

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

*“Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*”*

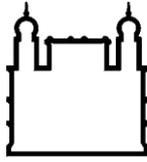
por

Valesca Alves Cavalcanti

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas

Segundo orientador: Prof. Dr. Daniel Forsin Buss



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Rio de Janeiro, julho de 2010.

Esta dissertação, intitulada

*“Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*”*

apresentada por

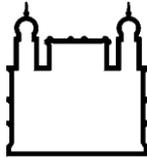
Valesca Alves Cavalcanti

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista

Prof. Dr. Josino Costa Moreira

Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas – Orientador principal



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2010.

Valesca Alves Cavalcanti

CG/Fa

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

C376 Cavalcanti, Valesca Alves
Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com
azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*. / Valesca
Alves Cavalcanti. Rio de Janeiro: s.n., 2010.
x, 66 f., il., tab., graf.

Orientador: Barrocas, Paulo Rubens Guimarães
Buss, Daniel Forsin

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca,
Rio de Janeiro, 2010

1. Indústria Têxtil. 2. Efluentes Industriais. 3. Toxicologia. 4. Impacto
Ambiental. 5. Insetos. 6. Crustáceos. I. Título.

CDD - 22.ed. – 628.3

AGRADECIMENTO

A Deus por mais esta bênção em minha vida.

À minha família por todo apoio, carinho e dedicação.

Ao Leonardo Pages pelo apoio e incentivo incondicionais.

Aos amigos e funcionários do Pavilhão Lauro Travassos.

À Gisele Amorim por toda ajuda e dedicação.

À Giulianna Fico pelo apoio e incentivo.

À equipe do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental pelo apoio, carinho e incentivo durante esta empreitada e por garantir as freqüentes risadas.

Aos amigos e funcionários do laboratório do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental.

Aos meus orientadores Dr. Paulo Barrocas e Dr. Daniel Buss pela orientação, amizade e preocupação... Não há palavras para expressar minha gratidão a esta oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de estudo durante o período de vigência do mestrado.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e, caso tenha esquecido alguém, me desculpe.

“É melhor tentar e falhar que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

RESUMO

As atividades têxteis são economicamente importantes no Brasil. No entanto, algumas atividades produzem efluentes com 5-20% de corantes que em geral, são estáveis e persistentes no ambiente. Estas substâncias podem interagir com o sedimento, resultando em efeitos agudos e crônicos para a biota aquática. Os organismos mais comumente usados para testes de toxicidade são as *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) no qual vive e se alimenta na coluna d'água. Nós acreditamos que as espécies bentônicas, nas quais vivem e se alimentam nos sedimentos, como *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera, Insecta) pode ser o candidato ideal para estes testes de toxicidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade do sedimento natural e artificial contaminados com azocorantes têxteis disperso e reativo utilizando *D. similis* e *C. xanthus* como organismos-testes. Nós também avaliamos a concentração nominal e efetiva para determinar a quantidade de massa associada ao sedimento, usando espectrofotômetro. Não foram encontradas diferenças significantes entre a toxicidade dos sedimentos para *C. xanthus*. Os azocorantes disperso e reativo foram similares para a concentração nominal da CL₅₀, mas utilizando a concentração efetiva, o azocorante disperso foi 3 vezes mais tóxico do que o azocorante reativo. A espécie *C. xanthus* foi 210 vezes mais sensível do que *D. similis* para o azocorante disperso e 10 vezes mais sensível para o azocorante reativo.

Palavras-chave: Efluente têxtil, teste de ecotoxicidade, impacto ambiental, concentração nominal e efetiva, Insecta, Crustacea.

ABSTRACT

Textile activities are economically important in Brazil. However, such activities produce effluents with 5-20% dyes, which are generally stable and persistent in the environment. These substances may interact with the sediment, resulting in chronic and acute effects for the aquatic biota. The organism most commonly used for those toxicity tests are *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) – which live and feed on the water column. We believe benthic species – those that feed and inhabit in sediments – such as *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera, Insecta), would be ideal candidates for toxicity tests. The aim of this study was to evaluate the toxicity of natural and artificial sediments contaminated with disperse and reactive textile azodyes on *D. similis* and on *C. xanthus*. We also evaluated nominal and effective concentrations by determining the azodye mass associated to the sediment, using spectrophotometry. No significant differences were found between sediments on the toxicity of *C. xanthus*. Disperse and reactive azodyes had similar *C. xanthus* nominal LC₅₀, but when using effective concentration, disperse azodye was three times more toxic than the reactive azodye. The species *C. xanthus* was 210 times more sensitive than *D. similis* for the disperse azodyes and 10 times more sensitive for the reactive azodye.

Keys words: Textile effluent, test toxicity, environmental impact, nominal and effective concentrations, Insecta, Crustacea.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Exemplo de uma estrutura química característica de um grupo cromóforo de um azocorante.....	5
Tabela 1: Características gerais do azocorante azul marinho.....	14
Figura 2: Estrutura química do azocorante disperso azul marinho.....	14
Tabela 2: Características gerais do azocorante Amarelo ouro.....	15
Figura 3: Estrutura química do azocorante reativo amarelo ouro.....	15
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de vida do Chironomidae	19
Figura 5: Cultura de <i>Chironomus xanthus</i>	23
Figura 6: Teste de sensibilidade da cultura de <i>Chironomus xanthus</i>	26
Figura 7: Teste de sensibilidade com <i>Chironomus xanthus</i>	26
Figura 8: Sedimento impregnado com solução azocorante.....	31
Figura 9: Agitador magnético	31
Figura 10: Teste com elutriato e azocorante amarelo	32
Figura 11: Teste ecotoxicológico com solução azocorante e <i>Daphnia similis</i> ..	32
Figura 12: Teste ecotoxicológico com solução azocorante e <i>Daphnia similis</i> ..	33
Figura 13: Concentrações do azocorante amarelo 25mg/L em água e água e sedimento.....	33
Figura 14: Concentrações do azocorante amarelo 50mg/L em água e água e sedimento.....	35
Figura 15: Concentrações do azocorante amarelo 100mg/L em água e água e sedimento.....	36
Figura 16: Concentrações do azocorante amarelo 200mg/L em água e água e sedimento.....	36

Figura 17: Concentrações do azocorante azul 25mg/L em água e água e sedimento.....	37
Figura 18: Concentrações do azocorante azul 50mg/L em água e água e sedimento.....	37
Figura 19: Concentrações do azocorante azul 100mg/L em água e água e sedimento.....	38
Figura 20: Concentrações do azocorante azul 200mg/L em água e água e sedimento.....	39
Tabela 3. 9d-CL ₅₀ (mg/L) das concentrações nominal e efetiva de <i>C. xanthus</i> em sedimento artificial e 48h-CE ₅₀ de <i>D. similis</i> em solução aquosa utilizando os azocorantes azul e amarelo.....	39
Tabela 4: Concentrações nominais da 9d-CL ₅₀ de <i>C. xanthus</i> nos sedimentos natural e artificial	41
Figura 21: Percentual de sobrevivência dos <i>Chironomus xanthus</i> nos testes com sedimento natural e artificial e corante reativo amarelo ouro	42
Figura 22: Percentual de sobrevivência dos <i>Chironomus xanthus</i> nos testes com sedimento natural e artificial e corante disperso azul marinho	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Impactos de efluentes têxteis sobre os ecossistemas e a saúde humana ..	1
1.2. A ecotoxicologia aquática como indicadora de impactos de poluentes sobre o ecossistema	5
1.3. Importância dos sedimentos em ecossistemas aquáticos.....	8
1.4. Uso da ecotoxicologia na avaliação de sedimentos	10
2. HIPÓTESE	12
3. OBJETIVO	12
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
5. MATERIAL E MÉTODOS	13
5.1. Corantes avaliados.....	13
5.2. Medidas espectrofotométricas para determinação das concentrações efetivas dos azocorantes nos testes ecotoxicológicos	15
5.3. Os organismos-teste	17
5.3.1. Cultura e manutenção do organismo-teste – <i>Chironomus xanthus</i> 21	
5.3.2. Avaliação da cultura do organismo-teste (<i>Chironomus xanthus</i>).....	23
5.3.3. Cultura e manutenção do organismo-teste <i>Daphnia similis</i>	27
5.4. Procedimento de preparação de sedimentos para a realização dos bioensaios	27
5.4.1. Sedimento artificial	27
5.4.2. Sedimento natural	28
5.5. Bioensaio de toxicidade aguda com amostra do sedimento.....	28

5.6. Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	29
5.7. Análise estatística dos dados.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1. Medidas espectrofotométricas para determinação das concentrações efetivas dos azocorantes nos testes ecotoxicológicos.....	34
6.2. Concentração nominal e efetiva de bioensaios com <i>C. xanthus</i>	39
6.3. Bioensaios ecotoxicológicos com <i>C. xanthus</i> e <i>D. similis</i>	40
6.3.1. Influência do tipo de sedimento nos testes ecotoxicológicos com <i>C. xanthus</i>	41
7. DISCUSSÃO.....	43
7.1. Bioensaios ecotoxicológicos com <i>Chironomus xanthus</i>	43
7.2. Influência do tipo de sedimento.....	44
7.3. Determinação da concentração de azocorante associada ao sedimento.....	45
7.4. Bioensaios ecotoxicológicos com <i>Daphnia similis</i>	46
7.5. Cultura e manutenção do organismo-teste – <i>Chironomus xanthus</i>	47
7.6. Importância dos organismos-teste para avaliação ambiental.....	49
8. CONCLUSÃO.....	52
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
11. ANEXOS.....	66

Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Impactos de efluentes têxteis sobre os ecossistemas e a saúde humana

A indústria têxtil é uma das maiores produtoras de efluentes líquidos em virtude do grande consumo de água e produtos químicos, em especial nos processos de tingimento e acabamento (Leão et al., 1998). Na etapa de tingimento, são adicionados os corantes empregados sob a forma de soluções e dispersões aquosas por indução com reativos apropriados ou por controle das condições físicas como temperatura e pH, conferindo cor aos tecidos (Andrade, 1999).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (Azo, antraquinona, indigóides, tioindigóides etc.) ou de acordo com o método pelo qual é fixado à fibra têxtil. As classes mais utilizadas são: Corantes reativos, corantes diretos, corantes azóicos, corantes ácidos, corantes a cuba, corante de enxofre, corantes dispersivos, corantes pré-metalizados e corantes branqueadores (Guaratini & Zanoni, 2000; Kunz et al., 2002; Alcântara & Daltin, 1995).

No Brasil, devido às características climáticas, o setor têxtil baseia-se predominantemente nas malhas de algodão. Cerca de 70% de sua produtividade se localizam nas regiões Sul (Santa Catarina), Sudeste (São

Paulo e Minas Gerais) e Nordeste (Bahia, Pernambuco e Ceará). Estes processos requerem o uso de corantes índigos, tioindigóides e antraquinóides que além do alto custo, produzem como subproduto hidrossulfito de sódio que pode causar problemas ecológicos (Guaratini & Zanoni, 2000).

