



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PERÍCIAS CRIMINAIS AMBIENTAIS

Maria Flavia Barbosa Xavier

Avaliação da Adequação dos Valores Numéricos Definidos nas Tabelas da Resolução 357/05 do CONAMA do Ponto de Vista Técnico e Científico, para Garantir a Preservação dos Ecossistemas.

Florianópolis

2020

Maria Flavia Barbosa Xavier

Maria Flavia Barbosa Xavier

Avaliação da Adequação dos Valores Numéricos Definidos nas Tabelas da Resolução 357/05 do CONAMA do Ponto de Vista Técnico e Científico, para Garantir a Preservação dos Ecossistemas.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Perícia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestra em Perícias Criminais Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Xavier, Maria Flavia Barbosa

Avaliação da Adequação dos Valores Numéricos Definidos nas Tabelas da Resolução 357/05 do CONAMA do Ponto de Vista Técnico e Científico, para Garantir a Preservação dos Ecossistemas. / Maria Flavia Barbosa Xavier ; orientador, Carlos Henrique Lemos Soares, 2020.

70 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Perícias Criminais Ambientais, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Perícias Criminais Ambientais. 2. Ecotoxicologia. 3. Qualidade da água. 4. CONAMA 357. 5. Bioindicadores. I. Soares, Carlos Henrique Lemos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Perícias Criminais Ambientais. III. Título.

Maria Flavia Barbosa Xavier

**Avaliação da Adequação dos Valores Numéricos Definidos nas Tabelas da Resolução
357/05 do CONAMA do Ponto de Vista Técnico e Científico, para Garantir a
Preservação dos Ecossistemas.**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Claus Troger Pich
UFSC - Araranguá

Prof. Dr. Reginaldo Geremias
UFSC – Araranguá

Certificamos que está é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestra em Perícias Criminais Ambientais.

Prof. Dr. Roberto Fabris Goerl
Coordenador do programa

Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares
Orientador

Florianópolis
2020

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada, Professor Carlos Soares pela orientação, amizade e incentivo nesses anos de orientação.

Ivana, sem você muito disso não teria sido possível! Obrigada por me ensinar como fazer os experimentos com toda a paciência e carinho. Obrigada também por me ouvir, me acolher e sempre me incentivar muito. Obrigada pela companhia nos finais de semana no laboratório, pelos chás, pelos bolinhos e por todos os mimos!

Pai e mãe! Muito obrigada por tudo! Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por aguentarem as minhas chatices, minhas reclamações, minhas lágrimas e compartilharem as minhas alegrias também! Obrigada por comemorarem comigo cada experimento que deu certo e por me incentivarem nos momentos em que eu achava que nunca iria terminar o mestrado! Obrigada pelo carinho de adaptarem todos os horários dos finais de semana para ficarem comigo quando eu precisava ir para o lab! E até do lab o papi participou... Muito obrigada! Eu amo vocês!

Lê, Sílvio e Felipe! Muito obrigada por todo amor, carinho e incentivo! Obrigada por entenderem quando não pude estar perto de vocês pois estava fazendo experimentos ou escrevendo.

Pessoal do NEMAR que me acolheu para muitos almoços no RU (RU, muito obrigada pelos almoços!!), que me ajudou quando eu precisei, que trocaram experiências sobre a pós-graduação, meus dias no lab foram mais felizes ao lado de vocês: Alessandra, Kalina, Luísa, Carla, Camila e Ricardo!

Ale e Kalina, obrigada por todas as conversas, conselhos e por me aguentarem até nos meus piores dias! Valeu pela amizade!!

Nayara, sua peste, muito obrigada por toda ajuda com os experimentos, pela companhia no soninho da tarde no sofá e por todas as risadas.

Meus amigos da turma do mestrado, obrigada pela parceria durante as disciplinas! Cris, Michelle e Tania, obrigada por tornarem aquelas semanas de aulas mais leves e animadas!

Gab e Thaís, muito obrigada por toda a amizade e amor! Vocês são muito especiais!

Mari, Fabíola, Leo, Gabi, Bárbara e Tomás muito obrigada por toda amizade desde os tempos da graduação, por todas as nossas saídas que tornam minha vida mais leve e alegre.

Fê, o que teria sido desse mestrado sem você? Obrigada por estar sempre comigo, nos momentos bons e ruins! Você é mais do que uma boa amiga!

Nati, Thay, Day, Elisinha, Gianmi, Jô, Ramon, muito obrigada por toda a parceria e amizade e que mesmo nesses anos de piração vocês estiveram ao meu lado.

Aos tios e tias queridos: Clau, Celso, Ida, Marcos, Regi, Xedes, Márcia, Júlio, Kátia, Paulo muito obrigada por sempre me incentivarem e por sempre estarem presentes em todas as minhas conquistas. Vocês são muito importantes pra mim.

Chloè, minha companheirinha de escrita e algumas vezes de lab! Obrigada por estar sempre me esperando em casa cheia de alegria me fazendo sempre abrir um sorriso!

UFSC, muito obrigada pela oportunidade de estudar mais um tempo aqui.

Professores do MPPA, muito obrigada pela dedicação durante esses anos de mestrado.

“O Homem é a mais insana das espécies, Adora um Deus invisível e mata a Natureza visível... sem perceber que a Natureza que ele mata é o Deus invisível que ele adora.”

Hubert Reeves

RESUMO

A quantidade de água no planeta é limitada e a sua qualidade está em constante pressão. O cuidado e a manutenção desse recurso são de extrema importância para a preservação dos ecossistemas. O objetivo desse trabalho é analisar se os limites para a qualidade dos cursos hídricos estabelecidos pela Resolução 357/2005 do CONAMA são suficientes para garantir a preservação dos ecossistemas e avaliar a necessidade de utilização de diversos organismos nos testes de toxicidade que avaliam essa qualidade. Para tanto seis substâncias abarcadas pela legislação foram escolhidas para realização dos testes. Foram elas: dois agrotóxicos: atrazina e glifosato; dois solventes: benzeno e tolueno; um metal: alumínio; e o grupo fenol, dentro do qual escolheu-se o ácido fênico como modelo. Os testes foram realizados de acordo com protocolos de padrão internacional, seguindo as normas técnicas brasileiras. Os resultados obtidos demonstram uma toxicidade em pelo menos um dos organismos testados para cada substância no valor estipulado pela Resolução. Esses resultados revelam a incapacidade de os indicadores garantirem a qualidade da água e a necessidade da utilização de diferentes organismos para avaliar a qualidade ambiental.

Palavras-chave: CONAMA, Resolução 357/2005, Testes de toxicidade, Qualidade da água.

ABSTRACT

The amount of water on the planet is limited and its quality is under constant pressure. The care and maintenance of this resource are extremely important for the preservation of ecosystems. The objective of this study was to analyze if the limits established by CONAMA Resolution 357/2005 ensures the water quality to guarantee the preservation of ecosystems and to evaluate the need for the use of different organisms in the toxicity tests that evaluate this quality. On this study six substances covered by the legislation were chosen for the tests. They were: two pesticides: atrazine and glyphosate; two solvents: benzene and toluene; one metal: aluminum; and the phenol group, within this group the phenolic acid was chosen as a model. The tests were performed according to standard international protocols following the Brazilian technical norms. The results obtained demonstrate a toxicity in at least one of the organisms tested for each substance in the value stipulated by the Resolution. With this result we can observe the need for a revision in the legislation, because as it is presently, preservation is not guaranteed and confirmed the need to use different organisms to evaluate the environmental quality.

Key words: Resolution 357/2005, toxicity tests, water

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem de uma <i>Daphnia magna</i>	19
Figura 2:Ciclo de vida do <i>Danio rerio</i>	20
Figura 3: Foto da espécie de microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	21
Figura 4: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença da Atrazina.	42
Figura 5: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença de Glifosato.	46
Figura 6: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença do alumínio.	52
Figura 7: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença fenol.	54
Figura 8: Embriões com deformação.....	58
Figura 9: Larva despigmentada.	58
Figura 10: Larvas com curvatura na nadadeira caudal.	58
Figura 11: Larvas com curvatura na coluna vertebral e despigmentadas.....	59
Figura 12: Larvas com edema cardíaco e curvatura na nadadeira caudal.	59
Figura 13: Larvas e embriões normais.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias e concentrações testadas no trabalho.	33
Tabela 2: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.....	43
Tabela 3: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.	43
Tabela 4: Número total de ovos/fêmea de D. rerio exposto a Atrazina no período de 96h.....	43
Tabela 5: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.....	46
Tabela 6: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.	46
Tabela 7: Número de ovos/fêmea de D. rerio exposto Glifosato no período de 96h.	47
Tabela 8: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.	49
Tabela 9: Número de ovos/fêmea de Danio rerio exposto ao Benzeno no período de 96h.....	49
Tabela 10: Número de ovos/fêmea de Danio rerio exposto ao Tolueno no período de 96h. ...	49
Tabela 11: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.....	52
Tabela 12: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.	52
Tabela 13: Número de ovos/fêmea de Danio rerio exposto a Alumínio no período de 96h. ...	53
Tabela 14: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.....	55
Tabela 15: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.	55
Tabela 16: Número de ovos/fêmea de Danio rerio exposto ao Fenol no período de 96h.	55
Tabela 17: Nutrientes e concentrações para a preparação da solução-estoque.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANA	Agência Nacional de Água
APHA	American Public Health Association
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Unites States Environmental Protection Agency
FATMA	Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IMA	Instituto do Meio Ambiente de Santa Catarina
ISO	International Organization for Standartization
NBR	Norma Brasileira
OD	Oxigênio Dissolvido
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	POLUIÇÃO AMBIENTAL.....	15
1.2	ECOTOXICOLOGIA, TOXICIDADE E BIOINDICADORES	16
1.3	MONITORAMENTO AMBIENTAL E LEGISLAÇÃO PERTINENTE	21
1.2	OBJETIVO.....	30
1.2.1	Objetivo Geral:	30
1.2.2	Objetivos Específicos:	30
2	METODOLOGIA.....	32
2.1	ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS	32
2.2	ENSAIO TOXICOLÓGICO COM <i>DAPHNIA MAGNA</i>	33
2.4	ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO COM <i>DANIO RERIO</i>	37
2.4.1	Manutenção dos peixes.	37
2.4.2	Produção de ovos e embriões de <i>Danio rerio</i> (fase 1 e 2)	37
2.4.3	Teste de toxicidade com embriões de peixe FET (fase 1)	38
2.4.4	Teste de reprodução e toxicidade com embriões de <i>Danio rerio</i> (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos	39
2.4.5	Eutanásia dos peixes e larvas dos bioensaios	40
2.5	TESTE ESTATÍSTICO	40
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	RESULTADOS DA ATRAZINA	42
3.1.1	Teste de toxicidade com a microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	42
3.1.2	Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas	43
3.1.3	Teste de reprodução e toxicidade com embriões de <i>Danio rerio</i> (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos	43
3.1.4	Efeitos da Atrazina	44
3.2	RESULTADOS COM GLIFOSATO	45
3.2.1	Teste de toxicidade com a microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	45

3.2.2	<i>Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas.....</i>	46
3.2.3	<i>Teste de reprodução e toxicidade com embriões de Danio rerio (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos.....</i>	46
3.2.4	<i>Efeitos do Glifosato</i>	47
3.3	RESULTADOS COM BENZENO E TOLUENO	48
3.3.1	<i>Teste de toxicidade com a microalga Desmodesmus subspicatus.....</i>	48
3.3.2	<i>Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas.....</i>	49
3.3.3	<i>Teste de reprodução e toxicidade com embriões de Danio rerio (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos.....</i>	49
3.3.4	<i>Efeitos do Benzeno e Tolueno.....</i>	50
3.4	RESULTADOS COM ALUMÍNIO.....	51
3.4.1	<i>Teste de toxicidade com a microalga Desmodesmus subspicatus.....</i>	51
3.4.2	<i>Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas.....</i>	52
3.4.3	<i>Teste de reprodução e toxicidade com embriões de Danio rerio (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos.....</i>	52
3.4.4	<i>Efeitos do Alumínio.....</i>	53
3.5	RESULTADOS DO FENOL	54
3.5.1	<i>Teste de toxicidade com a microalga Desmodesmus subspicatus.....</i>	54
3.5.2	<i>Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas.....</i>	55
3.5.3	<i>Teste de reprodução e toxicidade com embriões de Danio rerio (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos.....</i>	55
3.5.4	<i>Efeitos do Fenol.....</i>	56
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A – MEIOS DE CULTIVO DE <i>DESMODESMUS SUBSPICATUS</i>	69
	ANEXO B – SCORE SHEET FOR SCORING ENDPOINTS IN ZEBRAFISH.	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL

Poluição ambiental é a degradação ambiental direta ou indireta de atividades que possam ser prejudiciais à saúde, segurança e o bem estar de qualquer população (Derísio, 2016).

De acordo com Derísio (2016, p. 7) “A poluição ambiental deve-se à presença, ao lançamento ou à liberação nas águas, no ar ou no solo de toda e qualquer forma de matéria ou energia, com intensidade, quantidade, concentração ou características em desacordo com os padrões de qualidade ambiental estabelecidos por legislação ocasionando, assim, interferência prejudicial aos preponderantes das águas, do ar e do solo.”

A poluição ambiental, em especial a poluição de ecossistemas aquáticos é problema relevante em todo no mundo, pois ela não afeta apenas os organismos aquáticos, mas também a saúde humana (DAI ET AL, 2014).

