**, v. 269, p. 157-161, 2001a.

MEREGALLI, G.; PLUYMERS, L.; OLLEVIER, F. Induction of mouthparts deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. **Environ. Pollut.**, v. 111, p. 241-246, 2001b.

MEREGALLI, G.; BETTINETTI, R.; PLUYMERS, L.; VERMEULEN, A.C.; ROSSARO, B.; OLLEVIER, F. Mouthparts deformities and nucleolus activity in field-collected *Chironomus riparius* larvae. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 42, p. 405-409, 2002.

NEWMANN, M.C. & UNGER, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2nd. USA: Lewis Publishers, 2003.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, 2004a. (Test n. 218)

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, 2004b. (Test n. 219)

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, 2010. (Test n. 233)

PERY, A. R. R.; GEFFARD, A.; CONRAD, A.; MONS, R.; GARRIC, J. Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 71, n. 3, p. 869-873, 2008.

PUSCEDDU, F. H. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado (“spiked sediment”)**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSEMBERG, D.M. & RESH, V.H. (Eds). **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 1993.

SALES, S. C. M. **Reavaliação ecotoxicológica da qualidade da água e do sedimento do reservatório da Pampulha (MG) e seus principais tributários**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SÃO PAULO (Estado). **Lei Estadual nº 9.034, de 27 de dezembro de 1994**. Dispõe sobre o Plano Estadual de Recursos Hídricos – PERH, a ser implantado no período de 1994 a 1995, em conformidade com a Lei nº 7.663, de 30 de dezembro de 1991, que instituiu normas de orientação à Política Estadual de Recursos Hídricos. Disponível em : http://www.cetesb.sp.gov.br/legislacao/estadual/leis/1994_Lei_Est_9034.pdf. Acesso em:jun.2010.

SERVIA, M., COBO, F.; GONZALEZ, M.A. Incidence and causes of deformities in recently hatched larvae of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae). **Arch. Hydrobiol.** v. 149, n. 3, p. 387-401, 2000.

SIBLEY, P. ANKLEY, G.T.; BENOIT, D.A. Factors affecting reproduction and the importance of adults size on reproductive output of the midge *Chironomus tentans*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, n. 6, p. 1296-1303, 2001.

SILVA, A.M. **Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPEIS, M.; REISS, F. Catalog and bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera). **Spixiana** v. 22, p. 61-119, 1996.

STOUGHTON, S.J.; LIBER, K.; CULP, J.; CESSNA, A. Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under constant and pulse exposure conditions. **Arch. Environ. Contam Toxicol.** v. 54, n. 4, p. 662-673, 2008.

STRIXINO, S. T.; STRIXINO, G. **A largura da cabeça na determinação das fases larvais de Chironomidae na Represa do Lobo, São Paulo**. 1973. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.

STRIXINO, S. T. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae)**. 1980. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo.

STRIXINO, G. & STRIXINO, S. T. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Rev. Bras. Zool.** v. 3, n. 4, p. 177-180, 1985.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Is your drinking water safe?** Washington, D.C.: USEPA, 1989. (EPA – 570/9-89-005) p.25.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. 2ed. Washington, D.C.: USEPA, 2000. (EPA – 600-99/064).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Metal mixtures (Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Silver, and Zinc)**, USEPA: Washington, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Statistical Analysis for Biological Methods: Trimmed Spearman-Kärber Method. Version 1.5**. USEPA: Washinton, 2006.

VEDAMANIKAM, V.J.; SHAZILI, N.A.M. Observations of mouthparts deformities in the *Chironomus* larvae exposed to differents concentrations of nine heavy metals. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 91, n.1, p. 57-63, 2009.

VERMEULEN, A.C. Elaborating chironomid deformities as bioindicators of toxic sediment stress: the potencial application of mixture toxicity concepts. **Ann. Zool. Fennici**. v. 32, p. 265-285, 1995.

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

WARWICK, W. F. **The use of morphological deformities in Chironomid larvae for biological effects monitoring**. Canadá: Ministério de Suprimentos e Serviços, 1990.

WATTS, M.M.; PASCOE, J.; CARROLL, K. Exposure to 17 a-ethinylestradiol and bisphenol A – effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 54, p. 207-215, 2003.

WEST, Inc; GULLEY, D. **Toxstat 3.5**. Wyoming, USA: University of Wyoming, 1996.

WISE, R.R.; PIERSTORFF, C.A.; NELSON, S.L.; BURSEK, R.M.; PLUDE, J.L.; MCNELLO, M.; HEIN, J. Morphological deformities in *Chironomus* (Chironomidea: Diptera) larvae as indicator of pollution in lake Winnebago, Wisconsin. **J. Great Lakes Res.** v. 27, n. 4, p. 503-509, 2001.

ZAGATTO, P & BERTOLLETI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006.