Mais de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes e pigmentos são produzidos no mundo, sendo o Brasil responsável por 2,6% da demanda mundial (Fungaro et al., 2009). Do ponto de vista ambiental, estima-se que 5 a 20% da produção mundial de corantes são lançadas no ambiente durante a síntese, processamento e, sobretudo, na etapa de tingimento, devido à incompleta fixação dos corantes (Coughlin et al., 2003; Forgacs et al., 2004; Paschoal & Tremiliosi-Filho, 2005). Esta quantidade é alarmante, pois considera o despejo de aproximadamente 1,20 toneladas por dia destes compostos nos ecossistemas (Guaratini & Zanoni, 2000).

A descontaminação dos compostos é um dos grandes problemas ambientais, sobretudo considerando que os corantes não pertencem a uma mesma classe de compostos químicos, que por sua vez requerem métodos específicos para identificação, quantificação e degradação (Guaratini & Zanoni, 2000). Além disso, são difíceis de serem tratados por causa de sua origem sintética e, principalmente, devido às suas estruturas moleculares aromáticas complexas, que podem envolver durante seu processo de síntese, até 5000 reações intermediárias. Estas estruturas são constituídas para resistir ao sabão, água, luz, agentes oxidantes e suor, sendo por isso mais estáveis e menos biodegradáveis (Banat et al., 1996; Aksu & Donmez, 2003; Guaratini & Zanoni, 2000; Senam et al., 2003; Fungaro et al., 2009; Adedayo et al., 2004).

Ainda não existe um método universalmente aceito para a descoloração de efluentes aquosos da indústria têxtil. A maior parte das indústrias realiza processos de oxidação biológica (lodo ativado) que não é efetivo na remoção da cor de muitos tipos de efluentes, mas é usado principalmente para reduzir a matéria orgânica (Galindo et al., 2001). Existem métodos para remoção de corantes que incluem coagulação, floculação, oxidação, fotodegradação, membrana filtrante, incluindo degradação biológica aeróbia e anaeróbia, adsorção com carvão ativado, ultrafiltração, osmose reversa, coagulação-floculação, troca iônica, entre outras (Galindo et al., 2001; Konstantinou & Albanis, 2004). Todos esses métodos possuem limitações e nenhum deles é completamente satisfatório na remoção da cor de efluentes têxteis, além de possuírem alto custo inicial e operacional, sendo esta a principal desvantagem para as indústrias de tingimento e acabamento (Aksu & Donmez, 2003; Verma & Madamwar, 2005; Fungaro et al., 2009).

A liberação de compostos químicos presentes em efluentes têxteis representa um grande problema ambiental, uma vez que estas substâncias apresentam alta recalcitrância (Wang & Yu, 1998), além de uma cinética de degradação muito lenta para os processos biológicos convencionais, podendo permanecer por cerca de 50 anos nos ambientes aquáticos, sendo a água e o solo, os compartimentos mais afetados (Gomes et al., 1998; Bromberg & Duran, 2000; Zanoni & Carneiro, 2001).

Alguns tipos de corantes (como os pré-metalizados) possuem alta concentração de metais, como o cromo, e o lançamento de rejeitos nas águas pode acarretar em distúrbios ecológicos graves (Guaratini & Zanoni, 2000). Os efluentes com corantes podem modificar a cor da água do corpo receptor, fa-

zendo com que a biota aquática tenha que se ajustar, sobretudo devido a potencial redução da atividade fotossintética causada por essas alterações (Guaratini & Zanoni, 2000). Além deste fato, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azocorantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (Kunz et al., 2002). Essa toxicidade se deve, em parte à clivagem da ligação azo formando aminas aromáticas potencialmente cancerígenas (Ferraz, 2008).

Nos últimos anos, regulamentações rigorosas têm sido estabelecidas em muitos países referentes ao descarte de efluentes coloridos. A legislação governamental está se tornando cada vez mais rigorosa, especialmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, no que diz respeito à remoção de cor dos efluentes industriais (Anjaneyulu et al., 2005; Immich, 2006).

Os riscos toxicológicos de corantes sintéticos à saúde humana estão intrinsecamente relacionados ao modo e tempo de exposição, *i.e.*, ingestão oral, sensibilização da pele, sensibilização das vias respiratórias. Estudos biocinéticos têm mostrado evidências de que corantes azo solúveis em água, se oralmente administrados são metabolizados na microflora intestinal e excretados mais rapidamente do que os compostos menos solúveis (Clarke & Steinle, 1995). Por outro lado, os corantes insolúveis em água poderiam ser biodegradados no fígado, formando conjugados solúveis em água que seriam então transportados para o intestino e sujeitos a reduções por bactérias da flora normal (Clarke & Steinle, 1995). Assim, nem o corante nem seus metabólitos tem grande potencial de bioacumulação. Entretanto, os riscos crônicos destes tipos de corantes e intermediários levam em consideração suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas (Jung, 1996). A exposição dos corantes dispersos à

pele e/ou ao sistema respiratório podem se tornar rotas perigosas, pelas quais estas substâncias podem ser absorvidas e promover a sensibilização da pele (dermatites) ou das vias respiratórias (Hausen, 1993).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo empregado pertence a família de azocorantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupos $-N=N-$ ligados a sistemas aromáticos (Figura 1; Mohorčič et al., 2004; Kunz et al., 2002). Os azocorantes representam cerca de 65% dos corantes atualmente utilizados no mundo, sendo extensivamente utilizados no tingimento de fibras têxteis (Fungaro et al., 2009).

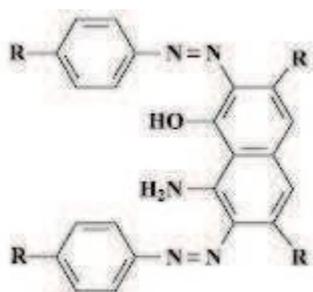


Figura 1: Exemplo de uma estrutura química característica de um grupo cromóforo de um azocorante (Ferraz, 2008).

1.2. A ecotoxicologia aquática como indicadora de impactos de poluentes sobre o ecossistema

A realização apenas de análises químicas para a avaliação ambiental não retrata o impacto causado pelos poluentes adequadamente, pois não demonstra os efeitos sobre o ecossistema, apenas infere sobre as potenciais causas (Buss et al., 2008). Somente os sistemas biológicos podem detectar os

efeitos tóxicos das substâncias (Marschner, 1999; Lombardi, 2004). A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente (Burton Jr., 1992). Além disso, a determinação de substâncias isoladas através de análises químicas tradicionais não fornece resposta sobre qual tipo de agente químico está sendo responsável pela toxicidade e informações sobre as possíveis interações entre substâncias (aditivas, antagônicas ou sinérgicas), como também da biodisponibilidade das mesmas (Blaise, 1984).

Os efeitos adversos nos organismos incluem tanto efeitos letais, expressos em mortalidade ou sobrevivência (em bioensaios agudos ou crônicos), quanto os efeitos subletais, que são mudanças no desenvolvimento, crescimento, comportamento, reprodução, atividades de entrada e detoxicação e estrutura dos tecidos (Rand, 1995). Segundo o mesmo autor efeitos adversos em cada indivíduo incluem indução ou inibição de enzimas, ou de sistemas enzimáticos e suas funções associadas. Além disso, devido ao fato de a exposição a agentes tóxicos ocorrer pela água, sedimento e alimento, as quantidades, concentrações e a biodisponibilidade desses agentes nesses compartimentos são de fundamental interesse.

A Resolução CONAMA 357/2005 estabelece a classificação dos corpos d'água, dá as diretrizes ambientais para o seu enquadramento e também regulamenta as condições e padrões de lançamento de efluentes no meio ambiente. Nesta resolução são claramente proibidos o lançamento de substâncias ou efluentes em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida, considerando que a saúde e o bem-estar humano, bem como o

equilíbrio ecológico aquático, não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas.

Esta resolução limita uma série de potenciais contaminantes no ambiente e acrescenta em seu artigo 7, inciso 4, que “*as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigados utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos ou outros métodos cientificamente reconhecidos*”. Acrescenta ainda que no caso de lançamentos de efluentes líquidos industriais provenientes de indústrias químicas, petroquímicas e siderúrgicas, poderão ser estabelecidas exigências adicionais para cada caso específico, em termos de toxicidade crônica (CONAMA 357/2005). Porém, a resolução não explicita as concentrações dos mesmos nos sedimentos, deixando este campo carente de informações, pois existem poucos estudos relacionados à contaminação nos sedimentos.

A Resolução CONAMA 357/2005 é uma legislação federal e por isso permite a formulação de leis mais restritas de acordo com a necessidade de cada estado brasileiro, ficando livres para estabelecerem seus próprios limites de toxicidade. Muitos são os laboratórios de instituições oficiais que realizam testes de toxicidade. Cada vez mais esta ferramenta tem sido reconhecida como um forte instrumento de avaliação de impacto ambiental. No Brasil o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Companhia Estadual de Tecnologia Ambiental (CETESB), Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina (FATMA-SC), Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA-RJ), Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM-RS), Instituto Ambiental do Paraná (IAP-PR) e a Companhia Pernambucana de Meio

Ambiente (CPRH-PE), recomendam a utilização da análise de toxicidade através de testes com organismos padronizados internacionalmente como um instrumento para avaliação do potencial de impacto das substâncias químicas ou efluentes lançados no ambiente (Magalhães & Ferrão Filho, 2008).

1.3. Importância dos sedimentos em ecossistemas aquáticos

Os sedimentos podem ser considerados uma das matrizes mais complexas existentes nos ecossistemas aquáticos, ele é constituído tipicamente por uma mistura de argila, areia, sais minerais e matéria orgânica. Desde a gênese do material particulado em solução, o qual ocorre a adsorção de inúmeros compostos, até sua sedimentação no leito dos rios, lagos ou reservatórios. Sua composição pode variar desde totalmente mineral até com predominância orgânica, dependendo de fatores naturais e antrópicos. (Jardim et al., 2006).

O sedimento possui grande importância para os ecossistemas aquáticos, pois ele serve como fonte de recursos de matérias orgânicas e inorgânicas. Grande parte do material alóctone e autóctone fica depositada nos sedimentos, como por exemplo, metais pesados e compostos organoclorados. Estes químicos se adsorvem ao sedimento e aos materiais orgânicos, tendo seu destino final nos sedimentos, podendo acumular-se em concentrações superiores àquelas encontradas no meio líquido e acarretar efeitos agudos e crônicos para as comunidades que vivem ou entram em contato com os sedimentos (Burton Jr. & MacPherson, 1995; Boldrini et al, 1990; Power & Chapman, 1992).