“Água é essencial para a vida. A quantidade de água fresca na Terra é limitada e a sua qualidade está em constante pressão, por isso preservar a qualidade da água é importante para garantir o fornecimento de água potável, a produção de comida e possibilitar o seu uso recreativo. A qualidade da água pode ser comprometida pela presença de agentes infecciosos, produtos químicos e radiológicos” (*WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018*).

Dados da Agência Nacional de Águas - ANA indicam que é estimado que 97,5% da água existente no mundo é salgada e, portanto, inadequada para o consumo humano e para a irrigação. Dos 2,5% de água doce restantes, 69% é de difícil acesso, porque está concentrada em geleiras, 30% são águas subterrâneas (aquíferos) e apenas 1% encontra-se nos rios.

Rios não se limitam a fronteiras políticas, sendo em muitos casos compartilhados entre dois ou mais países, como é o caso de 82 rios brasileiros. Em virtude disso, a ANA tem vários projetos em execução e outros já executados que se enquadram na tipologia da cooperação técnica internacional, importantes tanto para assegurar o intercâmbio de experiências, quanto para compartilhar conhecimentos sobre o uso e monitoramento das águas.

As transformações sofridas pelas bacias em fase de urbanização podem ocorrer muito rapidamente, gerando transformações na qualidade da paisagem, degradação

ambiental, ocupação irregular e falta de planejamento na gestão urbana (CARDOSO *ET AL.*, 2008).

Com o desenvolvimento das atividades humanas, qualquer curso d'água está sujeito a sofrer alterações que podem comprometer sua qualidade, como por exemplo, o despejo de efluentes sem tratamento, limitando o potencial de uso. Por isso, torna-se importante o monitoramento da qualidade da água, a fim de que possam ser atendidos os requisitos estabelecidos e garantir os usos previstos (TAKI FILHO & SANTOS, 2009).

O monitoramento de um curso d'água é uma importante ferramenta de avaliação que pode contribuir no planejamento, controle, recuperação e preservação dos recursos hídricos

Esse monitoramento também é um mecanismo de avaliação sistemática, podendo contribuir como base para medidas de planejamento, controle, recuperação, preservação e conservação do ambiente em estudo e áreas adjacentes, bem como auxilia na definição das políticas ambientais.

Para Lobo e Callegaro (2000), o monitoramento da qualidade da água inclui tanto o monitoramento físico e químico como o biológico, sendo este último importante porque apresenta uma resposta integrada ao meio ambiente e possibilita a manutenção da comunidade biológica saudável.

Durante décadas, efluentes industriais foram despejados sem nenhum tipo de tratamento, fazendo com que muitos compostos tóxicos se tornassem parte do ecossistema, causando danos diretos e indiretos e alterando vários processos biológicos. A grande mortalidade dos peixes é um exemplo desse dano direto, porém os efeitos mais críticos são aqueles que estão associados à exposição intermitente, mesmo que essas substâncias estejam em pequenas quantidades. (PAIVA, 2004).

1.2 ECOTOXICOLOGIA, TOXICIDADE E BIOINDICADORES

Segundo a *United States Environmental Protection Agency* – EPA, a agência norte americana encarregada da proteção ambiental, a exposição a substâncias só ocorre quando há contato com ela de alguma forma. Esse contato pode ser de diversas maneiras, como por exemplo respirando, comendo, bebendo ou até mesmo o contato direto pela pele.

De acordo com a mesma agência, diversos fatores devem ser levados em consideração para que os efeitos sejam considerados danosos, incluindo a dose, a duração e a maneira de exposição do indivíduo à água contaminada. Além disso, também a exposição cruzada, idade, sexo, estilo de vida, saúde e predisposição genética influenciam.

Baptista indica algumas variáveis que podem afetar a toxicidade de uma substância no ambiente, entre elas:

- Organismos - deve-se conhecer a sua biologia, sua fisiologia, seus hábitos, genética, manutenção e cultivo no laboratório.

- Temperatura – Fator abiótico, que tem uma influência menor que a esperada para organismos picilotérmicos. Algumas vezes essa influência é encontrada com mais efeito no próprio composto que está disperso na água.

- Oxigênio dissolvido (OD) – Há evidências de um aumento na letalidade com o declínio do oxigênio abaixo do nível de saturação.

- pH – Em algumas substâncias, a forma não ionizada pode aumentar a toxicidade e podem se difundir com mais facilidade pelas membranas.

- Dureza – Em águas doces refere-se as concentrações de magnésio e cálcio. Geralmente a alcalinidade, o pH e a dureza aumentam ou diminuem juntos. A maioria dos poluentes não altera sua toxicidade em águas leves ou duras, porém a maioria dos metais apresenta uma toxicidade menor em águas duras (Sprangue, 1990 *apud* Baptista).

- Condutividade – ácidos inorgânicos, sais e bases dissolvidos na água acarretam num aumento da condutividade.

- Salinidade – Provoca efeitos diferentes dependendo da concentração de sal em cada organismo.

- Matéria orgânica – Tem a capacidade de ligar os adsorver poluentes, podendo então diminuir ou aumentar a toxicidade de determinada substância.

A ecotoxicologia estuda os impactos deletérios de poluentes sobre organismos ou ecossistemas e a sua interação com o meio ambiente (MATIAS, 1996 *apud* BRENTANO 2006.) Na ecotoxicologia, o uso de bioindicadores permite a detecção de substâncias em concentrações bem abaixo dos limites de detecção por métodos de análises químicas, pois os seres vivos respondem de forma integrada a todos os agentes perturbadores, incluindo efeitos

produzidos por substâncias novas na água, formadas através de interações água e efluente (KNIE E LOPES, 2004). Daí a sua potencialidade para avaliar a qualidade da água.

A escolha do bioindicador deve levar em conta algumas características do estudo que será realizado, já que um bom bioindicador deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar alguma resistência ao contaminante a que está exposto. (AKAISHI, 2004).

Bioindicadores podem ser organismos ou comunidades, têm as suas funções diretamente relacionadas a fatores ambientais e podem prover muitas características sobre a qualidade de um ecossistema (BAPTISTA, 2001).

Organismos pertencentes ao topo da cadeia alimentar são comumente utilizados por possuírem intrínseca relação com toda a cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo.

Quando se trata de ambientes aquáticos, plantas aquáticas, algas, crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos, aves, podem ser alvos de estudos, podendo então ser considerados bioindicadores.

Os microcrustáceos podem ser consumidores primários ou secundários, são componentes do zooplâncton e são importantes para a ligação de níveis tróficos superiores e inferiores (ZAGGATO, 1999 *apud* BAPTISTA).

Levando-se em conta todos esses fatores, o estudo descrito nessa dissertação desenvolveu-se utilizando três bioindicadores: o microcrustáceo *Daphnia magna*, o peixe *Danio rerio* e a microalga *Desmodesmus subspicatus*.

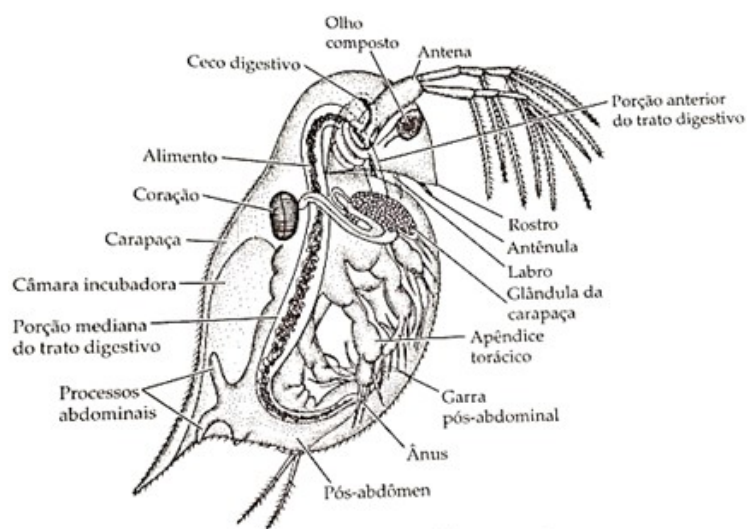
A *Daphnia magna* é um microcrustáceo pertencente ao Filo Arthropoda e da ordem Cladocera. Os cladóceros são conhecidos como pulgas-d'água (BRUSCA, 2007).

Segundo a EPA, as daphnias (figura 1) são sensíveis a substâncias tóxicas, possuem um tamanho relativamente grande, são de fácil identificação, estão disponíveis comercialmente e em laboratórios, são de fácil manuseio e por isso são amplamente utilizadas e recomendadas em testes de toxicidade.

As daphnias (figura 1) possuem uma extremidade alongada, onde a cabeça fica mais estreita; nessa porção encontram-se um par de olhos compostos e duas antenas ramificadas, normalmente maiores ou iguais a metade do comprimento do corpo; os membros são em

forma de folhas inseridas na carapaça que originam uma corrente de água que transporta oxigênio e alimento para as brânquias e boca. Os machos são menores que as fêmeas, têm o pós-abdômen modificado, antenas maiores e as primeiras pernas apresentam o formato de gancho (BAPTISTA, 2001).

Figura 1: Imagem de uma *Daphnia magna*.



Fonte Brusca & Brusca, 2008

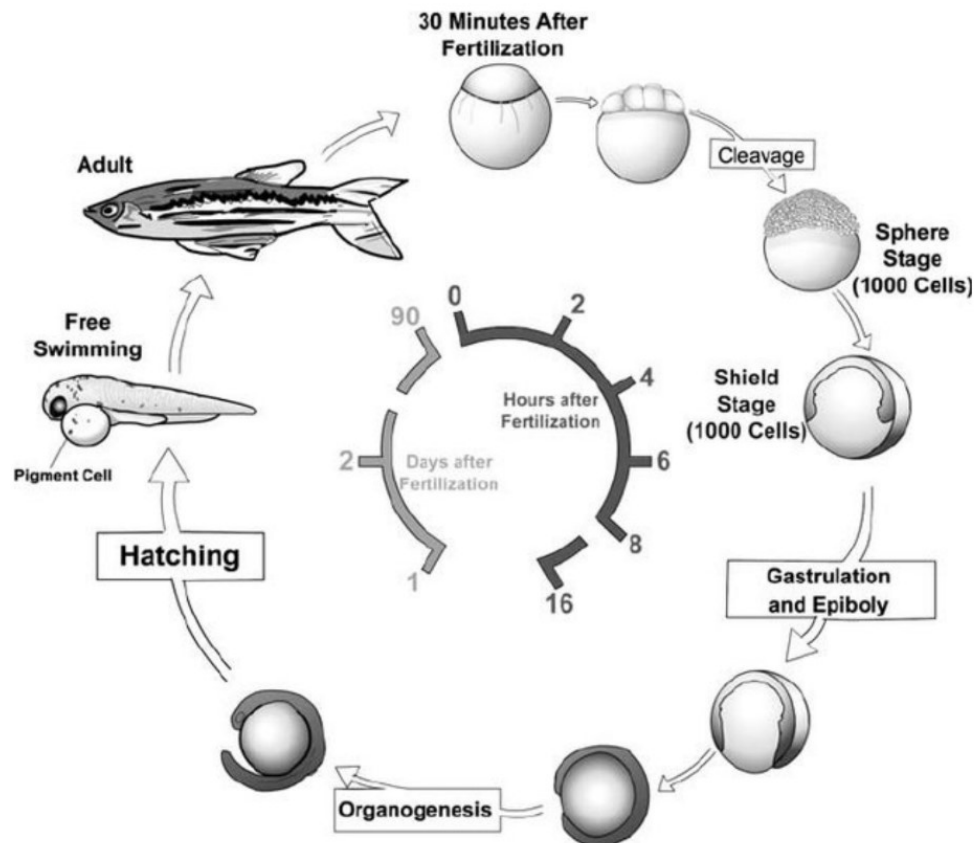
As daphnias se reproduzem por partenogênese, ou seja, reprodução sem fecundação, assexuada, promovendo geração de clones, portanto, fêmeas. Quando expostas a estressores, alguns dos ovos geram machos e as fêmeas produzem ovos haploides que podem servir para a reprodução sexuada, com fecundação. Os ovos quando fertilizados produzem um ovo efípio, um embrião envolto por uma carapaça escura e quitinosa, tornando-os mais resistentes a ambientes estressados e que por isso devem ser descartados para testes de toxicidade (BAPTISTA, 2001).

O segundo bioindicador utilizado, peixes da espécie *Danio rerio*, também são amplamente utilizados em testes ecotoxicológicos, pois são baratos e de fácil manipulação e manutenção em cativeiro. Esses peixes são popularmente conhecidos como paulistinhas ou como “zebrafish”. São peixes teleóstes, ou seja, tem ossos, são da família dos ciprinídeos e nativos de locais tropicais como Himalaia, Índia, Nepal, Paquistão e Myanmar (KHAN & ALHEWAIIRINI, 2018).

De acordo com Khan et al, 2018, o paulistinha foi usado pela primeira vez em 1970, na Universidade de Oregon, porque ele era mais simples de manipular e geneticamente mais fácil que os ratos, porém apenas nos anos de 1990 ele ganhou destaque para o seu uso atual, quando foi utilizado por um ganhador do prêmio Nobel para desenvolver dois mutantes dessa espécie.

Esses peixes são muito úteis para os pesquisadores, pois atingem a maturidade sexual rapidamente, em aproximadamente 10 semanas, possuem alta taxa de fecundidade, além de terem um rápido desenvolvimento embrionário fora do corpo da mãe. Além disso são de fácil observação, pois o ovo é transparente. Com apenas 18 horas as orelhas, olhos, músculos e cérebro já estão bem desenvolvidos; com 24 horas a segmentação já está completa e os primeiros órgãos formados; com 72 horas o embrião já está fora do ovo, e com 5 dias de vida já é capaz de caçar a sua própria comida (KHAN & ALHEWAIRINI, 2018).