Uma vez no sedimento, esses contaminantes podem ficar associados a certas fases dos sedimentos, tornando-se não-biodisponíveis no ecossistema; sofrer transformações químicas, originando formas mais ou menos tóxicas; ou ainda migrar do sedimento para os organismos bentônicos ou para a coluna d'água. Níveis elevados de contaminantes persistentes no sedimento podem ou não acarretar efeitos para a biota aquática. A capacidade de adsorção do sedimento depende da sua composição, das suas características físico-químicas, bem como, da qualidade e da quantidade de matéria orgânica e do pH (Davies et al., 1999; Jardim et al., 2006). Dada a sua capacidade em acumular compostos orgânicos e inorgânicos, principalmente por processos de decantação, é um dos compartimentos mais importantes a serem estudados na avaliação do nível de contaminação dos ecossistemas aquáticos (Power & Chapman, 1992).

Uma vez que as comunidades bentônicas integram todos os fatores ambientais aos quais estão expostas, a análise da estrutura dessas comunidades fornece boa indicação dos efeitos dos poluentes associados aos sedimentos. No entanto, apesar de a estrutura da comunidade bentônica responder de forma razoavelmente previsível às variações ambientais e relações bióticas como competição e predação, a importância destas variações pode variar em função do nível de contaminação existente. Além disso, fatores como o tamanho da área estudada e a duração do estudo podem limitar a interpretação dos dados obtidos (Diaz, 1992).

Os testes de toxicidade permitem avaliar efeitos interativos de misturas complexas presentes nos sedimentos sobre os organismos aquáticos. Esses testes medem, portanto, os efeitos tóxicos das frações biodisponíveis

presentes nos sedimentos, em condições controladas de laboratório ou através de testes em campo. Desta forma, os resultados dos testes de toxicidade são úteis para o estabelecimento de concentrações aceitáveis de contaminantes que estão presentes no sedimento, isto é, concentrações em que não se esperam efeitos para os organismos bentônicos (Jardim et al., 2006).

Os resultados dos testes de toxicidade, juntamente com os dados da estrutura da comunidade bentônica e de contaminação, são ferramentas importantes tanto para a avaliação da qualidade do sedimento como para o gerenciamento de material dragado e orientação na tomada de decisões quanto à necessidade de limpeza e recuperação de sedimentos (Jardim et al., 2006).

1.4. Uso da ecotoxicologia na avaliação de sedimentos

Existem vários organismos utilizados para testes ecotoxicológicos com sedimentos, *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) é um anfípodo utilizado e já possui protocolos estabelecidos (OECD, 1997; USEPA, 2000; ASTM, 2003). Várias espécies de *Daphnia* são utilizadas em água e também em testes com sedimentos, possuindo protocolos para este procedimento (NBR 12713:2004). *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) e *Chironomus tentans* (Fabricius, 1805) são muito utilizados no exterior para testes com sedimentos (USEPA, 2000; OECD, 2004). No Brasil, *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) vem sendo utilizado pela CETESB em uma análise ambiental, denominada como tríade de qualidade dos sedimentos, formada pela integração de análises químicas, biológicas e ecotoxicológicas (Chapman, 1986, 1989, 1990; Chapman et al.,

1997). Apesar desta diretriz de uso de *Chironomus xanthus* para testes com sedimentos, ainda não há uma norma técnica nacional, sendo sugerida a utilização da metodologia empregada pela EPA (2000) para *Chironomus tentans* (Dornfeld, 2006).

Geralmente usam-se, para efluentes de indústria têxtil, testes ecotoxicológicos com várias espécies de *Daphnia* (Villegas-Navarro et al, 2000; Immich et al, 2009). *Daphnia* spp. são organismos de coluna d'água e possuem protocolos estabelecidos pela ABNT (NBR 12713:2004), e que vêm sendo utilizados pela CETESB e por nosso Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/FIOCRUZ). No entanto, muitos corantes são insolúveis, como os corantes a base de enxofre, corantes azóicos, corantes dispersivos, entre outros. Estes corantes são adsorvidos pelos sedimentos e se acumulam ficando mais biodisponíveis para a fauna aquática bentônica. Larvas da família Chironomidae são os organismos bentônicos mais usados para testes de toxicidade com sedimentos, por serem de fácil manutenção em laboratório, possui reprodução abundante de organismos e baixo custo de manutenção (Burton Jr., 1991; Ingersoll, 1995; Fonseca, 2004; Dornfeld, 2001), sendo particularmente empregado em testes de avaliação de impactos de pesticidas (Akerblom et al, 2008; Binelli et al, 2008). A utilização dos sedimentos para estes organismos é de extrema importância porque eles vivem e se alimentam de partículas dos sedimentos e são diretamente expostos a compostos tóxicos pelo contato do corpo e indiretamente através da contaminação pela ingestão de alimentos (Fonseca, 2004).

2. HIPÓTESE

Chironomus xanthus são sensíveis aos azocorantes disperso azul marinho e reativo amarelo ouro e podem ser usados em testes de ecotoxicidade em sedimentos como organismos-teste, porque vivem e se alimentam de partículas dos sedimentos em todo seu estágio larvar.

3. OBJETIVO

Avaliar a ecotoxicidade de azocorantes disperso e reativo utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis* como organismos-teste.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o procedimento operacional padrão da cultura da larva de *Chironomus xanthus*;
- Determinar o procedimento operacional padrão do teste de ecotoxicidade aguda da larva de *Chironomus xanthus*;
- Analisar a influência do tipo de sedimento (natural ou artificialmente construído) sobre a fauna aquática bentônica;
- Determinar a CL₅₀, testando a toxicidade aguda dos azocorantes têxteis na larva de *Chironomus xanthus*;
- Determinar a CE₅₀, testando a toxicidade aguda dos azocorantes têxteis, utilizando *Daphnia similis*;

- Determinar a concentração dos azocorantes transferida ao sedimento após o período de incubação nos sedimentos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Corantes Avaliados

Os corantes estudados foram o corante disperso Marinho CC (CI Disperse Violet 93:1; Tabela 1; Figura 2) e o corante reativo amarelo ouro RGB Gran (CI Reactive Orange 107; Tabela 2; Figura 3). Os corantes reativos são corantes hidrofílicos, enquanto os dispersos são praticamente insolúveis em água e aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão. Ambos contém o grupo cromóforo azo.

Tabela 1: Características gerais do azocorante azul marinho

Nome genérico	CI Disperse Violet 93:1
Cromóforo	Azo
Absorbância Máx. no comp. de onda	590 nm
Classe	Disperso
Grupo reativo	Não possui
Estado físico	Pó
Cor	Azul
Solubilidade em água	Dispensável
pH	8,0 (20 C, 10 g/L)
Metais pesados	Não possui

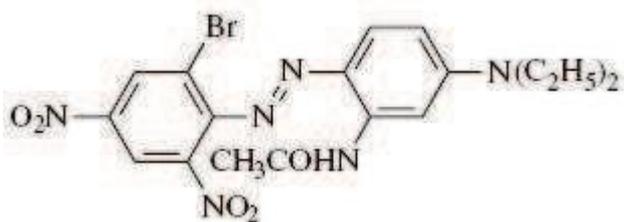


Figura 2: Estrutura química do azocorante disperso azul marinho (Umbuzeiro, 2006)

Tabela 2: Características gerais do azocorante Amarelo ouro

Nome genérico	CI Reactive orange 107
Cromóforo	Azo
Absorbância Máx. no comp. de onda	410 nm
Classe	Reativo
Grupo reativo	Vinilsufona
Estado físico	Granulado
Cor	Vermelho escuro
Solubilidade em água	50g/L (20 C)
pH	5,0 – 7,0 (20 C, 10 g/L)
Metais pesados	Não possui

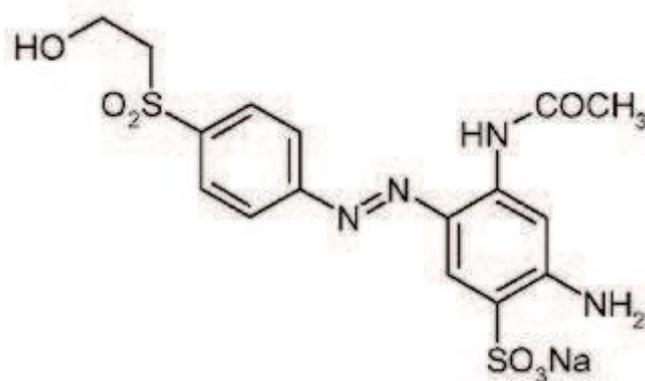


Figura 3: Estrutura química do azocorante reativo amarelo ouro (G€ubitz et al., 2004)

5.2. Medidas espectrofotométricas para determinação das concentrações efetivas dos azocorantes nos testes ecotoxicológicos

Para determinar indiretamente a concentração real dos azocorantes (corante disperso Marinho CC e corante reativo amarelo ouro RGB Gran) nos sedimentos utilizados nos testes ecotoxicológicos, utilizou-se medidas espectrofotométricas. Experimentos com soluções padrão, em condições análogas aos testes ecotoxicológicos – sem, contudo adicionar os organismos-teste, foram realizados com o objetivo de conhecer como a concentração dos corantes varia ao longo do período de transferência dos mesmos para os sedimentos, de 10 dias.

A justificativa para a realização destes experimentos deve-se ao possível comportamento instável dos corantes em solução ao longo do período de impregnação dos sedimentos e ao desconhecimento dos coeficientes de partição destas substâncias entre as soluções aquosas e os sedimentos. Para as análises, usou-se o espectrofotômetro UV-visível SPECTRONIC GENESYS 5, com cubetas de vidro com 0,5 cm de caminho óptico.

Inicialmente, foram definidos através de uma varredura espectrofotométrica, os comprimentos de onda ótimos para as análises, onde ocorrem a absorção máxima para cada um dos corantes testados: 590 nm para o azocorante disperso azul marinho e 410 nm para o azocorante reativo amarelo ouro.

Em seguida, foram construídas curvas de calibração (anexo I e II) relacionando as absorbâncias de soluções padrão dos corantes estudados, nos respectivos comprimentos de onda determinados e suas concentrações. As concentrações foram escolhidas em função da solubilidade dos corantes em água e dos níveis que seriam utilizados nos testes ecotoxicológicos. Para o azocorante disperso azul marinho utilizou-se as concentrações de: 2,5 mg/L; 5,0 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L; 30 mg/L; 40 mg/L; 50 mg/L; 60 mg/L; 70 mg/L e 80 mg/L; enquanto para o corante reativo amarelo ouro as concentrações foram: 2,5 mg/L; 5,0 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L; 30 mg/L; 40 mg/L e 50 mg/L.

Foram utilizados simultaneamente dois tipos de sistemas, em duplicata, nos experimentos: o primeiro sistema continha apenas as soluções aquosas dos corantes nos mesmos recipientes usados para os testes ecotoxicológicos; no segundo tipo, além das soluções dos corantes foram adicionados os sedimentos empregados neste estudo. O objetivo do primeiro sistema era avaliar a possível degradação dos corantes devido à fotooxidação ou mesmo da sua ad-

sorção as paredes dos recipientes, ao longo do período do experimento (10 dias). O segundo sistema teve como finalidade quantificar a quantidade de corante que foi transferida da solução aquosa para os sedimentos ao longo do experimento.

Para a quantificação espectrofotométrica das concentrações dos dois corantes nas soluções aquosas dos diferentes sistemas, foram retiradas alíquotas das soluções de todos os sistemas ao longo de 10 dias. Para os experimentos utilizaram-se soluções padrão nos mesmos níveis dos testes ecotoxicológicos (25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L e 200 mg/L) de ambos os corantes. Para o cálculo da massa do corante que foi transferida da solução para os sedimentos subtraímos a concentração do corante em solução no final do experimento da sua concentração no início do experimento, corrigindo as possíveis perdas dos corantes por fotooxidação ou adsorção, e multiplicamos pelo volume da solução utilizada. Esta informação é importante para determinarmos a concentração que entrou efetivamente em contato com o organismo-teste (concentração efetiva), pois pode ser diferente da concentração utilizada na solução inicial (concentração nominal).

5.3. Organismos-teste

Um organismo-teste selecionado foi a espécie bentônica *Chironomus xanthus* Rempel 1939 (Chironomidae, Diptera). A escolha desta espécie deve-se, principalmente, à facilidade na obtenção e manutenção em grande quantidade, baixo custo de produção e manutenção, ser uma espécie nativa e tipicamente bentônica, além de já ter sido utilizada em estudos ecotoxicológicos an-

teriores (Fonseca, 1997; Dornfeld, 2006; Zoratto, 2007; Araújo, 2005; Costa, 2007).

Chironomus xanthus tem ciclo de vida que dura em média 13 dias (12-15 dias) e possui quatro estágios: ovo, larva (de primeiro, segundo, terceiro e quarto instar), pupa e adultos com grande sobrevivência de organismos em todos os estágios larvais (figura 4), o que possibilita a sua utilização como organismo-teste (Fonseca 2004). Os dois últimos estágios duram um curto período de tempo. Em contrapartida, a maior parte do ciclo de vida ocorre no período larval bentônico. Caso seja adquirida energia suficiente nesse estágio, os adultos não precisam mais se alimentar (Oliver, 1971; Fonseca, 2004.). A larva vive associada ao sedimento, com a cabeça para fora dos tubos formados por algas, partículas de sedimentos ou outras partículas disponíveis. Para se alimentarem, ingerem silte, detritos, perifíton e outras partículas disponíveis na superfície do sedimento (Rasmussen, 1984). As larvas apresentam cabeça completa, bem desenvolvida, não retrátil e com mandíbulas com movimentos de oblíquo a horizontal, corpo segmentado, alongado, estreito e sem pernas torácicas, apresentam dois pares de pseudópodes (localizados ventralmente nos segmentos protorácico e anal) e um par de procercos (localizado dorsalmente no segmento anal, cada um com um tufo de cerdas em seu ápice) (Armitage et. al., 1995), cápsula cefálica com a região gular com mancha castanho-escura e a configuração da mandíbula com 3 dentes (Correia, 2004).

Após o estágio de pupa os adultos emergem da água e se acasalam, juntando a massa de ovos nas plantas aquáticas ou outros objetos que estejam em contato com a superfície aquática (Learner & Edwards, 1966). A oviposição ocorre na superfície da água. Algumas vezes a massa de ovos é fixada na ve-

getação. Em outros casos, a oviposição ocorre com a massa de ovos presa nas pernas da fêmea mergulhada na água. Essa massa de ovos é protegida por uma matriz gelatinosa que se expande na água e é muito adesiva. A fêmea coloca de 500 a 600 ovos dispostos em forma de espiral. Após o período de 44 a 48h ocorre a eclosão das larvas, as quais iniciam a construção dos casulos a partir do segundo estágio de vida (Fonseca 2004).

O ritmo de desenvolvimento dos mosquitos depende da disponibilidade alimentar e temperatura. Eles vivem em ambientes lênticos ou lóticos, águas pobres ou ricas em oxigênio ou geladas ou quentes. Os adultos possuem estrutura mais uniforme do que os estágios imaturos (Oliver, 1971).

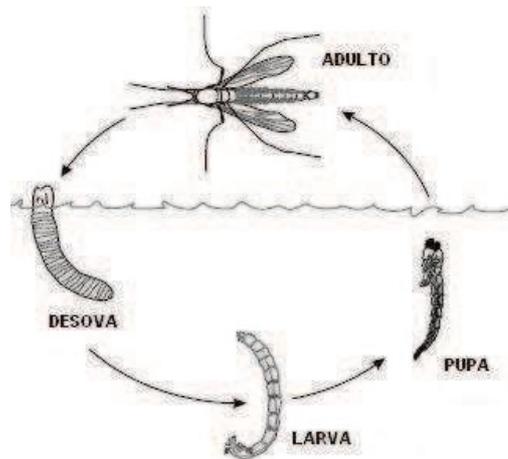


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de vida do Chironomidae (Ristola, 1995)

O segundo organismo-teste escolhido foi a *Daphnia similis* Claus, 1876. As espécies do gênero *Daphnia* também conhecidas como pulgas-d'água, são uma importante fonte de alimento para peixes. As espécies mais utilizadas em testes de laboratório são *Daphnia similis* e *Daphnia magna* as quais não ocorrem naturalmente no Brasil. Dafnídeos são animais ideais para utiliza-

ção em testes de toxicidade, pois são bastante sensíveis a poluentes e facilmente cultivados em laboratório (Frear & Boyd, 1967).

As espécies de *Daphnia* têm cerca de 0,5 a 5,5mm de comprimento e uma carapaça bivalve transparente que encerra todo o corpo, com exceção da cabeça e antenas. Os cladóceros são organismos filtradores; suas pernas torácicas, compostas por cerdas, agem como peneiras, que retêm algas, bactérias e pequenas partículas de material orgânico da água. O alimento é transferido para a boca, onde é moído pelas mandíbulas e direcionado para o trato digestivo. A retenção do alimento no trato digestivo é aproximadamente de meia hora a 3 horas (Buikema & Sherberger, 1977).

Como em todos os artrópodes, o crescimento ocorre imediatamente após a muda (ecdise). Fases pré-adultas mudam quase diariamente, enquanto adultos o fazem a cada 2 ou 3 dias. Os dafinídeos se tornam reprodutivamente maduros do 3º ao 6º estágio (dependendo da espécie) e, em condições favoráveis, produzem crias de 4 a 65 jovens imediatamente antes de cada muda. A reprodução é partenogenética, dando origem a populações constituídas inteiramente por fêmeas, até que ocorra um estresse ambiental, como superpopulação, falta de alimento ou mudança de temperatura. Então, surgem na cultura machos e também fêmeas com dois ovos haplóides, os quais são fecundados pelos machos. Esses ovos, envoltos de uma casca única, de cor escura rígida, altamente resistente a condições desfavoráveis, são denominados efípios (Zagatto & Bertolletti, 2006).

5.3.1 Cultura e manutenção do organismo-teste – *Chironomus xanthus*

Após levantamento bibliográfico (Oliver, 1971; Fonseca, 1997 e 2004; Dornfeld, 2006; Zoratto, 2007), verificou-se que espécies de Chironomidae eram boas candidatas como organismos-teste para avaliar impactos em sedimentos. No entanto, como não há grupos de pesquisa mantendo culturas deste organismo no Estado do Rio de Janeiro, foi feita uma visita técnica na Companhia Tecnológica de Saneamento de São Paulo (CETESB) para aprender as técnicas de manutenção e cultivo e obter exemplares dos organismos para iniciar a cultura no LAPSA/IOC/FIOCRUZ.

Os exemplares iniciais das larvas utilizadas neste estudo foram obtidos de culturas mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia da CETESB. Vale ressaltar que, por duas vezes, as larvas trazidas não se adaptaram às condições locais e todos os indivíduos morreram. As condições usadas foram: 50% de água mineral e 50% de água de um lago não contaminado por esgoto; 100% de água mineral e 100% de água reconstituída e uma camada de sedimento descontaminado cobrindo as bandejas. As culturas tiveram de ser reiniciadas com o recebimento de novas desovas.

Por fim, testou-se o volume de água ótimo, 5 litros, recomendado pela CETESB e 2 litros para as culturas, utilizando diferentes concentrações de água mineral x água do lago (100% água mineral; 80/20 e 60/40 água mineral / água do lago). Este teste indicou que em 2 litros de água com a proporção 80/20 obteve maior sobrevivência e desenvolvimento, sendo utilizada como água de manutenção. No entanto, após a cultura estabilizada utilizou-se apenas água mineral nas culturas obtendo padrões de reprodução condizentes

com o esperado, passando a ser o procedimento adotado e, desta forma, evitando possíveis contaminações provenientes da água do lago.

Outra observação relevante ocorreu durante os testes de sensibilidade (apresentados a seguir) - usados para verificar se a cultura está saudável: os organismos-controle morriam quando colocados em béqueres de vidro, mas não em potes plásticos descartáveis (similares aos usados no procedimento da CETESB). Portanto, estes recipientes passaram a ser usados também nos testes com os corantes.

Com a cultura estabilizada e saudável (ver resultados do teste de sensibilidade), determinou-se o Procedimento Operacional Padrão para o cultivo de *Chironomus xanthus* no LAPSA/IOC/FIOCRUZ. Em resumo, foram utilizadas bandejas plásticas brancas, cobertas por gaiolas de filó para a retenção dos organismos adultos (Figura 5). Para iniciar a cultura são adicionadas aproximadamente 200 larvas de III e IV instar. Nas bandejas plásticas são colocados o sedimento controle (esterilizado em mufla a 500°C por 4h) e 2 litros de água de manutenção (pH 6,5-7,5, temperatura 23-25°C e dureza de 12-16mg CaCO₃ L⁻¹), sendo que o cultivo dos organismos é mantido em constante aeração, em sala com temperatura controlada (entre 23-25°C) e fotoperíodo de 12 horas. Para a alimentação das larvas utilizou-se ração de peixes *TetraMin* na proporção de 0,04mg/ml.



Figura 5: Cultura de *Chironomus xanthus* no LAPSA-IOC-FIOCRUZ.