Figura 2: Ciclo de vida do *Danio rerio*.



Fonte: Iain Shepherd, 2009.

Finalmente, o terceiro bioindicador, a microalga *Desmodesmus subspicatus* integra o grupo das clorofíceas da família Scenedesmaceae e são uma colônia de duas ou quatro células unicelulares dispostas de forma linear (SANT'ANNA *ET AL.*, 2012).

De acordo com Knie & Lopes, essas algas verdes presentes no plâncton são produtores nos ecossistemas de água doce, servem de alimento para várias outras espécies e participam de ciclos biogeoquímicos, ajudando assim na manutenção desses ecossistemas.

Figura 3: Foto da espécie de microalga *Desmodesmus subspicatus*.



Fonte: Acervo pessoal

Os ensaios toxicológicos possibilitam uma avaliação muito segura do potencial tóxico de substâncias ou de meios contaminados, permitindo também deduções indiretas do seu risco para o meio ambiente, razão pela qual os ensaios toxicológicos são ótimas ferramentas para tomar decisões em relação a preservação da biota aquática. (BRENTANO, 2006)

Assim, como alternativa para complementação da caracterização física e química de efluentes, recomenda-se a avaliação toxicológica (ZAGATTO *ET AL.*, 1988).

Para Azevedo e Chasin (2003), nos estudos de ecotoxicidade são avaliados efeitos agudos (letalidade e imobilidade) e crônicos (alteração no crescimento, reprodução e sobrevivência), o que auxilia na tomada de decisões para a formulação de políticas públicas e também, deve-se considerar organismos em diferentes estágios de desenvolvimento, segundo Pomati et al. (2007), organismos em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser afetados, e os efeitos deletérios potenciais podem ser avaliados através de testes de toxicidade, usando os mais variados organismos teste.

1.3 MONITORAMENTO AMBIENTAL E LEGISLAÇÃO PERTINENTE

O monitoramento realizado através de parâmetros físicos e químicos, quando complementado pelo monitoramento ecotoxicológico, permite avaliar de forma mais abrangente corpos d'água complexos, já que o resultado do teste ecotoxicológico baseia-se na resposta da biota ao conjunto de substâncias que compõe o meio aquático (BRENTANO E LOBO, 2003).

No Brasil o monitoramento dos cursos hídricos é feito pela a Agência Nacional de Águas - ANA, com base nos dados fornecidos pelos órgãos estaduais gestores de recursos hídricos.

O controle de efluentes por meio de análises químicas é realizado desde 1976 pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, o primeiro órgão brasileiro a realizar tais estudos de forma sistemática, mas suas análises abrangem apenas o estado de São Paulo.

Foi apenas em 1986, dez anos depois, já em um contexto mais avançado de urbanização brasileiro, que o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, órgão colegiado brasileiro responsável pela adoção de medidas de natureza consultiva e deliberativa acerca do Sistema Nacional do Meio Ambiente, publicou a primeira Resolução brasileira sobre o tema.

A Resolução CONAMA nº 20 de 18 de junho de 1986, foi a que primeiro buscou estabelecer um sistema de classificação da qualidade da água brasileira. Esta Resolução foi substituída pela Resolução CONAMA 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, e dá outras providências” (CONAMA, Resolução 357, Ementa).

Os padrões de análise indicados nas Resoluções do CONAMA baseiam-se geralmente em padrões estabelecidos por órgãos norte-americanos, especialmente pela EPA. Contudo, em 1976 ainda não se podia imaginar que apenas os limites individuais das substâncias seriam insuficientes para a preservação da vida (CETESB, 2013).

Ainda que as abordagens brasileiras e norte-americanas tenham sido diferentes, ambas mostraram a necessidade de tratamento dos efluentes líquidos, pois a experiência dos

Estados Unidos mostrou que mesmo depois do tratamento os efluentes não estavam imunes de provocar efeitos tóxicos aos organismos da biota aquática (CETESB, 2013).

Ainda de acordo com a CETESB, em ecossistemas aquáticos, a presença de agentes químicos irá sempre representar um risco à biota, inexistindo até o momento um limite seguro para a exposição dos organismos para que não ocorram efeitos tóxicos. Desta forma qualquer legislação tenderá a ser parcialmente ineficaz na eliminação da contaminação, mas é melhor existir uma legislação, ainda que fraca, do que inexistir controle.

A Resolução 20/86 durante quase 20 anos foi a principal norma reguladora da qualidade da água no Brasil, e obedecia às diretrizes da então vigente Política Nacional do Meio Ambiente - PNMA, estabelecida pela Lei nº 6938 de 31 de agosto de 1981. Contudo, ao longo do tempo em que foi utilizada, conforme aponta Pizella (2007) foi apresentada incongruências, relacionadas ao padrão de qualidade, pois alguns eram muito restritivos perante a capacidade tecnológica brasileira, e outros muito permissivos diante da qualidade ambiental necessária

A promulgação da Constituição da República Federativa do Brasil, em 1988, foi mais um gatilho para a edição de nova resolução. Ao estabelecer em seu Artigo 225 que “todos têm direito ao meio ambiental ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”, a Constituição criou maiores obrigações ao Poder Público para a proteção e garantia de um meio ambiente sadio e equilibrado, ensejando novas normativas nessa direção.

A PNMA foi recepcionada pela nova Constituição naquilo que era com ela compatível, e a edição de nova Resolução com conformidade com a Constituição levou, segundo Pizella (2007), as novas determinações em relação à proibição de lançamentos de fontes poluidoras em níveis nocivos a qualquer forma de vida.

As modificações mais relevantes ocorreram nos padrões químicos, como a adição de 19 parâmetros, e alteração nos níveis de outros já existentes. A maioria dos parâmetros, contudo, manteve seus níveis anteriores (PIZELLA, 2007).

Para mensurar os coliformes termotolerantes, foram exigidas coletas bimestrais e não há flexibilização dos valores limites. Nos parâmetros biológicos, a densidade das cianobactérias foi adicionada, pois essas têm grande importância na avaliação trófica dos

ambientes aquáticos. Os parâmetros físico-químicos como DBO, pH, O.D. não sofreram modificações (PIZELLA, 2007).

As alterações implementadas levaram em consideração países como Austrália e Estados Unidos que têm objetivos mais rigorosos na mensuração da qualidade ambiental. A África do Sul também foi utilizada como exemplo, pois possui uma realidade social mais próxima da nossa (PIZELLA, 2007).

Novas demandas resultaram na edição, da Resolução CONAMA 430 de 13 de maio de 2011, que “Dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA” (CONAMA, Resolução 430, Ementa).

Entre diversas alterações constantes da nova resolução, uma tem especial relevância para este trabalho. O artigo 8º da Resolução n. 357/05, em seus parágrafos 3º e 4º prevê:

§ 3º A qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas. § 4º As possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos ou outros métodos cientificamente reconhecidos.

A Resolução nº 430 veio detalhar esses critérios, conforme se observa da redação de seu Artigo 18:

Art. 18. O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

*§ 1º Os critérios de ecotoxicidade previstos no caput deste artigo devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos **de pelo menos dois níveis tróficos diferentes** (grifo da autora).*

§ 2º Cabe ao órgão ambiental competente a especificação das vazões de referência do efluente e do corpo receptor a serem consideradas no cálculo da Concentração do Efluente no Corpo Receptor-CECR, **além dos organismos e dos métodos de ensaio a serem utilizados, bem como a frequência de eventual monitoramento.** (grifo da autora)

§ 3º Na ausência de critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental para avaliar o efeito tóxico do efluente no corpo receptor, as seguintes diretrizes devem ser obedecidas:

I - para efluentes lançados em corpos receptores de água doce Classes 1 e 2, e águas salinas e salobras Classe 1, a Concentração do Efluente no Corpo Receptor-CECR deve ser menor ou igual à Concentração de Efeito Não Observado-CENO de pelo menos dois níveis tróficos, ou seja: a) CECR deve ser menor ou igual a CENO quando for realizado teste de ecotoxicidade para medir o efeito tóxico crônico; ou b) CECR deve ser menor ou igual ao valor da Concentração Letal Mediana (CL50) dividida por 10; ou menor ou igual a 30 dividido pelo Fator de Toxicidade (FT) quando for realizado teste de ecotoxicidade para medir o efeito tóxico agudo;

II - para efluentes lançados em corpos receptores de água doce Classe 3, e águas salinas e salobras Classe 2, a Concentração do Efluente no Corpo Receptor-CECR deve ser menor ou igual à concentração que não causa efeito agudo aos organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos, ou seja: a) CECR deve ser menor ou igual ao valor da Concentração Letal Mediana-CL50 dividida por 3 ou menor ou igual a 100 dividido pelo Fator de Toxicidade-FT, quando for realizado teste de ecotoxicidade aguda.

§ 4º A critério do órgão ambiental, com base na avaliação dos resultados de série histórica, poderá ser reduzido o número de níveis tróficos utilizados para os testes de ecotoxicidade, para fins de monitoramento.

§ 5º Nos corpos de água em que as condições e padrões de qualidade previstos na Resolução nº 357, de 2005, não incluam restrições de toxicidade a organismos aquáticos não se aplicam os parágrafos anteriores.

Existem efeitos tóxicos remanescentes mesmo após o tratamento dos efluentes, e, como hoje se sabe, somente os ensaios ecotoxicológicos são capazes de caracterizar mais

precisamente os efluentes líquidos, levando também em consideração as interações entre as substâncias químicas (CETESB, 2013).

Esses ensaios são determinados pelos órgãos ambientais estaduais, como o Instituto do Meio Ambiente – IMA, em Santa Catarina.

Para o IMA, a toxicidade aguda, que mede apenas a morte do indivíduo, é suficiente para mensurar a qualidade da água do corpo hídrico. E são determinados valores para dois organismos, um microcrustáceo (*Daphnia magna*) e uma bactéria (*Vibrio fisheri*).

Para a definição dos valores limites nas Tabelas da Resolução do CONAMA, são ou foram utilizados valores obtidos em testes de toxicidade aguda, cuja referência é a morte dos organismos. Contudo, as análises baseadas apenas na mortalidade são insuficientes para análise dos efluentes, considera apenas a morte dos indivíduos em um período muito curto, por exemplo, 48h e 96h, desconsiderando-se os danos que eles podem causar em longo prazo. Um exemplo disso são alguns desreguladores hormonais, que não apresentam efeito tóxico agudo para os organismos, mas podem causar efeitos nocivos aos seres vivos.

Portanto, apesar dos avanços obtidos na legislação vigente, ela não pode ser considerada completa e suficiente, pois deve-se levar em conta o resultado de diferentes testes de toxicidade aguda e crônica, realizados com organismos de diferentes níveis tróficos, para estabelecer índices adequados relativos à concentração de certos compostos nos corpos hídricos.

Outro problema a ser considerado diz respeito à complexidade dos procedimentos de análise, que comumente envolve mais de um órgão ou entidade, e diferentes padrões de atuação para cada etapa, como se observa a seguir:

A resolução n^o 357 do CONAMA regula os efluentes, mas não é competente para autorizar a liberação de certos produtos químicos, por exemplo agrotóxicos, cuja competência é da Anvisa, com base em parecer técnico do IBAMA. Assim, a liberação de um agrotóxico, por exemplo, depende de autorização e expedição de licença da Anvisa, que previamente solicita ao registrante diversos testes ecotoxicológicos, toxicológicos e físico-químicos cujos resultados compõem um relatório que servirá de base para a concessão ou não da licença. A partir desse relatório, segundo o IBAMA, é possível conhecer os produtos e os seus respectivos danos aos diferentes organismos.

É importante salientar que os testes devem ser feitos com organismos padronizados internacionalmente, pois assim existe base para a comparação dos efeitos adversos nos diferentes produtos avaliados nacional e internacionalmente. Porém, em algumas situações, fatores de proteção adicionais são necessários para a proteção de espécies endêmicas.

Segundo o próprio órgão, as diretrizes e portarias estabelecem critérios que permitem a utilização segura, como forma de manter a qualidade dos recursos naturais, e para isso é necessário que seja conhecido como o produto se comporta e qual o seu destino ambiental.

Para que se possa acompanhar a evolução do processo de avaliação da qualidade da água, é importante que se conheça, ainda que superficialmente, o histórico da realização de exigência de realização de avaliação ambiental realizada pela IBAMA, dos produtos agrotóxicos e seus componentes.

Em 1984, algumas instituições e técnicos governamentais se reuniram para discutir a avaliação de ecotoxicidade em agentes químicos e destas reuniões resultou um manual de orientação. Porém, apenas em julho de 1989, com a promulgação da Lei nº 7.802, iniciou-se a exigência da realização da avaliação ambiental dos produtos agrotóxicos e seus componentes da concessão do registro.

Em 1990, surgiu a primeira portaria que estabelecia os procedimentos e requisitos para a avaliação ambiental.

Em 1996, uma nova portaria entrou em vigor e criou-se o Sistema Permanente de Avaliação e Controle dos Agrotóxicos, seus componentes e afins. Essa avaliação abrange a classificação do potencial de periculosidade ambiental (PPA), estudo de conformidade, avaliação de risco ambiental (ARA), divulgação de informações, monitoramento ambiental e fiscalização (PORTARIA NORMATIVA Nº 84, DE 15 DE OUTUBRO DE 1996).

Somente em 2001, com a edição no mês de abril de uma nova Portaria, passou a ser exigido que os laboratórios que realizam esses estudos de avaliação e controle de agrotóxicos estejam em conformidade com as Boas Práticas Laboratoriais (BPL).