5.3.2 Avaliação da cultura do organismo-teste *Chironomus xanthus*

Segundo os princípios de Boas Práticas de Laboratório ou outro sistema de qualidade, como por exemplo, ISO 17025, o controle de qualidade analítico de um laboratório de ecotoxicologia inclui a calibração de equipamentos, cuidados especiais na coleta, transporte, recebimento, armazenamento e processamento de amostras e registro de dados e a validação das condições fisiológicas dos organismos durante sua manutenção, aclimatação e uso em teste laboratorial (Zagatto & Bertoletti, 2008). Portanto, cada laboratório deve ter seu programa de qualidade implementado como rotina, assegurando assim, o controle de qualidade dos organismos utilizados e, também o controle das condições mantidas durante a realização dos testes.

Na realização de testes de toxicidade, a garantia da qualidade dos resultados envolve práticas de rotina já normalizadas, dentre as quais se encontram a realização de testes agudos com substâncias de referência. O

controle de sensibilidade dos organismos, através da realização periódica de ensaios com determinadas substâncias de referência, é um procedimento que permite maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos ao longo do tempo por um mesmo laboratório ou entre laboratórios. A utilização destas substâncias permite avaliar a condição fisiológica dos organismos que serão submetidos a testes. Vários fatores, que são fundamentais para a manutenção dos organismos-teste, podem afetar a variabilidade dos resultados dos testes de toxicidade, como a qualidade da água de cultivo, qualidade e quantidade de alimento, temperatura e oxigênio (Silva, 2005).

A partir da determinação da faixa de sensibilidade para uma espécie, a sensibilidade da espécie deverá ser avaliada periodicamente para o controle de qualidade dos cultivos e dos resultados dos testes (EPA, 2002). Caso o valor da sensibilidade se encontre fora da faixa estabelecida, o teste será invalidado, como também o lote de organismos utilizados, havendo a necessidade de ser novamente realizado com um novo conjunto de organismos. A precisão analítica intra ou interlaboratorial deve ser avaliada utilizando as mesmas condições-teste, organismos e substância referência, sendo que a variabilidade dos resultados dos testes pode ser analisada através do coeficiente de variação. De forma geral, um método ecotoxicológico é considerado válido quando a variação dos resultados expressa o coeficiente de variação $\leq 30\%$ (Environment Canada, 1990).

Os testes com substâncias de referência avaliam a toxicidade aguda, expressa pela 48h-CL₅₀. A substância mais utilizada para teste com *Chironomus xanthus* é o Cloreto de potássio (Dornfeld, 2006; Fonseca 1997; Silva, 2005).

Neste estudo, os testes de sensibilidade para a avaliação da qualidade das culturas de *C. xanthus* foram realizados com larvas do II instar, de acordo com o procedimento da EPA (2000), nos quais consistiam em expor os organismos em diferentes concentrações de uma substância referência. A cultura de *C. xanthus* foi avaliada com testes nas concentrações 1,5; 2,25; 3,5; 5,0; 7,5 g/L KCl, as mesmas determinadas por Dornfeld (2001) e Fonseca (1997). Para a utilização deste teste utilizou-se uma solução estoque de 10g/L, que foi diluída até as concentrações desejadas. Dez organismos foram incluídos em cada recipiente, três réplicas por concentração (inclusive a controle), com duração de 48 horas (Figura 6).

Para considerar os resultados válidos é necessário que ao término do período de exposição a porcentagem de mortalidade no sedimento controle seja inferior ou igual a 30%; a temperatura da água deve permanecer na faixa de 23 ± 2 °C, o oxigênio dissolvido no decorrer do teste permaneça superior a 2,5mg/L e os bioensaios devem obter coeficiente de variação $\leq 30\%$.

O resultado referente ao teste de sensibilidade 48h-CL₅₀ para KCl variou de 4,68 a 5,08g/L, com média do coeficiente de variação de 27,01%. Os bioensaios ficaram dentro dos limites da faixa de sensibilidade encontradas por Fonseca (1997) de 2,6g/L a 6,4g/L (48h-CL₅₀ KCl). Em nenhum dos testes realizados os valores foram superiores a 6,4g/L (Figura 7).



Figura 6. Teste de sensibilidade da cultura de *Chironomus xanthus* no LAPSA/IOC/FIOCRUZ.

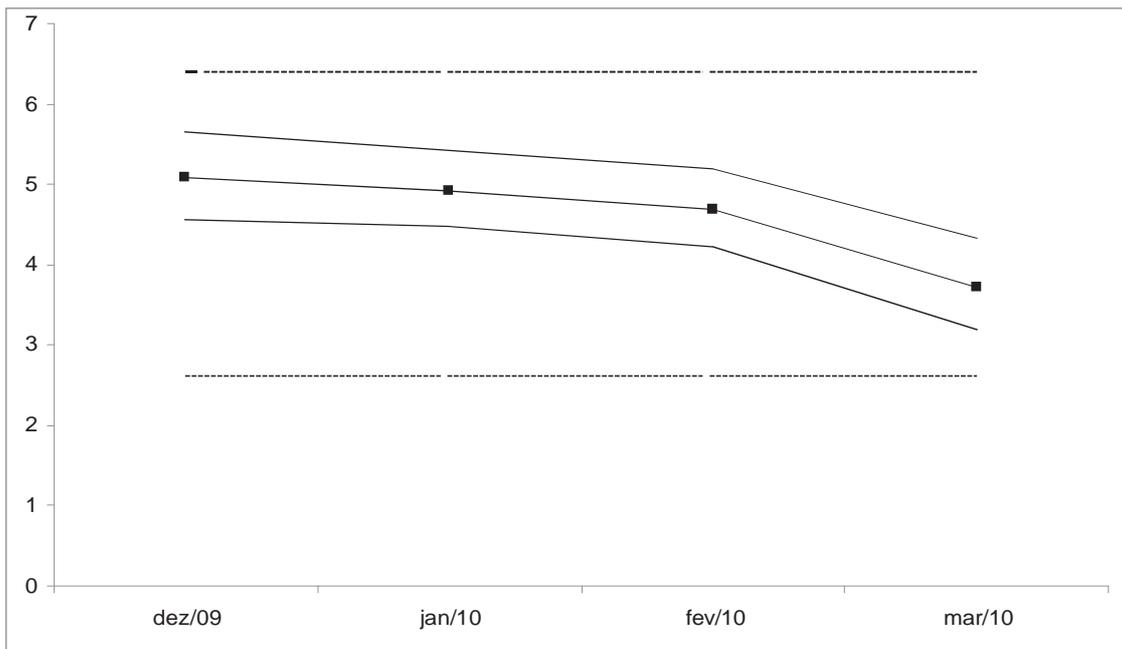


Figura 7: Teste de sensibilidade com *Chironomus xanthus* (--- : limites superior e inferior propostos por Fonseca e ■ CI₅₀ dos bioensaios, — limites superior e inferior dos bioensaios).

5.3.3 Cultura e manutenção do organismo-teste *Daphnia similis*

Em um béquer de 2000ml colocou-se no máximo 20 adultos por litro de água de cultivo (água mineral), os neonatos foram descartados, caso não tenham sido utilizados para testes ou para abrir novos lotes; a alimentação foi feita diariamente com suspensão algácea *Pseudokirchneriella subcapitata*, mantendo a proporção de $3,2 \times 10^6$ células por *Daphnia*, o béquer foi fechado com filme plástico para evitar contaminação dos organismos anotando-se a quantidade de organismos, para facilitar a alimentação. Após estes procedimentos os organismos foram colocados em câmara incubadora com temperatura controlada para 23,5 °C e fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro.

5.4. Procedimento de preparação de sedimentos para a realização dos bioensaios

5.4.1. Sedimento artificial

Os bioensaios para *Chironomus xanthus* foram realizados seguindo procedimentos descritos pela comunidade europeia (OECD, 2004), na manipulação do sedimento artificial que, segundo Akerblom et al. (2008) são vantajosos porque os testes podem ser realizados em qualquer momento e o sedimento não possui fauna indígena.

Neste estudo, o sedimento artificial foi construído com algumas modificações em relação à norma da OECD (2004), já que é utilizado para outras espécies de *Chironomus* (*C. riparius*, *C. tentans*, e *C. yoshimatsu*). O

sedimento consistiu de 4-5% de musgo do gênero *Sphagnum* – seco em forno Pasteur e macerado – 20% de argila e 75-76% de areia de quartzo (partículas de 0,3 milímetros). Uma das modificações em relação ao protocolo OECD (2004), foi a troca da água deionizada pela água de manutenção para a mistura dos compostos e não foi adicionado carbonato de cálcio, pois foi observado que *C. xanthus* possuem preferência a estas condições.

5.4.2. Sedimento natural

Além da utilização do sedimento artificial, foi feito teste com sedimento natural, coletado em uma área referência. O procedimento de lavagem e esterilização seguiu a norma da EPA (2000). O sedimento foi peneirado em malha de 300 µm, submerso em solução de ácido nítrico a 5% durante 24h. Após este período a areia foi lavada abundantemente em água corrente e colocada em mufla a 500°C durante 4 horas. Antes de ser utilizado, mediu-se o pH da água associada ao sedimento, devendo este estar entre 6,5 e 7,5. Caso o sedimento apresentasse valores fora destes limites, o sedimento era descartado. Este sedimento natural foi utilizado nas culturas.

5.5. Bioensaio de toxicidade aguda com *Chironomus xanthus*

Para que os azocorantes fossem adsorvidos ao sedimento, foi usado o procedimento descrito por Akerblom (2008): 10 dias de exposição dos sedimentos a uma solução com o corante nas concentrações de 25mg/L; 50mg/L; 100mg/L; 150mg/L; 200mg/L; 250mg/L e 300mg/L. Este procedimento foi reali-

zado tanto para o sedimento artificial quanto para o natural, de forma a permitir a comparação entre a adsorção e ecotoxicidade de cada um. As concentrações escolhidas foram para determinar a concentração letal para 50% dos *Chironomus xanthus* em 9 dias (9d-CL₅₀) e também para comparar com a concentração encontrada no efluente que varia de 10 a 200mg/L (Ali et al., 2009).

Após o período de contato da solução corante com o sedimento (10 dias), retirou-se a solução corante adicionou-se 10 larvas de segundo instar em cada pote contendo 100g do sedimento contaminado (*spiked-sediment*) e 200g de água de manutenção. Foram utilizadas 3 réplicas do controle e 3 réplicas de cada concentração para os sedimentos artificial e natural, por 9 dias, para a determinação da 9d-CL₅₀ de *C. xanthus*.

Os testes foram realizados ao abrigo da luz, para evitar fotooxidação e com temperatura de 23±2°C. A alimentação foi feita com alimento de peixe Tetramin na proporção de 0,04mg/ml a cada 48h, quando ocorre a troca de 30% da água de manutenção. Para os testes serem válidos, a mortalidade deveria ser igual ou inferior a 30% no grupo controle.

5.6. Bioensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os testes realizados com *Daphnia similis* foram feitos utilizando a metodologia da ABNT (NBR 12713:2004) que consiste na preparação do elutriato (Figura 10), esta metodologia consiste em ressuspender a contaminação associada ao sedimento para a água e depois utilizá-la no teste.

Após deixar o sedimento em contato com a solução azocorante em concentrações conhecidas (25mg/L; 50mg/L; 100mg/L; 150mg/L; 200mg/L; 250mg/L; 300mg/L; 350 mg/L; 400 mg/L; 450 mg/L e 500 mg/L; Figura 8) por 10 dias, descartou-se a solução e utilizou-se uma parte de sedimento e quatro partes de água, agitou-se no agitador magnético por uma hora (Figura 9), foi reservado em refrigeração por 24 horas, retirado o sobrenadante, centrifugado por 10 minutos em 3500rpm e filtrado.

A CE_{50} foi calculada através de testes contendo 30 neonatos com pelo menos 24h de nascido, divididos em três réplicas de 10 indivíduos por concentração. O tempo de exposição foi de 48h a 24°C e ao abrigo da luz (48h- CE_{50}). O método utilizado foi o estático, pois não houve troca do meio durante este período. Este procedimento foi utilizado tanto para testes com os elutriatos nos sedimentos natural e artificial quanto para testes com solução de azocorante em água (Figuras 10, 11 e 12). No caso dos testes realizados apenas em solução aquosa, a concentração nominal e efetiva é idêntica.



Figura 8: Sedimento impregnado com solução azocorante



Figura 9: Agitador magnético



Figura 10: Teste com elutriato e azocorante amarelo

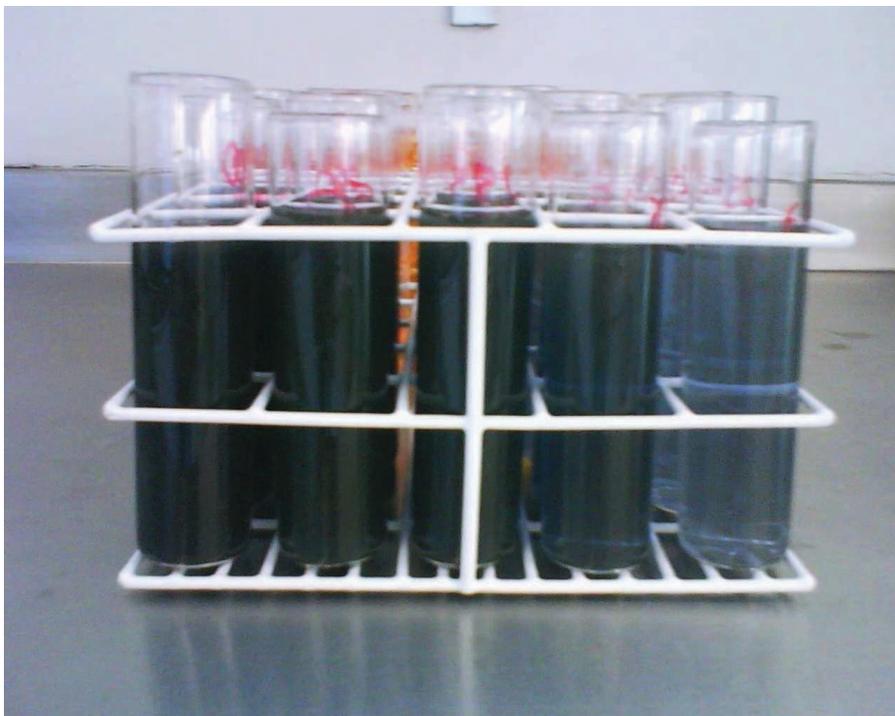


Figura 11: Teste ecotoxicológico com solução azocorante e *Daphnia similis*



Figura 12: Teste ecotoxicológico com solução azocorante e *Daphnia similis*

5.7 Análise estatística dos dados

A determinação das concentrações letais e efetivas foi realizada utilizando o teste estatístico Trimmed Spearman-Kärber (9d-CL₅₀ para *Chironomus xanthus* e 48h-CE₅₀ para *Daphnia similis*).

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para comparar a toxicidade de *C. xanthus* entre os sedimentos natural e artificial.

6. RESULTADOS

6.1. Medidas espectrofotométricas para determinação das concentrações efetivas dos azocorantes nos testes ecotoxicológicos

A quantidade da massa do corante transferida da solução para o sedimento ao longo do experimento tendeu a valores máximos de 44% e 74% para os corantes amarelo e azul respectivamente (Figs. 16 e 20). Isto sugere que o tempo de contato da solução com o sedimento utilizado nos bioensaios (10 dias) foi adequado para este tipo de teste ecotoxicológico.

A concentração do corante amarelo nos recipientes controle (sem sedimento) apresentaram redução de massa desprezível (sempre < 2%) ao longo do experimento (Figs 13; 14; 15 e 16). Nos recipientes com sedimento, observamos que aproximadamente 50% do corante foi transferido da solução para o sedimento ao longo do tempo, para todas as concentrações exceto a de 25mg/L (cerca de 30%; Fig. 13). Estes resultados indicam que a concentração efetiva do corante amarelo nos sedimentos, deve ser aproximadamente a metade da concentração inicial da solução preparada para os experimentos (concentração nominal).

A solução aquosa do corante azul apresentou comportamento diferente do azocorante amarelo ao longo do experimento, com perdas de cerca de 30% no recipiente sem sedimento. Isto pode ser explicado pela quase insolubilidade deste corante em água (DyStar, 2008), que naturalmente tende a sedimentar em soluções aquosas. No recipiente com sedimento ocorreu a remoção do corante da solução para a fração sólida ao longo do tempo, chegando a uma mé-

dia de 75% de transferência o corante para o sedimento para todas as concentrações (Figs.: 17; 18; 19 e 20).

Estes resultados demonstram a importância de trabalhar com a concentração efetiva, pois os organismos bentônicos apenas entram em contato com a concentração que ficou associada ao sedimento, sendo esta, em geral, menor que a concentração da solução. Se assumíssemos que a concentração da solução aquosa fosse igual a concentração que esta associada aos sedimentos, estaríamos subestimando a capacidade de sensibilidade dos organismos bentônicos. A concentração efetiva do corante associado aos sedimentos é a diferença da concentração da solução preparada do corante no início do período de incubação com o sedimento e a sua concentração no final.

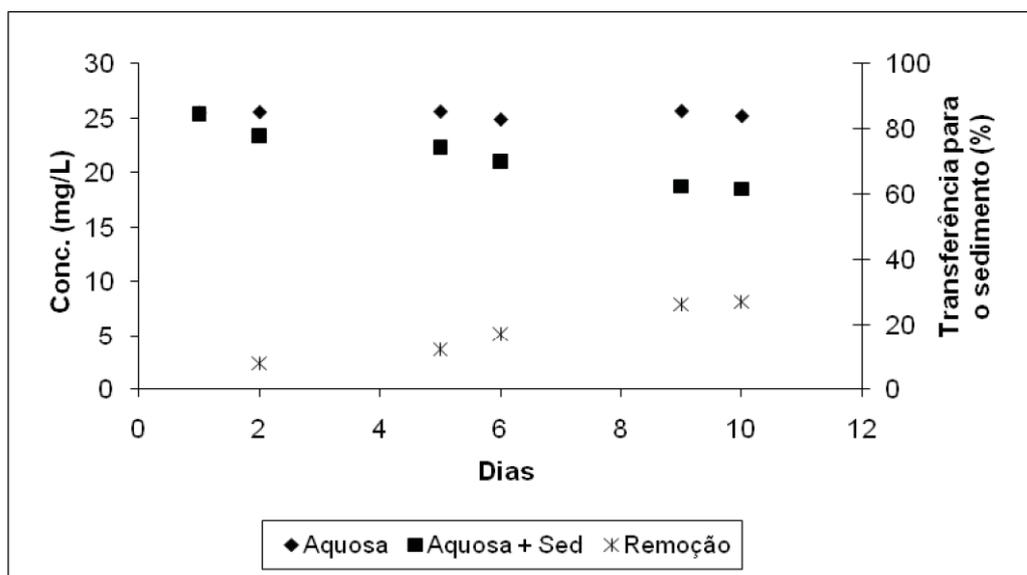


Figura 13: Concentrações do azocorante amarelo 25mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

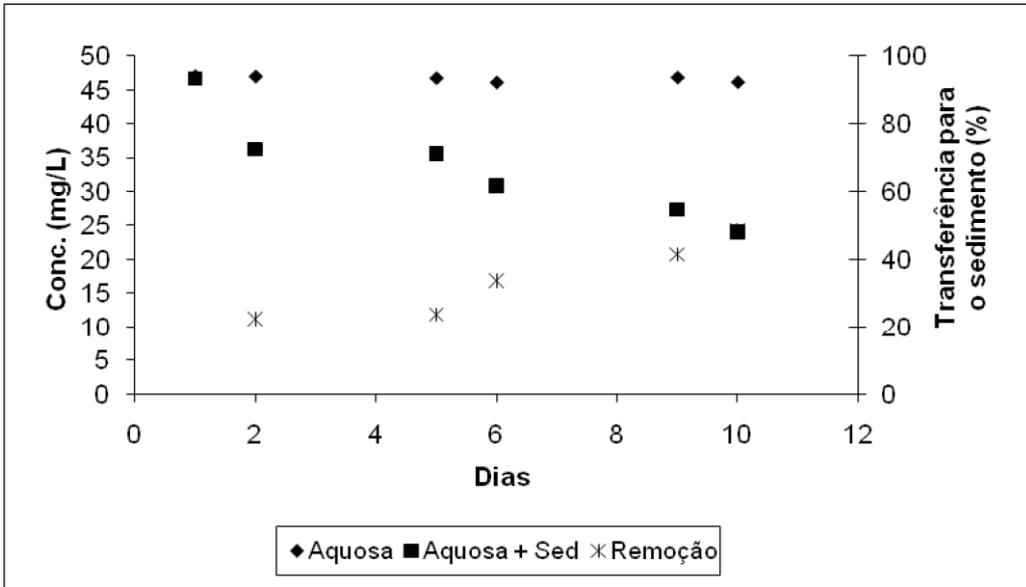


Figura 14: Concentrações do azocorante amarelo 50mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