Em 2017, o risco de extinção das abelhas provocou um alerta que resultou na produção de um manual que indica a necessidade de conduzir testes mais específicos relativo ao risco do uso de agrotóxicos a esses animais que não são alvos do uso dessas substâncias.

1.4 JUSTIFICATIVAS PARA O DESENVOLVIMENTO DA DISSERTAÇÃO E SUBSTÂNCIAS ESCOLHIDAS

Para avaliar o comportamento dos organismos frente aos compostos químicos de origem petroquímica, agrícola e indústrias de papel e celulose, alguns compostos foram escolhidos de acordo com a abundância/frequência com que são utilizados, para compor uma amostra que permita traçar um comportamento abrangente dos organismos frente a esses despejos.

As seis substâncias escolhidas foram: dois agrotóxicos, atrazina e glifosato; um metal, o alumínio; dois solventes, o benzeno e o tolueno; e um fenol, o ácido fênico.

De acordo com o Relatório Anual do IBAMA sobre comercialização de agrotóxico do ano de 2018, atualizado no dia 03/10/2019, o ingrediente ativo mais vendido no Brasil foi o Glifosato e os seus sais, ficando a Atrazina em 4º lugar no volume de vendas. Ambos são, portanto, agrotóxicos largamente utilizados no país.

A atrazina, segundo o Ministério da Agricultura e da Pesca, pertence aos grupos das triazinas e é classificada com um herbicida, com classificação toxicológica III, o que significa que ele é medianamente tóxico e pode ser empregado pré e pós situações de emergência nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, milheto, pinus, seringueira, sisal e sogro.

Existem 58 produtos com essa substância registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Embora seu uso já tenha sido banido em vários outros países, o Brasil continua no topo da lista dos consumidores desse pesticida. Na União Europeia, o limite máximo permitido na água é de 0,1µg/L, já no Brasil, esse limite é 20 vezes maior, esse valor é de 2µg/L (Resolução CONAMA 357/2004).

Segundo o professor Luiz Marques da UNICAMP (Atlas do envenenamento alimentar no Brasil. Jornal da Unicamp, 2017), a atrazina afeta a fotossíntese e é considerada um perturbador endócrino, podendo ser encontrada tanto em alimentos *in natura* quanto em alimentos industriais processados.

O Ministério da Agricultura e da Pesca registra que o glifosato pertence aos grupos das glicinas substituídas, classificado com um herbicida, com classificação toxicológica IV, o que significa que ele é pouco tóxico e pode ser empregado para diversas finalidades: na

aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, ameixa, amendoim, arroz, banana, batata-doce, batata-yacon, beterraba, caju, caqui, cacau, café, cana-de-açúcar, cará, carambola, cenoura, citros, coco, ervilha, feijão, feijão-caupi, figo, fumo, grão-de-bico, gengibre, goiaba, inhame, lentilha, maçã, mamão, mandioca, mandioquinha-salsa, mangaba, milho, nabo, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, rabanete, seringueira, soja, trigo e uva; aplicação como maturador de cana-de-açúcar; na aplicação para eliminação de soqueira no cultivo de arroz e cana-de-açúcar; na aplicação em pós-emergência das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus; na aplicação para o controle da rebrota do eucalipto, e por última, mas não menos importante, na aplicação como dessecante nas culturas de aveia preta, azevém e soja.

Existem 137 produtos com essa substância registrados na ANVISA.

O glifosato é classificado como um herbicida sistêmico não seletivo, ou seja, ele mata qualquer tipo de planta. No Brasil, ele é amplamente utilizado no cultivo das sojas e milho transgênicos, pois essas plantas são resistentes a esse agrotóxico (QUEIROZ *ET AL*, 2009).

Benzeno e tolueno foram os dois solventes escolhidos para análise. Ambos são encontrados na fabricação de tintas, solventes e na composição da gasolina. Eles são facilmente encontrados no ar devido à queima de combustíveis de veículos e carvão e não são encontrados naturalmente em animais ou plantas (ATSDR).

Tanto o benzeno como o tolueno são reconhecidos por seus potenciais carcinogênicos por várias organizações internacionais, como IARC, ATSDR e EPA.

Quando se trata de potenciais carcinogênicos, não há uma previsão de como o composto se comportará, pois isso depende de como a célula que sofreu a mutação vai responder durante o seu desenvolvimento.

O alumínio foi escolhido porque ele é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre (IARC, 2005) e, dentre os metais, aquele que existe em maior quantidade. (Rangel, 2007). O alumínio nunca é encontrado na sua forma pura, estando sempre combinado com algum outro elemento (EPA, 2020). Pode ser encontrado em ambientes aquáticos naturais, como nas rochas, quando então é chamado de hidróxido de alumínio, popularmente conhecido como bauxita (IARC), além de também ser detectado em produtos de origem

industrial. Ele é utilizado em estações de tratamento de esgoto, na forma de sulfato de alumínio, no processo de floculação (CASAN).

Segundo Baptista, 2001, a análise de metais nos ecossistemas aquáticos é de extrema importância, pois a grande maioria dos metais mostra efeitos tóxicos em alguma concentração, inclusive aqueles metais que são considerados micronutrientes.

De acordo com a EPA, o fato de o alumínio ser encontrado de forma abundante na natureza implica em que sempre haverá algum tipo de exposição a ele, por isso, nesse caso específico, a dose sempre será um fator muito importante.

A concentração do alumínio em águas naturais geralmente é menor que 100µg/L (EPA) sendo este o limite máximo permitido pela Resolução CONAMA 357 para essa substância no Brasil.

Finalmente, o grupo dos fenóis possui diferentes compostos. Geralmente em temperatura ambiente são encontrados em forma de cristais sólidos, com exceção do orto clorofenol, que é líquido (ULF *ET AL.*, 1980).

Esses compostos são amplamente utilizados como desinfetantes, antissépticos, fungicidas, bactericidas, preservativos de madeira, herbicidas e inseticidas (Exon, J, 1982), além de terem uso também na fabricação de plásticos (ATSDR, 2008).

Na classificação da EPA, os fenóis estão no grupo D, o que significa que não são classificados como carcinogênicos.

No grupo dos fenóis, foi escolhido o ácido fênico (fenol) como o seu representante para usá-lo como modelo para os demais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a adequação e pertinência dos valores numéricos definidos nas tabelas da Resolução CONAMA nº 357/2005, do ponto de vista técnico e científico, para garantir a preservação dos diversos ecossistemas e mostrar a necessidade da utilização de organismos de diferentes níveis tróficos em testes de toxicidade.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- Realizar o teste de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*.

- Avaliar os efeitos deletérios dos compostos escolhidos em microcrustáceos *Daphnia magna* através de testes de toxicidade agudo e crônico.

- Analisar o desenvolvimento dos embriões de peixes *Danio rerio*, expostos aos compostos selecionados, nos testes de reprodução e exposição dos ovos.

- Comparar os resultados encontrados com a legislação vigente, Resolução CONAMA nº 357/2005, confrontando os limites por ela estipulados.

- Validar a necessidade da utilização de parâmetros biológicos de organismos de diferentes níveis tróficos no monitoramento da qualidade de recursos hídricos.

2 METODOLOGIA

2.1 ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS

A Resolução CONAMA 357/2005 prevê condições e padrões para o lançamento de efluentes em corpos hídricos. Dentro das substâncias estabelecidas, seis foram escolhidas para serem testadas e avaliadas nesse trabalho. Foram escolhidos dois solventes, dois agrotóxicos, um metal e uma substância do grupo fenol.

Os dois solventes são o benzeno e o tolueno, amplamente utilizados como solventes para derivados do petróleo, como matéria-prima nas indústrias químicas, nas indústrias petroquímicas, de refino de petróleo e nas indústrias siderúrgicas.

Os dois agrotóxicos são a atrazina e o glifosato. Os mais utilizados nos cultivos brasileiros. Segundo a EMBRAPA, a atrazina é o segundo agrotóxico mais utilizado no Brasil. O glifosato está em meio a muitas disputas judiciais quanto ao seu uso, pois em muitos países, a sua utilização já foi proibida e no Brasil há a discussão de aumentar o seu limite tolerável para o uso.

O metal escolhido foi o alumínio, pois a sua frequência de uso é bem alta. Ele é utilizado tanto no uso doméstico quanto industrial. Pode ser amplamente encontrado em mananciais hídricos.

A última substância escolhida foi uma do grupo fenol, essa substância foi o ácido fênico. Ela foi escolhida para ser utilizada como modelo dentro desse grupo. Os fenóis são utilizados na indústria de papel e celulose, petroquímica, tintas e vernizes, produtos agrícolas e materiais de limpeza doméstica.

Todas as substâncias foram testadas em três concentrações diferentes. A concentração determinada pela Resolução CONAMA 357/2004, uma concentração abaixo e uma concentração acima dos limites estabelecidos pela resolução e que não fosse letal aos organismos.

As concentrações testadas foram as seguintes:

Tabela 1: Substâncias e concentrações testadas no trabalho.

Substância	Concentração abaixo (A)	CONAMA (B)	Concentração acima (C)
Benzeno	3,75µg/L	5µg/L	7,5µg/L
Tolueno	1µg/L	2µg/L	3µ/L
Glifosato	32,5µg/L	65µg/L	97,5µg/L
Atrazina*	2µg/L	3µg/L	4µg/L
Alumínio	75µg/L	100 µg/L	200 µg/L
Fenol	2,25µg/L	3 µg/L	4,5 µg/L

Fonte: Criado pela autora.

* Por um equívoco na hora da coleta de dados, essa substância, atrazina, possui duas concentrações acima do valor do CONAMA, valor do CONAMA = 2µg/L, e não uma abaixo e uma acima como todas as outras.

Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foram realizados segundo a NBR 12.713 (ABNT, 2003a) em triplicata, para a obtenção dos resultados foram utilizadas as médias. Para esse teste foram testadas as seguintes substâncias atrazina, glifosato, benzeno e tolueno. O teste de toxicidade crônica foi realizado em quadruplicata e para obtenção dos resultados foram utilizadas as médias. Para esse teste foram testados apenas a atrazina e o glifosato.

Os bioensaios com *Desmodesmus subspicatus* foram realizados de acordo com ISO 8692 (ISO, 2012) em sextuplicata, para a obtenção dos resultados, foram utilizadas as médias. Todas as substâncias escolhidas participaram desse ensaio.

2.2 ENSAIO TOXICOLÓGICO COM *Daphnia magna*

2.2.1 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com o protocolo OECD 202 (2004) e a NBR 12.713 (ABNT, 2003a). O método de ensaio consistiu na exposição de

indivíduos jovens (2 a 24 horas de idade) do organismo-teste (*Daphnia magna*) por um período de 24h a 48h, em temperatura entre 18°C e 22°C , fotoperíodo de 12horas e sem alimentação.

Os resultados obtidos dos testes de toxicidade aguda e nos testes com a substância de referência (dicromato de potássio) foram utilizados no cálculo das CE50. A concentração efetiva média (CE50) que provocou efeito agudo em 50% dos organismos no período de teste foram estimadas com o programa estatístico Trimmed Spearman – Karber (HAMILTON et al., 1977).

Todos os procedimentos relativos ao cultivo dos organismos e a sua manipulação refletem na sua sensibilidade, cuja estabilidade é essencial para a confiabilidade dos resultados dos testes.

O resultado de um ensaio de toxicidade é considerado aceitável se a sensibilidade do organismo teste à substância de referência estiver dentro dos limites estabelecidos pela carta-controle, obtida pela média da CIP ou CE₅₀ de um determinado número de ensaios ± 2 desvios padrão (ABNT, 2009).

Para a *Daphnia magna* a norma ISO 6341 recomenda dicromato de potássio como substância de referência, sendo os valores limites de sensibilidade na faixa de 0,6 a 1,7 mg. L⁻¹ de CE50 em 24 horas e 0,6 a 0,7 mg.L⁻¹ de CE50 em 48 horas (KNIE; LOPES, 2004).

Nos testes de sensibilidade com *Daphnia magna* foi utilizado dicromato de potássio reagente comercial como substância de referência com pureza de 99,9% ou superior e dentro da validade.

Os organismos foram expostos a concentrações crescentes do dicromato de potássio (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg.L⁻¹), em duas réplicas de cada concentração, a fim de obter o valor de CE50. As diluições foram preparadas a partir da adição de volumes conhecidos de uma solução-estoque de 10 mg.L⁻¹.

Os testes com dicromato de potássio foram realizados uma semana antes dos ensaios de toxicidade aguda e crônica com as amostras de água.

A faixa aceitável de CE (I) 50, para o dicromato de potássio, deve estar entre 0,6 a 1,7 mg/l. O valor médio obtido de CE (I) 50 para os testes de sensibilidade (24 horas) foi de 1,05 mg/l, portanto, os resultados das CE (I) 50 dos testes de sensibilidade apresentaram-se dentro da faixa aceitável para o dicromato de potássio.

De acordo com a ISO 6341 as daphnias cultivadas no laboratório de Ecotoxicologia (CCB/UFC) estavam aptas para serem utilizadas nos testes de toxicidade (aguda e crônica) com as amostras das soluções testes.

2.2.2 Teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*

O microcrustáceo *Daphnia magna*, cladóceros de águas continentais, constitui importante ferramenta em estudos de avaliação ambiental (Gillis et al., 2005), por ser de fácil cultivo, rápido crescimento e fornecer respostas importantes em curto período de exposição.