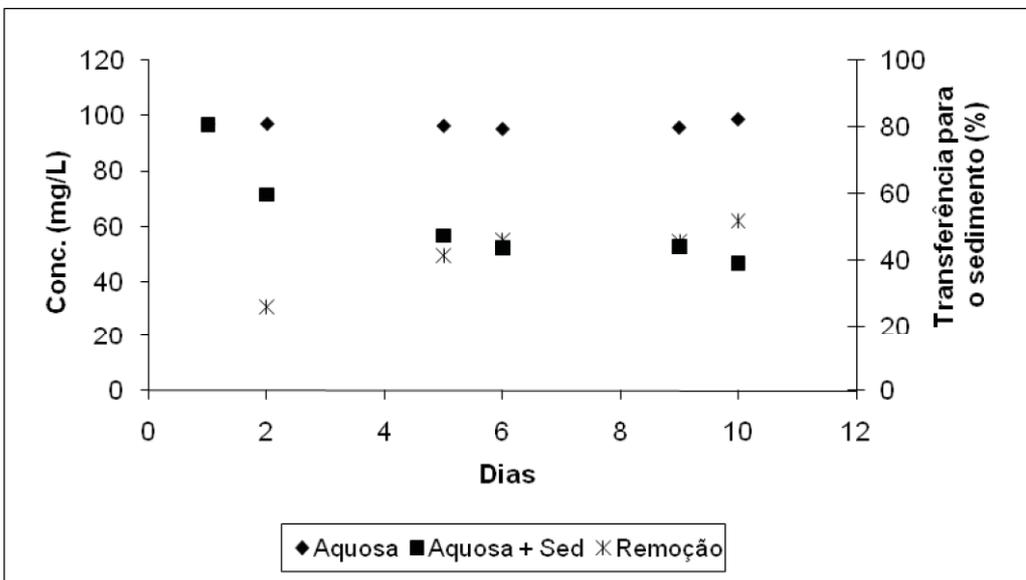


Figura 15: Concentrações do azocorante amarelo 100mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

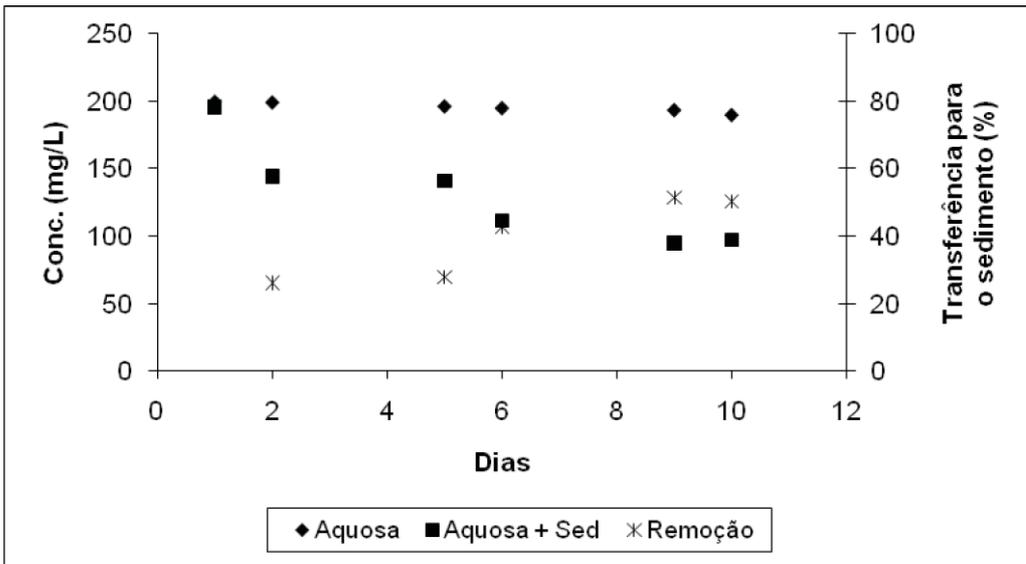


Figura 16: Concentrações do azocorante amarelo 200mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

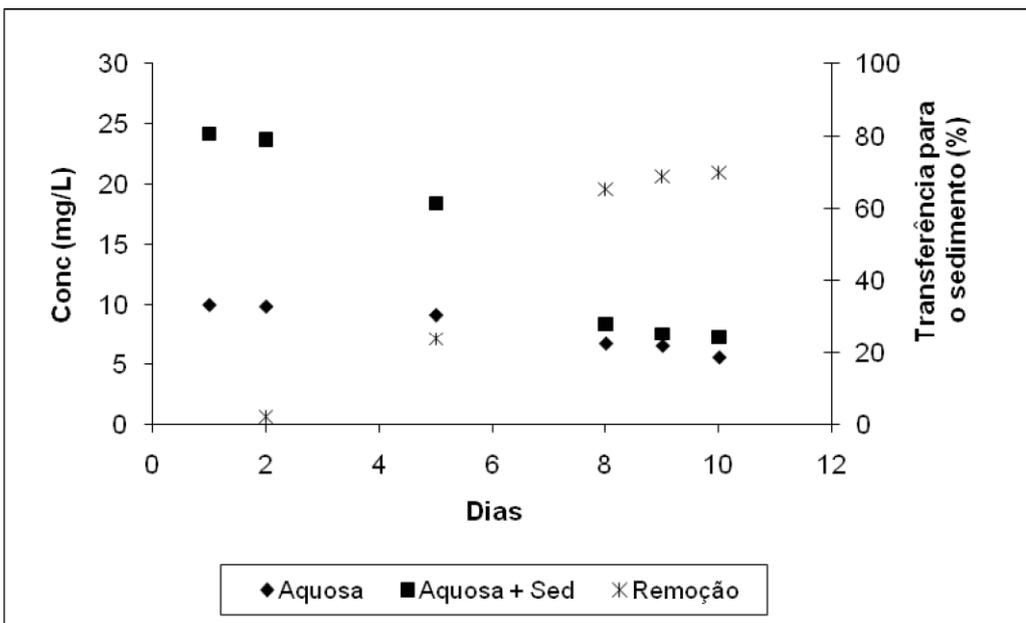


Figura 17: Concentrações do azocorante azul 25mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

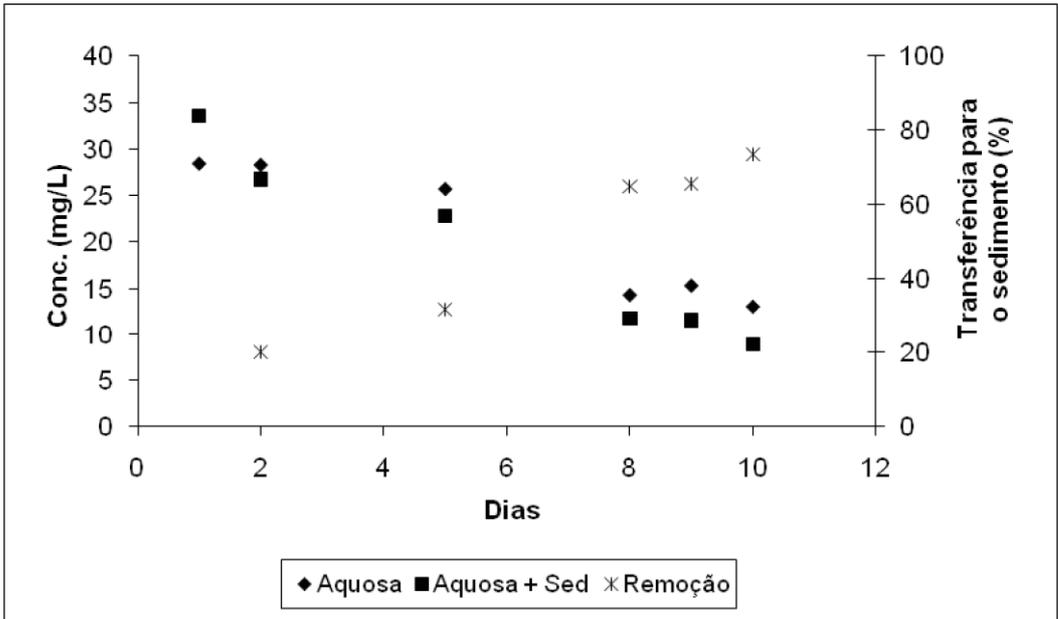


Figura 18: Concentrações do azocorante azul 50mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

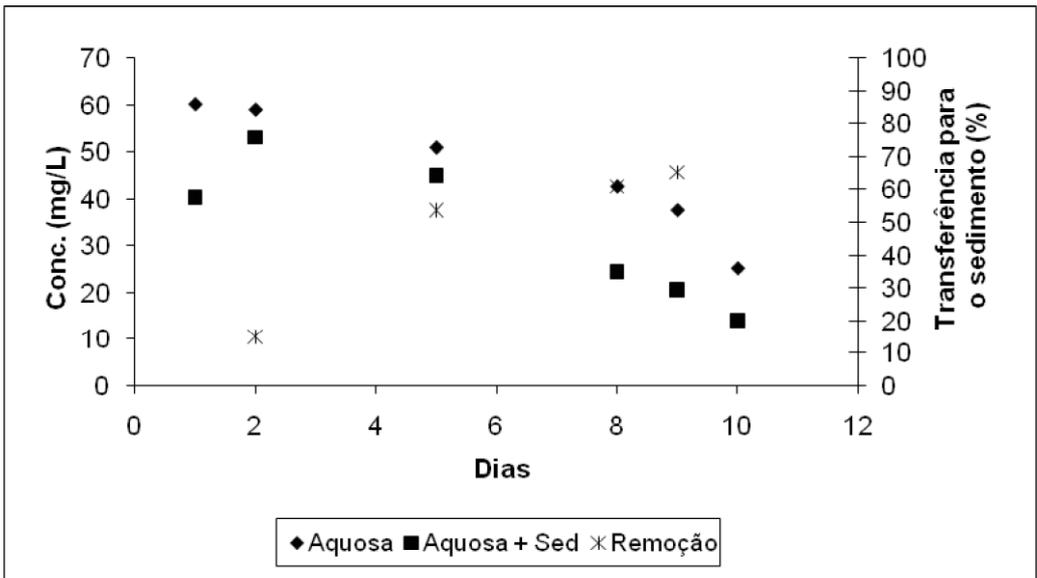


Figura 19: Concentrações do azocorante azul 100mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