Os testes de reprodução foram realizados segundo a norma OECD211 (2012), os ensaios crônicos com *Daphnia magna* são realizados em um período de 21 dias, com fluxo semi-estático, visando uma avaliação geral do desempenho reprodutivo das fêmeas, como um indicativo de contaminação ambiental, cobrindo todo o ciclo do organismo.

O método consistiu na exposição dos organismos jovens (menos de 24h de vida) da espécie *Daphnia magna*, obtidos a partir da quarta postura de fêmeas cultivadas (para cada ensaio utilizou-se filhotes de uma *Daphnia magna*), as amostras de água em estudo, por um período de 21 dias.

Foram acrescentados os meios nutritivos de cultivo das daphnias às amostras de água, para garantir a sobrevivência dos organismos durante os 21 dias dos experimentos.

Os organismos foram alimentados com algas *Scenedesmus subspicatus* (Chodat, 1942), aproximadamente 10^6 células.mL⁻¹ por organismo adulto, diariamente, ou com intervalo de no máximo dois dias consecutivos.

A manutenção dos testes foi realizada 3 vezes por semana, sendo que na manutenção substituía-se a solução-teste antiga por uma nova solução de ABT.

Os parâmetros analisados durante o teste crônico tiveram como objetivo avaliar os efeitos das diferentes amostras de água sobre as daphnias, dois parâmetros foram analisados na execução do teste: fecundidade da daphnia-mãe e morfologia dos filhotes.

A fecundidade foi avaliada pela contagem dos neonatos gerados pelas daphnias-mãe no período de 21 dias. Utilizou-se como parâmetro a média dos filhotes gerados por fêmea, considerando-se o número total de posturas ao longo dos 21 dias de duração dos testes.

A ocorrência de alterações morfológicas nos organismos foi um parâmetro de caráter qualitativo, sendo este avaliado ao final dos 21 dias dos testes, através de visualizações ao microscópio óptico e lupa.

2.3 ENSAIO TOXICOLÓGICO COM *Desmodesmus subspicatus*

Os bioensaios com *Desmodesmus subspicatus* foram realizados de acordo com OECD 201/1984, ISO 8692 (ISO, 2012) em sextuplicata, para a obtenção dos resultados foram utilizadas as médias.

Para o teste utiliza-se a alga cloroficea *Desmodesmus subspicatus*, organismo produtor primário, existente em águas doces. O método é aplicado para determinação de efeitos algistáticos em amostras ambientais e/ou produtos químicos.

A base de avaliação para este teste é a comparação da multiplicação das células da alga (taxa de crescimento) em soluções-teste nas condições de ensaio com aquelas de controle, que não contém a amostra a ser testada. Isso pressupõe que o teste seja iniciado com um determinado número de algas e que após seu término seja feita nova medida.

Para obtenção do resultado observa-se o crescimento através da contagem celular, por espectrometria, a 720 nm, medindo-se a porcentagem da transmitância, a qual é proporcional ao número de células em suspensão.

O inóculo do ensaio requer uma concentração inicial de células de aproximadamente 105 células por milímetro². As amostras foram encubadas por 96h, a temperatura de 23±2°C, e iluminação constante de 2000 lux e agitação contínua por aeradores.

A preparação do meio de cultivo para as algas, pode ser encontrada no anexo A deste documento.

Medida da transmitância: 1 ml foi colocado na cubeta de quartzo em espectrofotômetro digital UV-VIS, em comprimento de onda de 720nm para leitura óptica. Para cada amostra foi feito um respectivo branco, com o objetivo de zerar o aparelho.

Taxa de crescimento algal (TCA): o valor da transmitância inicial (T₀) foi subtraído dos valores das transmitâncias obtidas em 24h, 48h, 72h e 96h, obtendo-se o valor da taxa de crescimento da massa algal, nas diferentes amostras testadas.

$$\text{Taxa de crescimento} = \frac{NT - N0}{TN}$$

Onde:

* NT = Concentração de células no tempo de crescimento

* N0 = Concentração de células inicial

* TN = Tempo decorrido

2.4 ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO COM *Danio rerio*

2.4.1 Manutenção dos peixes

Adultos machos e fêmeas de *Danio rerio* foram obtidos comercialmente de uma loja especializada em aquários (Boutiquarium Aquarismo) localizada na cidade de Florianópolis (SC), aclimatados no laboratório (Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica/CCB/UFSC) por 14 dias antes da realização dos bioensaios, conforme recomendado pela norma Standard Methods, APHA (1992). Os peixes foram mantidos em aquários de 25L, sendo a proporção de 1g de organismo por litro de água, sob aeração constante e com filtros externos. A água foi trocada a cada dois dias. Peixes machos foram mantidos separados das fêmeas. A água de manutenção foi filtrada e declorada, sendo o pH 7,0 a 7,6; dureza de 40 a 48 mgCaCO₃/L. A temperatura da água foi mantida de 26°C a 28°C, com ajuda de aquecedores. Os peixes foram submetidos a um fotoperíodo de 12h luz, com luminosidade difusa. Os peixes foram alimentados 2 vezes ao dia, com ração comercial Vipar (Sera), ocasionalmente com náuplios de *Artemia salina* e neonatos de *Daphnia magna*.

2.4.2 Produção de ovos e embriões de *Danio rerio* (fase 1 e 2)

Na primeira fase dos bioensaios, grupos de 20 peixes-zebra com mais de 6 meses de idade (peso médio de 0,300 g e comprimento médio de 3,5 cm) com uma proporção de 1: 1 (machos: fêmeas) foram usados para a produção de ovos. Os embriões assim produzidos foram expostos as diferentes concentrações das substâncias a serem testadas, grupos teste, e apenas em água declorada os peixes dos grupos controle, em recipientes próprios (secção

2.4.2). Machos e fêmeas foram mantidos separados até o dia da montagem dos experimentos em casais, mantidos nas mesmas condições laboratoriais, sem a presença das substâncias serem testadas na água.

Na segunda fase, peixes adultos de *Danio rerio*, nas mesmas condições dos peixes da primeira fase (peso médio de 0,300 g e comprimento médio de 3,5 cm) foram expostos previamente (uma semana) a diferentes concentrações das substâncias a serem testadas. Foram mantidos em copos de Becker de 3,5L (6 peixes/Becker/concentração testada) por uma semana, sendo a água filtrada, declorada e as soluções das substâncias testadas trocadas diariamente. Durante os experimentos, foram mantidos sob aeração constante e fotoperíodo de 12h, com luminosidade difusa. Peixes machos foram mantidos separados das fêmeas, até o dia da montagem do experimento.

Peixes controle (3 machos e 3 fêmeas) foram mantidos nas mesmas condições laboratoriais, sem a presença de substâncias químicas a serem testadas na água, mantendo-se peixes com pesos e comprimentos médios semelhantes aos dos tratados.

Beckers de 4L foram preparados para a desova, consistindo de uma e uma cobertura de rede plástica à qual plantas artificiais foram anexadas. As plantas artificiais servem como um estimulante de reprodução e substrato, enquanto a cobertura de rede impede que os peixes se alimentem de seus próprios ovos. Acasalamento, desova e fertilização ocorrem dentro de 30 minutos a 2 horas, após o início da luz pela manhã.

Os animais foram alimentados com dietas artificiais comercialmente disponíveis, uma vez por dia *ad libitum*.

Os ensaios foram realizados de acordo com a norma da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), para o FET (Fish Embryo Toxicity Test) com embriões de *Danio rerio* (OECD 236, 2013), com as devidas adaptações para o Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica/CCB/UFSC e foram observadas alterações morfológicas nos ovos e nos embriões.

2.4.3 Teste de toxicidade com embriões de peixe FET (fase 1)

Sob as condições dos bioensaios, descritos anteriormente, os ovos fertilizados foram recolhidos por sucção e colocados em Placas de Petri (30 ovos/placa) com água declorada.

A seleção dos ovos foi feita por observação em lupa (mínimo de 25X), e somente ovos viáveis com membrana de fertilização aparente e até 3 horas após a fecundação (hpf) foram selecionados. Ovos que apresentaram coagulação, opacidade e/ou infestação por fungos foram descartados.

Os embriões recém-gerados exibiam as seguintes estruturas: o córion envolvendo o espaço perivitelino, que contém a gema e o blastodisco, localizado no pólo da gema. Com base em sua transparência, os ovos do estágio de 4 a 32 células podem ser claramente identificados como fertilizados.

O FET foi iniciado o mais rapidamente possível após a fertilização dos ovos (menos de 3 hpf).

A toxicidade foi avaliada com base na taxa de mortalidade (não viabilidade) de embriões e larvas expostos por 96 horas as diferentes concentrações das substâncias em estudo. Os embriões foram considerados mortos quando foram observadas uma ou mais características descritas na OECD 236 (coagulação, ausência de somitos, não destacamento da cauda e ausência de batimento cardíaco). As larvas foram consideradas mortas ou inviáveis quando se observou a ausência de batimentos cardíacos, ausência de circulação ou movimento.

2.4.4 Teste de reprodução e toxicidade com embriões de *Danio rerio* (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos

Sob as condições dos bioensaios, descritos anteriormente, os ovos fertilizados foram recolhidos por sucção e colocados em Placas de Petri com a substância e respectivas concentrações para as quais a geração parental foi exposta. O número de ovos colocados por fêmeas foi contado.

Após a contagem, foram colocados em placas, até 100 ovos por placas para garantir o bom desenvolvimento dos ovos. Observações com lupas com aumentos de no mínimo 25X e registros diários foram feitos até 96h para avaliar o desenvolvimento dos embriões. Durante o desenvolvimento dos embriões foram avaliadas edemas, modificações morfológicas e alterações nas nadadeiras. Os ovos escuros/coagulados foram retirados diariamente das placas.

Após 96h os alevinos foram colocados em aquários com água dechlorada, sem as substâncias as quais estavam expostos, para continuarem a se desenvolver.

2.4.5 Eutanásia dos peixes e larvas dos bioensaios

Há evidência que os peixes são capazes de perceber estímulos nociceptivos e, em decorrência, apresentar não só respostas reflexas como também alterações comportamentais e fisiológica. Portanto, quando possível e se necessário, em peixes adultos e larvas, deve ser realizar a eutanásia. Os peixes e larvas em estudo foram eutanasiados segundo um dos métodos propostos por “Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program” (NIH, 2009), o método de hipotermia (imobilização por submersão em água com gelo – cinco partes de gelo/uma parte de água, 0°C-4°C).

Alguns dados utilizados para endpoints em zebrafish, principalmente aqueles que são utilizados em experimentos de organismos mutantes geneticamente modificados, podem ser usados como critérios para promover a eutanasia dos peixes. Não há lista padronizada de endpoints para o peixe-zebra. No entanto, há um interesse crescente em problemas de saúde e bem-estar destes organismos, incluindo mutantes geneticamente modificados.

A folha de pontuação (Score Sheet for Scoring Endpoints in Zebrafish), Anexo B, pode ser usada para avaliar o grau de sofrimento do peixe, como resultado de uma alteração genética. O perfil de risco da larva e do adulto é a base para a avaliação final da gravidade do sofrimento resultante de uma alteração genética específica.

2.5 TESTE ESTATÍSTICO

Foi realizada análise estatística para verificar a presença de diferença entre o grupo controle e as concentrações das substâncias avaliadas. Nos testes com *D. rerio*, foram excluídos das análises os tratamentos que não apresentaram postura de ovos (Alumínio e Benzeno – Concentração B; Fenol – Concentração C; Glifosato – Concentrações B e C). Foram realizados os testes de normalidade de Shapiro (apenas para os tratamentos onde n>2) e de homocedasticidade de Bartlett, sendo verificada a distribuição normal e a

homogeneidade das variâncias em todos os dados testados. A seguir, foi realizada a Análise de Variância Unifatorial (ANOVA) seguida do teste de comparação de médias de Tukey, nos casos com três ou mais grupos de tratamentos, ou o teste *t* de Student, quando apenas dois grupos foram comparados (*D. rerio* com Glifosato). Os testes foram realizados considerando o limite de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas em linguagem R (v. 3.5.1) utilizando funções do pacote “agricolae” (MENDIBURU, 2017).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho, para a compreensão mais detalhada de cada poluente, utilizou-se isoladamente cada substância mesmo sabendo que algumas delas são encontradas juntas no ambiente. Também foram testados diferentes organismos para que o delineamento amostral pudesse compreender níveis tróficos diferentes e tentar mostrar de maneira mais global o que pode acontecer quando esses cenários forem expandidos para o ambiente natural e não apenas com testes *in vitro*.

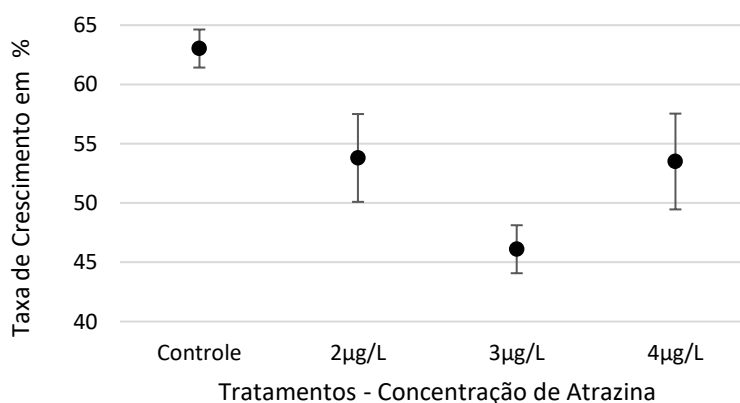
Para todos os testes de reprodução e desenvolvimento dos ovos, foi utilizado o mesmo controle.

Nos testes de toxicidade com *Daphnia magna*, a mortalidade dos indivíduos não foi relevante (Teste de agudo) e também nada foi observado de alteração morfológica e nem diferença no número de filhotes (Teste crônico), por isso os resultados não estão descritos separadamente.

3.1 RESULTADOS DA ATRAZINA

3.1.1 Teste de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

Figura 4: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença da Atrazina.



Fonte: Criado pela autora.

Tabela 2: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.

Grupo	Atrazina	
Controle	63,033	a
Concentração A	53,825	b
Concentração B	46,125	c
Concentração C	53,500	b

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

3.1.2 Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas

Tabela 3: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.

Controle		96,67%		
Concentrações	A	B	C	
Atrazina	100%	100%	83,33%	

Fonte: Criado pela autora.

3.1.3 Teste de reprodução e toxicidade com embriões de *Danio rerio* (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos

Tabela 4: Número total de ovos/fêmea de *D. rerio* exposto a Atrazina no período de 96h.

Grupo	Total de ovos		Ovos viáveis		Total de posturas	
Controle	493,500	a	354,500	a	5,500	a
Concentração A	281,000	ab	165,500	a	2,500	a
Concentração B	250,000	b	181,000	a	2,333	a
Concentração C	89,500	b	83,000	a	2,500	a

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

As modificações morfológicas encontradas nos indivíduos expostos a esse poluente foram alteração do formato dos ovos (Figura 8), despigmentação das larvas (Figura 9), curvatura na nadadeira caudal das larvas (Figura 10), larvas com curvatura na coluna vertebral e despigmentação (Figura 11) e larvas com edemas cardíacos e curvatura na nadadeira caudal (Figura 12).

3.1.4 Efeitos da Atrazina

Como podemos observar nos ensaios realizados, a atrazina respondeu de maneira proporcional à concentração até a concentração de $3\mu\text{g/L}$, no teste com a microalga *Desmodesmus subspicatus*. Resultado inesperado foi observado para a concentração de $4\mu\text{g/L}$ (Gráfico 1). Como atrazina é um herbicida, o resultado não é de fácil explicação. Porém, os resultados do glifosato também apresentaram o mesmo efeito. Os resultados parecem indicar que microalgas, pelo menos esta espécie, não respondem a herbicidas da mesma forma que ervas daninhas. A maior toxicidade foi encontrada na concentração $3\mu\text{g/L}$ e observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os tratamentos e o controle (Tabela 2). Em números relativos podemos observar uma taxa de inibição de crescimento entre 10% e 27%.

Já no teste com o microcrustáceo *Daphnia magna*, não pudemos observar alterações morfológicas, nem no número de neonatos e nem na mortalidade, assim como no teste de exposição dos embriões do peixe *Danio rerio*, com relação à viabilidade dos ovos depois de 96h de incubação com os poluentes (Tabela 4).

Porém, no teste de reprodução (Tabela 5) desse mesmo peixe, apesar de não haver diferença estatística entre o controle e os tratamentos na quantidade de ovos viáveis e no número de postura, podemos verificar que o número de posturas por casal foi, em média, 50% menor nos tratados do que no controle e o total de ovos colocados apresenta uma grande diferença, também demonstrada estatisticamente.

Apesar das concentrações $3\mu\text{g/L}$ e $4\mu\text{g/L}$ (Tabela 4) a taxa de sucesso ter sido maior que a do controle, as deformações encontradas nos embriões e nos alevinos foram mais graves. Pudemos observar deformação na coluna vertebral, edemas cardíacos e retardo no desenvolvimento dos embriões (Figuras 11 e 12). Esse efeito deletério no desenvolvimento

dos embriões pode demonstrar que ao longo dos anos, a sobrevivência da espécie estará ameaçada.

Já no controle, quando observamos a taxa de insucesso ela se deve ao fato de alguns ovos não terem sido fecundados pela grande quantidade de ovos colocados.

Na literatura é muito difícil encontrar estudos com essas concentrações, geralmente elas são muito maiores pois são feitas com a quantidade de agrotóxico que é lançada no meio ambiente. Porém se compararmos com outros países, podemos observar que não estamos muito diferentes do Canadá e da União Europeia, nessas duas legislações os dois testes agudo e crônico são definidos, sendo, 1,8µg/L o teste agudo no Canadá e 2µg/L na União Europeia. O teste crônico está apenas disponível para a União Europeia e o seu limite máximo tolerável é de 0,6µg/L, menos da metade do que é permitido no Brasil. Já os Estados Unidos vão na contramão de todos, lá permitindo 49µg/L para *Daphnia magna* e 110µg/L para o teste com a microalga.

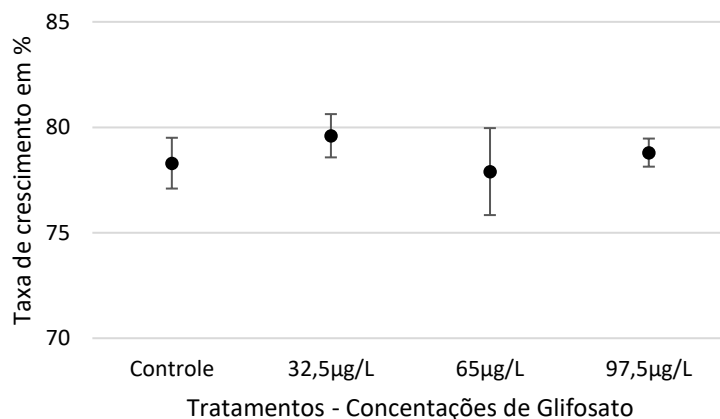
Esse pesticida teve seu uso proibido em 2004 em toda a União Europeia (ACKERMAN, 2007).

Se observarmos os resultados encontrados e compararmos com a legislação perceberemos que por mais que a taxa de sobrevivência nas 96h seja muito parecida, provavelmente após isso os alevinos terão muita dificuldade para se desenvolver e junto com o número menor de ovos colocados, não haverá a manutenção e preservação das espécies.

3.2 RESULTADOS COM GLIFOSATO

3.2.1 Teste de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

Figura 5: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença de Glifosato.



Fonte: Criado pela autora.

Tabela 5: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.

Grupo	Glifosato	
Controle	78,300	a
Concentração A	79,616	a
Concentração B	77,850	a
Concentração C	78,750	a

Fonte: Criado pela autora.

3.2.2 Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas

Tabela 6: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.

Concentrações	A	B	C
Glifosato	90%	86,67%	93,33%

Fonte: Criado pela autora.

3.2.3 Teste de reprodução e toxicidade com embriões de *Danio rerio* (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos

Tabela 7: Número de ovos/fêmea de *D. rerio* exposto Glifosato no período de 96h.

	Total de ovos	Ovos viáveis	Total de posturas
Controle	493,500a	354,500a	5,500a
Concentração A	218,500a	64,500a	2,500a
Concentração B	0	0	0
Concentração C	0	0	0

Fonte: Criado pela autora.

- Os grupos sem ovos foram excluídos das análises estatísticas. Para os demais grupos, foi realizado o teste t de Student, ao nível de significância de 5%. Médias seguidas de letras iguais não apresentaram diferença significativa.

As modificações morfológicas encontradas nos indivíduos expostos a esse poluente foram alteração do formato dos ovos (Figura 8), despigmentação das larvas (Figura 9), curvatura na nadadeira caudal das larvas (Figura 10), larvas com curvatura na coluna vertebral e despigmentação (Figura 11) e larvas com edemas cardíacos e curvatura na nadadeira caudal (Figura 12).

3.2.4 Efeitos do Glifosato

Quando testado o glifosato, não foi observada toxicidade, nessa faixa de concentração, na taxa de crescimento da microalga (Figura 5), confirmado pelo teste estatístico, bem como para o microcrustáceo e para os ovos de *Danio rerio* expostos a ele (Tabela 3). Porém, encontramos uma toxicidade muito alta na reprodução (Tabela 4) dos peixes. O número de ovos colocados pelos casais expostos ao herbicida foi muito menor do que o colocado pelos casais controle. E, em duas das três concentrações testadas, os casais não conseguiram nem se reproduzir, o que demonstra uma grave alteração reprodutiva na espécie, quando exposta ao agrotóxico.

Para outros experimentos no laboratório, esses mesmos peixes foram abertos e suas gônadas retiradas. Durante esse processo foi observado que metade dos peixes abertos estavam com alterações nas gônadas. Alguns estavam com hemorragia, outros com atrofiamento e alguns outros em processo de degeneração.

Portanto, apesar de não podermos afirmar que há toxicidade quando olhamos os resultados dos testes com microrganismos e do desenvolvimento dos ovos, podemos ver uma grave alteração quando a geração parental é exposta e a observação dos ovos é feita. Muitas deformações são encontradas, como por exemplo, edemas cardíacos, curvatura na nadadeira caudal, despigmentação e má formação dos ovos.

Na União Europeia o glifosato, não é mais permitido desde uma votação que ocorreu no dia 30 de junho de 2019 (Observatório do Agrotóxico, UFPR).

De acordo com a legislação vigente nos países, nos Estados Unidos o valor permitido do glifosato é muito maior do que no Brasil, ele varia entre 24mg/L a 140mg/L dependendo da formulação do produto. No Canadá o limite também é muito superior ao Brasil, apresentando um limite de 800µg/L para testes agudos e 2700 µg/L, porém a própria bula do Roundup é mais crítica que os Estados Unidos, ela fala em uma toxicidade de 2,1mg/L em algas e 18mg/L para daphnias.

Assim como a atrazina, dificilmente é encontrado, na literatura disponível, um estudo com concentrações tão baixas desse pesticida, apesar de muito estudos e muitas discussões serem feitas.

Esses resultados mostram que se a legislação se mantiver como está, não teremos a preservação do ecossistema, pois apesar de não haver a toxicidade para alga e daphnia, danos severos foram encontrados nos peixes conforme descrito anteriormente e imagens.

3.3 RESULTADOS COM BENZENO E TOLUENO

Devido a semelhança da natureza e do comportamento dessas substâncias, os resultados e a discussão serão feitos juntos.

3.3.1 Teste de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

Para essas substâncias não foi possível realizar o teste pois são compostos altamente voláteis.

3.3.2 Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas

Tabela 8: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.

Concentrações	A	B	C
Controle		96,67%	
Benzeno	100%	90%	90%
Tolueno	76,67%	73,33%	76,67%

Fonte: Criado pela autora.

3.3.3 Teste de reprodução e toxicidade com embriões de *Danio rerio* (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos

Tabela 9: Número de ovos/fêmea de *Danio rerio* exposto ao Benzeno no período de 96h.

Grupo	Total de ovos	Ovos viáveis	Total de posturas
Controle	493,500 a	354,500 a	5,500 a
Concentração A	157,000 a	143,000 b	2,000 a

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

- As concentrações B e C não foram apresentadas na tabela, por não terem apresentado ovos. Foi realizado teste t entre Controle e grupo A

Tabela 10: Número de ovos/fêmea de *Danio rerio* exposto ao Tolueno no período de 96h.

Grupo	Total de ovos	Ovos viáveis	Total de posturas
Controle	493,500 a	354,500 a	5,500 a
Concentração A	535,500 a	244,500 a	3,000 a
Concentração C	73,500 b	39,500 b	1,500 a

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

- A concentração B foi excluída da análise estatística por não ter apresentado ovos.

As modificações morfológicas encontradas nos indivíduos expostos a esse poluente foram alteração do formato dos ovos (Figura 8), a despigmentação das larvas foi encontrada

apenas na exposição ao benzeno, (Figura 9), curvatura na nadadeira caudal das larvas (Figura 10), larvas com curvatura na coluna vertebral e despigmentação foram observadas apenas na exposição ao benzeno (Figura 11) e larvas com edemas cardíacos e curvatura na nadadeira caudal (Figura 12).

3.3.4 Efeitos do Benzeno e Tolueno

Quando testados o benzeno e o tolueno, ambos os solventes se comportaram de maneira muito semelhante, frente aos ensaios toxicológicos realizados.

Sabendo do potencial tóxicológico dessas substâncias, relatado na literatura, observamos que os resultados encontrados nesse trabalho, muitas vezes não temos toxicidade visível em alguns dos testes, como por exemplo, o teste de toxicidade agudo com a *Daphnia magna* e a exposição dos ovos do *Danio rerio* (Tabela 3).

Porém, quando analisamos os dados da postura de ovos podemos ver uma alteração nesse padrão (Tabela 4, 7 e 8). Com exceção da menor concentração do Tolueno (concentração A), todas as outras concentrações apresentaram um número muito menor de ovos com relação ao controle, sendo que na metade delas, os casais nem colocaram ovos. As alterações encontradas foram mais severas, como por exemplo, edemas cardíacos e curvatura na coluna vertebral. Quando avaliamos os resultados do ponto de vista estatístico, podemos ver que no benzeno há uma diferença entre o controle e todos os tratamentos, quando se trata de ovos viáveis (Tabela 7). Sendo que no benzeno essa quantidade é muito menor, e nas concentrações 5µg/L e 7,5µg/L o teste não pode ser feito, pois os casais sequer colocaram ovos. Já no tolueno, a diferença ocorre entre o controle e a concentração 3µg/L (Tabela 8) para a quantidade de ovos e quantidade de ovos viáveis, a concentração 2µg/L não pode ser feita a análise estatística pois o não teve postura de ovos. Porém, apesar da não diferença estatística entre o controle e a concentração A, deformações severas foram observadas nos alevinos em todas as concentrações.

O teste com a microalga *Desmodesmus subspicatus* foi realizado diversas vezes, porém em nenhuma delas obtivemos sucesso no resultado. Por ser um composto volátil, durante a aeração, esses compostos, provavelmente, foram eliminados do frasco pelo

processo de aeração, não sendo possível uma análise adequada do efeito na toxicidade nesse organismo.

Na legislação brasileira (Resolução 357 Conama), o valor residual máximo que pode ser encontrado em corpos hídricos, é de 2µg/L para o tolueno e 5µg/L para o benzeno.

Em ambos os casos, podemos observar toxicidade e alterações em todas as concentrações testadas, mostrando uma ineficácia na legislação vigente apesar de estarmos muito à frente de outros países, pois nos Estados Unidos as concentrações para o benzeno variam de 0,58µg/L a 2,1µg/L para toxicidade aguda, menor do que no Brasil, mas a variação para toxicidade crônica é de 16 a 58µg/L, entre 3 e 10 vezes mais do que no Brasil. No Canadá o limite para toxicidade aguda é de 370µg/L e na Europa de 50µg/L (10 vezes mais do que o permitido no Brasil). Já para o tolueno não há dados disponíveis na Europa e no Canadá é igual ao Brasil, concentração máxima permitida de 2µg/L e nos Estados Unidos esse limite é muito mais alto, 57µg/L para toxicidade aguda e 520 µg/L para toxicidade crônica.

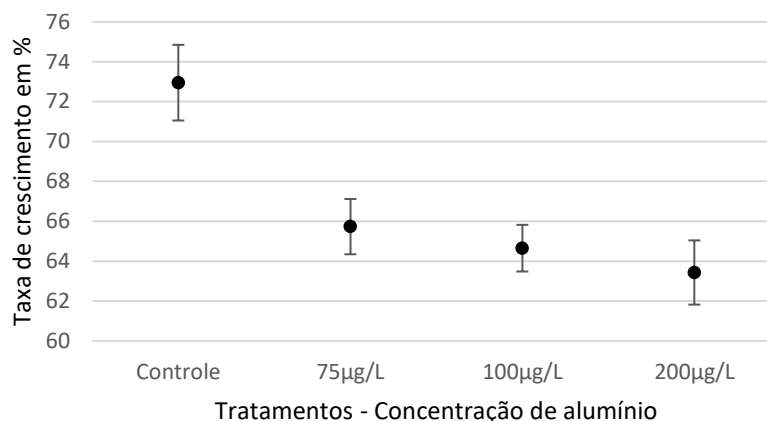
No caso do benzeno, ainda foi observada uma alteração no ciclo de vida dos animais. Depois dos alevinos serem colocados no aquário, apenas dois peixes que nasceram de pais expostos a menor concentração sobreviveram e nenhum dos casais expostos sobreviveu após o experimento. Essa mortalidade precoce dos casais expostos e a baixa sobrevivência dos alevinos não foi verificada em nenhuma das outras substâncias testadas.

Quando são estudados os efeitos do benzeno e do tolueno na literatura, muitas vezes é feito através da gasolina e assim, os valores testados são muito maiores do que os testados nesse trabalho, dificultando assim uma comparação.

3.4 RESULTADOS COM ALUMÍNIO

3.4.1 Teste de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

Figura 6: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença do alumínio.



Fonte: Criado pela autora.

Tabela 11: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.

Grupo	Alumínio	
Controle	72,950	a
Concentração A	65,725	b
Concentração B	64,650	b
Concentração C	63,425	b

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

3.4.2 Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas

Tabela 12: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.

Controle		96,67%		
Concentrações	A	B	C	
Alumínio	100%	100%	100%	

Fonte: Criado pela autora.

3.4.3 Teste de reprodução e toxicidade com embriões de *Danio rerio* (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos

Tabela 13: Número de ovos/fêmea de *Danio rerio* exposto a Alumínio no período de 96h.

Grupo	Total de ovos	Ovos viáveis	Total de posturas
Controle	493,500 a	354,500 a	5,500 a
Concentração A	30,333 b	15,667 b	0,333 b

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

- As concentrações B e C foram excluídas da análise estatística por não terem apresentado ovos. Foi realizado teste t entre Controle e grupo A.

As modificações morfológicas encontradas nos indivíduos expostos a esse poluente foram alteração do formato dos ovos (Figura 8) e curvatura na nadadeira caudal das larvas (Figura 10).

3.4.4 Efeitos do Alumínio

Nos ensaios realizados nesse trabalho com o alumínio, observamos que essa substância inibiu significativamente o crescimento da microalga *Desmodesmus subspicatus*, nas três concentrações testadas (Gráfico 4), em relação ao controle, porém não foi observada diferença estatística entre os grupos expostos (diferentes concentrações) ao metal (Tabela 2). Segundo Rangel 2007, células que são tratadas com alumínio têm alterações na estrutura e manutenção da parede celular na concentração de 0,5mM.

Ainda de acordo com Rangel 2007, um levantamento feito em diferentes espécies, indica que o alumínio limita o desenvolvimento e o crescimento de plantas e fungos. Resultados anteriores em nossos laboratórios (dados não publicados) mostram que o alumínio em concentrações na faixa de 2 ppm provoca alterações significativas nas paredes das células das microalgas e na estrutura dos cloroplastos.

Quando testada a toxicidade do alumínio apenas no desenvolvimento dos ovos (96h) de *Danio rerio*, não achamos nenhuma alteração que indicasse toxicidade (Tabela 3). Porém, quando a geração parental e os seus ovos foram expostos a ele, encontramos uma diminuição na quantidade de ovos colocados e uma diminuição na taxa de sucesso do desenvolvimento desses embriões e uma diminuição no número de posturas (Tabelas 4 e 9), confirmado pelo tratamento estatístico. Apesar de não existirem alterações morfológicas significativas,

devemos ficar atentos a essa diminuição no número de descendentes, pois pode acarretar, em algum momento, na redução drástica de número de indivíduos da espécie.

Segundo a IARC (1984, 1987, 2005 e 2010) em uma grande variedade de estudos, existem provas suficientes que mostram o potencial carcinogênico e genotóxico do alumínio em pessoas expostas a esse metal, durante a sua produção (extração). O câncer com maior incidência foi o de bexiga, seguido pelo de pulmão.

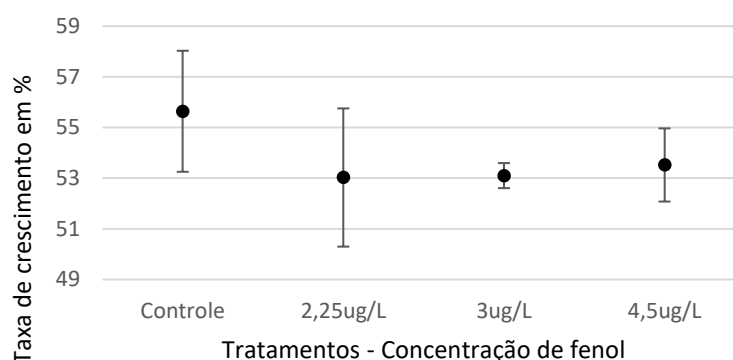
Para efeitos legislativos, isso demonstra que a Resolução novamente precisa ser revista, pois apesar de não termos deformações gravíssimas, não teremos futuras gerações devido à falta de neonatos.

Quando comparamos com outros países vemos que para essa substância estamos quase no mesmo patamar, no Brasil o aceitável é de até $100\mu\text{L}$, nos Estados Unidos para toxicidade aguda é de $750\mu\text{L}$, muito maior do que o permitido aqui, porém, para toxicidade crônica o valor máximo permitido é de $87\mu\text{L}$ e no Canadá esse valor varia de acordo com o pH da água, ele varia entre $5\mu\text{L}$ até $4000\mu\text{L}$. Não há esse dado disponível para a União Europeia.

3.5 RESULTADOS DO FENOL

3.5.1 Teste de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

Figura 7: Gráfico: Taxa de crescimento algal na presença fenol.



Fonte: Criado pela autora.

Tabela 14: Taxas de crescimento e tratamento estatístico.

Grupo	Fenol	
Controle	56,725	a
Concentração A	53,025	a
Concentração B	53,100	a
Concentração C	53,025	a

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

3.5.2 Teste de toxicidade com embriões de peixe FET - (fase 1), taxa de viabilidade de embriões e larvas expostos por 96 horas

Tabela 15: Variação da taxa de viabilidade dos embriões em relação as concentrações dos poluentes em 96h.

Controle	96,67%		
Concentrações	A	B	C
Fenol	70,80%	97,94%	-

Fonte: Criado pela autora.

3.5.3 Teste de reprodução e toxicidade com embriões de *Danio rerio* (fase 2) - modificações morfológicas e número total de ovos

Tabela 16: Número de ovos/fêmea de *Danio rerio* exposto ao Fenol no período de 96h.

Grupo	Total de ovos	Ovos viáveis	Total de posturas
Controle	493,500 a	354,500 a	5,500 a
Concentração A	61,667 b	43,667 b	1,333 a
Concentração B	97,500 ab	95,5000 ab	2,250 a

Fonte: Criado pela autora.

- Médias ($n > 2$) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

- A concentração C foi excluída da análise estatística por não ter apresentado ovos.

As modificações morfológicas encontradas nos indivíduos expostos a esse poluente foram alteração do formato dos ovos (Figura 8), curvatura na nadadeira caudal das larvas

(Figura 10), larvas com curvatura na coluna vertebral e despigmentação (Figura 11) e larvas com edemas cardíacos e curvatura na nadadeira caudal (Figura 12).

3.5.4 Efeitos do Fenol

Com o ácido fênico, fenol, foram feitos os testes de toxicidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus* e o teste de reprodução e desenvolvimento dos ovos do peixe *Danio rerio*.

No teste com a microalga, a toxicidade encontrada foi pequena, tendo sido observada uma pequena inibição no crescimento algal, não sendo significativa quando realizamos o teste estatístico (Gráfico 6 e Tabela 2). Isso, provavelmente, se deve a alta volatilidade do composto que ao ser aerado pode ter sido disperso e não ter causado um efeito tão tóxico quanto ao esperado.

No teste de reprodução do *Danio rerio*, observamos uma queda no número total de ovos, com relação ao grupo controle (Tabela 4). Porém, não há uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (concentrações diferentes). Quando observamos apenas a quantidade de ovos viáveis, percebemos que a concentração 3µg/L ficou entre o controle e a concentração 2,25µg/L (Tabela 10).

Na concentração 3µg/L, a concentração de valor determinada pela Resolução 357, a taxa de sucesso foi maior que a do controle, porém na concentração maior, os casais não foram nem capazes de colocar ovos e na concentração mais baixa a taxa de sucesso é menor que a do controle. Os dados demonstraram, portanto, um comportamento não diretamente proporcional às concentrações, talvez devido a sua alta volatilidade.

Em ambos os testes podemos verificar que ocorreu toxicidade. Na Resolução 357 do CONAMA, o limite máximo permitido em corpos hídricos é de 3µg/L. E como é observado nesse estudo, na concentração de 2,25µg/L já há toxicidade e alterações nos alevinos, portanto, a concentração de 3µg/L não garante a preservação dos ecossistemas. E segundo a ATSDR, os fenóis ficam na água por pelo menos uma semana, podendo ser bem maior o tempo, o que pode afetar drasticamente o ciclo de vida desses organismos que são muito mais curtos que o dos seres humanos.

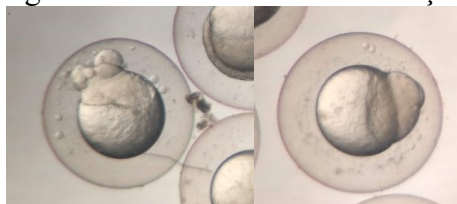
No Canadá o valor máximo permitido é de 1µg/L, nos Estados Unidos é de 700µg/L e na União Europeia não há um valor estipulado.

Em outras literaturas esse valor é difícil de encontrar, são trabalhados valores muito mais altos não sendo suficientes para uma discussão.

4 IMAGENS DOS TESTES DE REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES DE *DANIO RERIO*.

As figuras 8 a 12 apresentam as alterações morfológicas mais frequentes encontradas nos embriões de *Danio rerio* no teste de reprodução.

Figura 8: Embriões com deformação.



Fonte: Acervo pessoal 2018.

Tais deformações foram observadas na Atrazina, Glifosato, Benzeno, Tolueno, Fenol e Alumínio

Figura 9: Larva despigmentada.



Fonte: Acervo pessoal 2018.

Tais deformações foram observadas na Atrazina, Glifosato e no Benzeno.

Figura 10: Larvas com curvatura na nadadeira caudal.



Fonte: Acervo pessoal 2018.

Tais deformações foram observadas na Atrazina, Glifosato, Benzeno, Tolueno, Fenol e no Alumínio.

Figura 11: Larvas com curvatura na coluna vertebral e despigmentadas.



Fonte: Acervo pessoal 2018.

Tais deformações foram observadas na Atrazina, Glifosato, Benzeno e no Fenol.

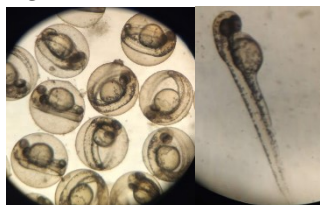
Figura 12: Larvas com edema cardíaco e curvatura na nadadeira caudal.



Fonte: Acervo pessoal 2018.

Tais deformações foram observadas na Atrazina, Glifosato, Benzeno, Tolueno e no Fenol.

Figura 13: Larvas e embriões normais.



Fonte: Acervo pessoal 2018

Fotos do grupo controle.

4 CONCLUSÃO

Para todas as substâncias escolhidas, o valor determinado pela legislação brasileira não acarretará a preservação das espécies e do ecossistema. Pelo menos em algum dos ensaios feitos, alguma toxicidade e/ou alteração morfológica foi encontrada. Aqui deve ser destacada a importância de se realizar estudos ou testes com bioindicadores diferentes. Como ficou demonstrado, para alguns testes, o resultado pode ser a ausência de toxicidade. Por exemplo, os resultados claramente indicaram que o teste de toxicidade aguda (mortalidade) com daphnia não apresentou resultado positivo para nenhuma das concentrações testadas, para todos os poluentes.

Esse trabalho corrobora com a necessidade de utilizar organismos de diferentes níveis tróficos nos ensaios toxicológicos para o monitoramento de cursos hídricos. Adicionalmente, é preciso fazer referência ao fato de que os valores previstos na legislação não levam em consideração os efeitos de cooperação (sinergismo e aditivo) na toxicidade. Muito menos levam em consideração o fato frequente, situações reais, de que, embora um determinado efluente a ser lançado num corpo hídrico esteja com as suas características dentro das condições estabelecidas na lei, muitas vezes, existem várias fontes de lançamento dos mesmos, as quais não são consideradas na sua totalidade (somatório).

Se a nossa legislação permanecer como está, dificilmente conseguiremos assegurar a preservação das espécies e um meio ambiente equilibrado e saudável, como assegura a nossa Constituição. Por este motivo, certamente, a legislação de outros países, por exemplo, Canadá e Estados Unidos, muitas vezes, são mais restritivas.

Em razão disso, a legislação brasileira poderia ser revista a fim de restringir mais o lançamento de poluentes em corpos hídricos e a incorporação de novos testes ecotoxicológicos no processo de avaliação e licenciamento de um empreendimento, assim como ampliar a fiscalização desses lançamentos. Para que a legislação seja mais restritiva, mais estudos precisam ser feitos, com propósito da adequação desses novos valores a serem estipulados.

Existem poucos estudos como as concentrações determinadas pela legislação, os estudos que são realizados, são feitos com concentrações bem maiores das substâncias devido ao fato de que os valores utilizados na indústria e encontrados no ambiente são maiores. E

normalmente, esses valores mais altos mostram resultados bem mais claros e em quase todos os níveis tróficos, incluindo mamíferos, que não foram utilizados nesse trabalho.

Para a determinação dos parâmetros estabelecidos pelas Resoluções estaduais e nacionais, devem ser exigidos testes de toxicidade crônica e não apenas aguda (48 a 96h), cuja referência é a mortalidade. Analisar a morte dos organismos é um parâmetro muito drástico e não garante a preservação das espécies, particularmente, quando as metas são de longo prazo, como deve ser.

Estudos mais aprofundados, nessas concentrações, sobre a ação dessas substâncias como desreguladores endócrinos devem ser feitos. Desreguladores endócrinos são substâncias capazes de provocar o desequilíbrio hormonal nos organismos expostos, com grande implicação na saúde e sobrevivência deles. Nestas situações, a toxicidade (poluição), não mata rapidamente o indivíduo, mas elimina as espécies, a longo prazo.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, Frank. (2007). The Economics of Atrazine. *International journal of occupational and environmental health*. 13. 437-45. 10.1179/oeh.2007.13.4.437.

ABNT.NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática Toxicidade aguda Métodos de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

Agrofit. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em: 08 de out. de 2018.

Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola. Ibama, 2016. Disponível em: <http://ibama.gov.br/avaliacao-e-destinacao/quimicos-e-biologicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola#ppa>. Acesso em: 04 de agosto de 2018.

BAPTISTA, Ivana Eunice. Avaliação da toxicidade de efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense. Florianópolis, 2001. xi, 133 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Disponível em: <http://www.bu.ufsc.br/teses/PGEA0110-D.pdf>

BERTOLETTI, Eduardo. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. Tecnoblog, 2018. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2015/06/manual-controle-ecotoxicologico-2013.pdf>. Acesso em: 02 de set. de 2017.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Resolução 357. Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 03 mar. 2017.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Resolução 430. Brasília, DF. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

BRUSCA, Richard C.; BRUSCA, Gary J. Invertebrados. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. xxii, [96], 968 p. ISBN 9788527712583.

CARDOSO, F. S. et al. Análise do uso e ocupação da terra na bacia da Lagoa do Peri, Florianópolis (SC). Caminhos da Geografia, v. 9, p 201 – 213, 2008.

CASAN. Estação de tratamento de água – ETA. Disponível em: < <https://www.casan.com.br/menu-conteudo/index/url/estacao-de-tratamento-de-agua-eta#0>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2017.

CETESB. EDUARDO BERTOLETTI. Controle Ecotoxicológico De Efluentes Líquidos No Estado De São Paulo. 2013. CETESB. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2015/06/manual-controle-ecotoxicologico-2013.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

DAI, Y; JIA, Y; CHEN, N; BIAN, W; LI, Q; MA, Y; CHEN, Y; PEI, D. ZEBRAFISH AS A MODEL SYSTEM TO STUDY TOXICOLOGY. Setacpress, 2014. Disponível em: <https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/etc.2406>. Acesso em: 06 de jun. de 2018

DERÍSIO, José Carlos. Introdução ao controle de poluição ambiental. Oficina de Textos, 2016.

EPA. Aquatic Life Criteria – Aluminum. 2020. Disponível em: <<https://www.epa.gov/wqc/aquatic-life-criteria-aluminum>>. Acesso em 08 de março de 2020.

EXON, Jerry and KOLLER, Loren. Effects of Transplacental Exposure to Chlorinated Phenols. *Jornal da Unicamp*, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1569045/pdf/envhper00463-0137.pdf>.

Acesso em: 7 de março de 2019.

Gillis, P. L., Chow-Fraser, P., Ranville, J. F., Ross, P. E., & Wood, C. M. (2005). Daphnia need to be gut-cleared too: The effect of exposure to and ingestion of metal-contaminated sediment on the gut-clearance patterns of *D. magna*. *Aquatic Toxicology*, 71(2), 143-154.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., TUSRTUN, R. V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* v. 11, p. 714-719, 1977.

HEDGE, J. Zebrafish. Models To Assess Acute, Developmental, And Neurodevelopmental Toxicity. *Science Inventory*, 2018. Disponível em: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=341131&Lab=NHEERL.

Acesso em: 04 de jun. de 2018.

Hentschke, G.S. & Torgan L.C. Desmodesmus e Scenedesmus (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, v. 61, n. 4, p. 585-601. 2010.

IBAMA. Portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. Brasília, DF, 15 de outubro de 1996. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.html.

Acesso em: 03 mar. 2017.

IARC. Occupational exposures during aluminium production. 2005. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100F-22.pdf>. Acesso em 05 de março de 2017.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100F.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 6341:2012. Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test

KHAN, F. R.; ALHEWAIRINI, S.S., (November 27th 2018). Zebrafish as a Model Organism, Current Trends in Cancer Management, Liliana Streba, Dan Ionut Gheonea and Michael Schenker, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81517. Available from: <https://www.intechopen.com/books/current-trends-in-cancer-management/zebrafish-em-danio-rerio-em-as-a-model-organism>.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes Ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis-SC: FATMA/ GTZ. 2004.

MARQUES, Luís. Atlas do envenenamento alimentar no Brasil. Jornal da Unicamp, 2017. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/ju/artigos/luiz-marques/atlas-do-envenenamento-alimentar-no-brasil>. Acesso em: 24 de março de 2019.

MENDIBURU, Felipe. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-8. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. Acesso em: 08 de fev. 2017.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Final report to OLAW on euthanasia of zebrafish, 2009.

OBSERVATÓRIO DO USO DE AGROTÓXICOS E CONSEQUÊNCIA PARA A SAÚDE HUMANA E AMBIENTAL NO PARANÁ. Após votação, uso de Glifosato fica proibido União Europeia a partir de 30 de junho. Disponível em: <http://www.saude.ufpr.br/portal/observatorio/noticias/apos-votacao-uso-de-glifosato-fica-proibido-uniao-europeia-a-partir-de-30-de-junho/>. Acesso em: 10 ago. 2019.

OECD (2012) - Organisation for Economic Co-operation and Development, Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013a.

_____. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Paris: OECD Publishing, 2013b.

OECD (2004) - Organisation for Economic Co-operation and Development, Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

PAIVA, A. B. Avaliação de risco ambiental utilizando parâmetros físico-quânticos e biológicos no rio Canoas/SC. Universidade Federal de Santa Catarina programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2004. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88039/208102.pdf.txt?sequence=2>. Acesso em: 20 de out. de 2017

Perfis Ambientais de Agrotóxicos. Ibama, 2018. Disponível em: <https://ibama.gov.br/agrotoxicos/perfis-ambientais#sobre-perfis-ambientais>. Acesso em: 19 de out. de 2018.

QUEIROZ, S. C. do N. de; FERRACINI, V. L.; TAVARES, M. M., Determinação de resíduos de glifosato em plantas de soja utilizando cromatografia de íons. Embrapa, 2007. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/143450/1/2009AA-047.pdf> (<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/577635/determinacao-de-residuos-de-glifosato-em-plantas-de-soja-utilizando-cromatografia-de-ions>). Acesso em: 08 de Set. de 2017

RANGEL, Ludmilla. Efeito do Alumínio na Dinâmica da Parede Celular de Levedura de Fissão. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Disponível em:

http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGBB_6650_1241545920.pdf. Acesso em: 9 de maio de 2019.

Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Ibama, 2016. Disponível em: <https://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 17 de jun. de 2017.

SANT'ANNA, C.L.; Tucci, A.; Azevedo, M.T.P.; Melcher, S.S.; Werner, V.R.; Malone, C.F.S.; Rossini, E.F.; Jacinavicius, F.R.; Hentschke, G.S.; Osti, J.A.S.; Santos, K.R.S.; Gama-Júnior, W.A.; Rosal, C. & Adame, G. 2012. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. Publicação eletrônica, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia. www.ibot.sp.gov.br.

Score sheets for zebrafish. Humane Endpoints, 2017. Disponível em: <https://www.humane-endpoints.info/en/zebravis-v1/scoringslijsten>. Acesso em: 11 de Abril de 2016.

TAKI FILHO, P. H; SANTOS, H. T. Importância do monitoramento da qualidade da água de corpos hídricos. In: VII SEMANA DE ENGENHARIA AMBIENTAL. UNICENTRO, Irato – PR, 2009.

Ulf G. Ahlborg, Tuula M. Thunberg & Howard C. Spencer (1980) Chlorinated Phenols: Occurrence, Toxicity, Metabolism, And Environmental Impact, CRC Critical Reviews in Toxicology.

World Health Organization. Health topics: Water. Disponível em: <https://www.who.int/topics/water/en>. Acesso em: 22 de jun. de 2019.

Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/26302833_Zebrafish_Development_and_Genetics_Introducing_Undergraduates_to_Developmental_Biology_and_Genetics_in_a_Large_Introductory_Laboratory_Class/figures?lo=1. Acesso em: 12 de nov. de 2017

ZAGATTO, P. A. (1999) Ecotoxicologia Aquática. In: VII Congresso Brasileiro de Limnologia. Apostila do Minicurso de ecotoxicologia aquática. UFSC, 19 a 22 de julho. Florianópolis, SC.

ANEXO A – Meios de cultivo de *Desmodemus subspicatus*

Preparação do Meio de Cultivo da OCDE com base em orientações de ensaios da OCDE 201.

Para a preparação de 1L de meio de cultivo:

- Adicionar em 500 ml de água deionizada:

-10 ml da solução-estoque 1

-1 ml das soluções-estoque 2, 3 e 4.

- Completar até 1L com água deionizada.

OBS.: as soluções-estoque devem ser autoclavadas (120°C, 15 min) e guardadas em frascos escuros, a 4°C.

Tabela 17: Nutrientes e concentrações para a preparação da solução-estoque.

Nutrientes	Concentração da solução em estoque
Solução-estoque 1: macronutrientes	
NH ₄ Cl	1,5 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,16 g/L
Solução-estoque 2: ferro	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/L
EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O	100 mg/L
Solução-estoque 3: elementos-traço	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/L
Solução-estoque 4: bicarbonato	
NaHCO ₃	50 g/L
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50 g/L

Fonte: Criado pela autora.

ANEXO B – SCORE SHEET FOR SCORING ENDPOINTS IN ZEBRAFISH

SCORE SHEET FOR SCORING ENDPOINTS IN ZEBRAFISH

Experimental/ Treatment Group:

Name of person scoring:

AEC Number:

Date:

Time:

After Hours:

Contact Telephone Number:

Name of Supervisor/Chief Investigator:

Indicators

Scoring of independent variables:

Individual score for affected fish in group*

Date	Scoring of independent variables:	Individual score for affected fish in group*
General Health Swimming	0. normal 1. intermittent loss of equilibrium 2. frequent loss of equilibrium 3. complete loss of equilibrium	
Body Score (Estimated)	0. normal 1. loss of 10-15% BW 2. loss of 15-20% BW 3. loss of >20% BW	
Abnormal abdominal muscle tone	0. normal 1. mild 2. moderate 3. severe	
Abdominal Distension	0. normal 1. mild 2. moderate 3. severe	
Behaviour	0. normal 1 - 3. all fish at surface gasping for air	
Total Score		

For Total Scores

0 = normal: no action

1-4 = moderate changes: should be monitored daily

5-8 = significant changes: monitor twice daily

>8 = euthanase

* This score-sheet is to be used following the identification of individual abnormalities within single aquaria

*** A score of 3 in any one category: euthanase