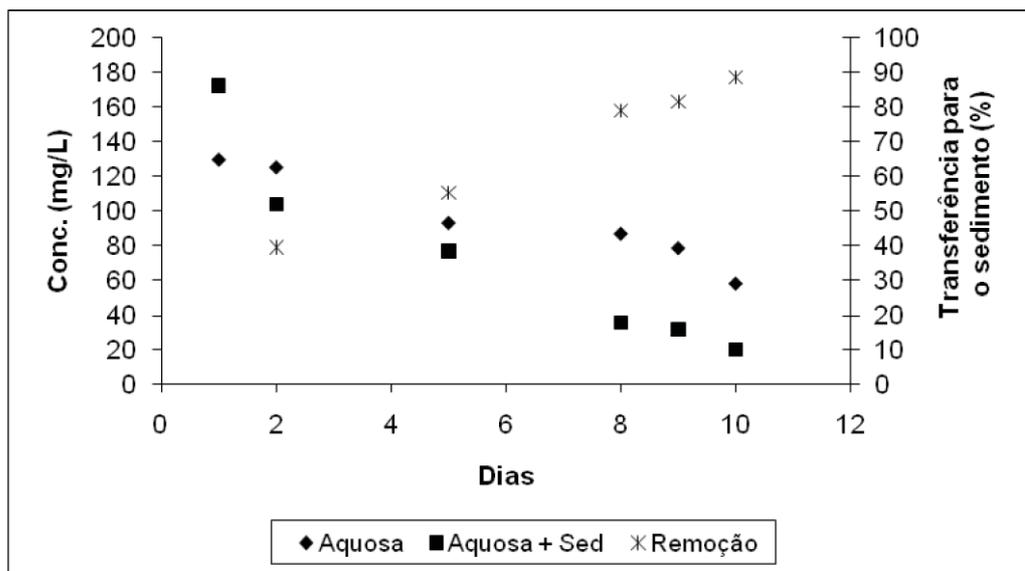


Figura 20: Concentrações do azocorante azul 200mg/L em água e água e sedimento (eixo secundário utilizado para remoção)

6.2. Concentração nominal e efetiva de bioensaios com *C. xanthus*

A concentração nominal da 9d-CL₅₀ dos azocorantes testados utilizando *C. xanthus* obtiveram valores similares entre si (Tabela 3). No entanto, considerando a 9d-CL₅₀ analisada sobre a concentração efetiva obtivemos outro resultado importante para a gestão de resíduos: o azocorante azul mostrou-se 3 vezes mais tóxico do que o azocorante amarelo.

Tabela 3. 9d-CL₅₀ (mg/L) das concentrações nominal e efetiva de *C. xanthus* em sedimento artificial e 48h-CE₅₀ de *D. similis* em solução aquosa utilizando os azocorantes azul e amarelo.

	<i>C. xanthus</i>		<i>D. similis</i>
	Conc. Nominal	Conc. Efetiva	
Azocorante Azul	98,97 (87-112)	13,14 (11-14)	2738,61 (2055-3648)
Azocorante Amarelo	88,19 (56-137)	42,04 (28-62)	423,88 (380-471)

6.3. Bioensaios ecotoxicológicos com *C. xanthus* e *D. similis*

C. xanthus foram mais sensíveis aos azocorantes do que *D. similis*. Utilizando a concentração nominal a 9d-Cl₅₀ de *C. xanthus* foi 30 vezes menor no azocorante azul (portanto, mais tóxico a baixas concentrações) e 4 vezes menor no azocorante amarelo do que a 48h-CE₅₀ de *D. similis*. Já utilizando a concentração efetiva, a diferença de sensibilidade foi ainda maior: 9d-Cl₅₀ de *C. xanthus* foi 210 vezes menor no azocorante azul e 10 vezes menor no azocorante amarelo (Tabela 3). Nos testes com *D. similis* – realizados apenas em soluções aquosas – não há distinção entre a concentração nominal e a efetiva.

Testes feitos com elutriato utilizando os dois azocorantes em concentrações até 500ppm indicaram mortalidade de cerca de 10%, não sendo possível calcular a 48h-CE₅₀. Isto sugere que há uma forte ligação dos azocorantes aos sedimentos, fazendo com que não fossem liberados para a coluna d'água e, portanto, sendo pouco tóxicos a *D. similis*.

6.3.1. Influência do tipo de sedimento nos testes ecotoxicológicos com *C. xanthus*

O tipo de sedimento, natural ou artificial, teve pouca influência na sobrevivência dos *C. xanthus*. As 9d-CL₅₀ nominais nos azocorantes azul e amarelo em ambos os sedimentos foram similares (Tabela 4). Além disso, não foram encontradas diferenças estatísticas entre o percentual de sobrevivência entre os sedimentos em nenhuma concentração do azocorante amarelo (ANOVA $p > 0,05$; Figura 21) e houve diferença apenas nas concentrações nominais de 25mg/L (ANOVA $F_{1,5} = 26,9$, $p < 0,01$) e de 50mg/L (ANOVA $F_{1,5} = 18$, $p < 0,05$) para o azocorante azul (Figura 22). Isto indica que ambos os sedimentos podem ser utilizados em testes ecotoxicológicos desta natureza.

Tabela 4: Concentrações nominais da 9d-CL₅₀ de *C. xanthus* nos sedimentos natural e artificial

	Azocorante Amarelo	Azocorante azul
Sed. Natural	85,48 (57,82-126,37) mg/L	92.53 (62,93-136,06) mg/L
Sed. Artificial	88,19 (56,75-137,05) mg/L	98.97 (87,02-112,56) mg/L

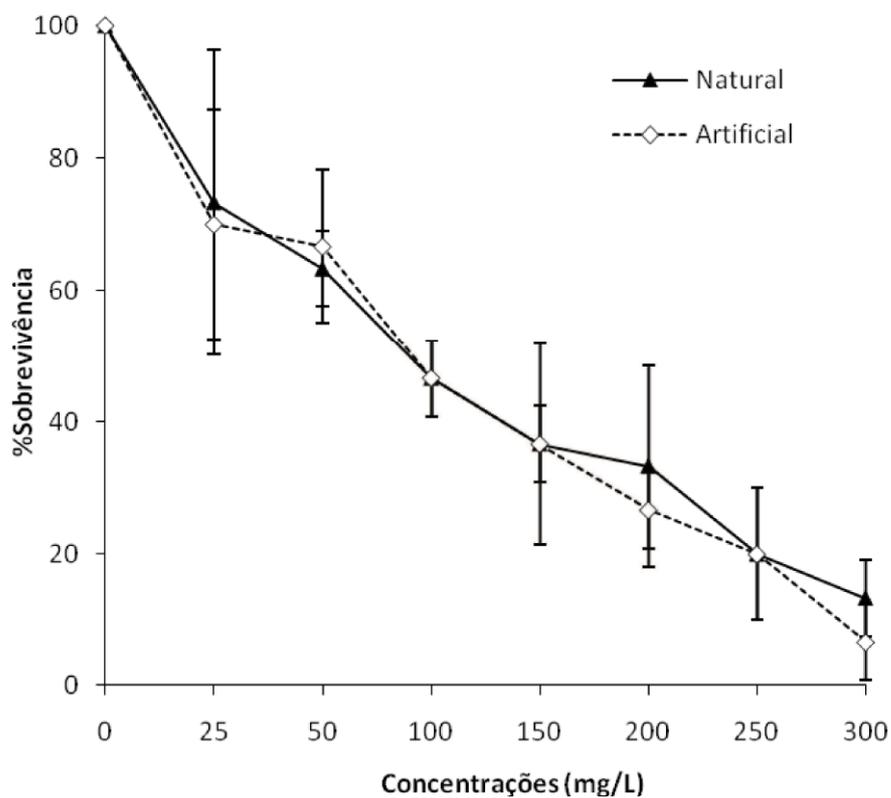


Figura 21: Percentual de sobrevivência dos *Chironomus xanthus* nos testes com sedimento natural e artificial e corante reativo amarelo ouro

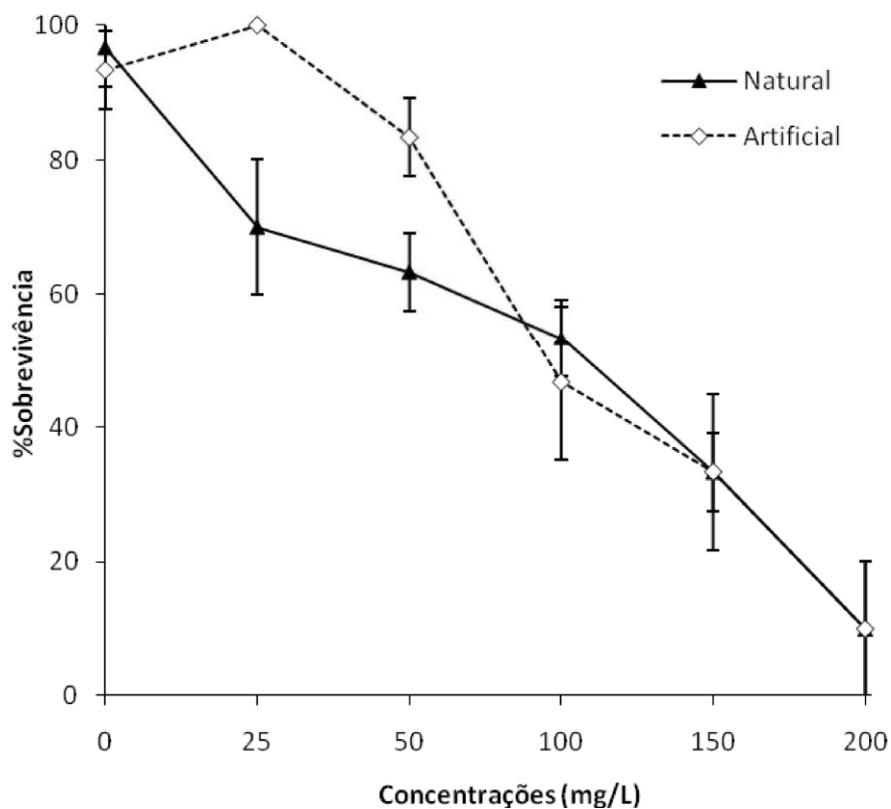


Figura 22: Percentual de sobrevivência dos *Chironomus xanthus* nos testes com sedimento natural e artificial e corante disperso azul marinho

7. DISCUSSÃO

7.1. Bioensaios ecotoxicológicos com *Chironomus xanthus*

A maior sensibilidade de *C. xanthus* aos azocorantes testados em relação a *D. similis* pode estar associada ao fato de *C. xanthus* viver e se alimentar de partículas dos sedimentos em todo seu estágio larval (Fonseca, 1997). Maund et al. (2002) também encontraram uma sensibilidade maior em organismos bentônicos do que em microcrustáceos zooplancônicos, provavelmente pela ingestão direta das partículas contaminadas e pelo fato de certos contaminantes se agregarem rapidamente ao sedimento. Segundo Silva, (2005) os microcrustáceos filtram seu alimento ingerindo partículas orgânicas muito pequenas, diferente das larvas de quironomídeos, que ingerem grande quantidade de matéria particulada e precipitada, dessa forma absorvendo mais contaminantes, além de serem organismos bentônicos, onde no seu próprio habitat já existe uma maior quantidade de azocorante adsorvido ao sedimento do que na coluna d'água, por toda sua característica química já citada.

Esta diferença de sensibilidade entre os dois organismos também pode ser explicada pelo tempo de exposição do teste ecotoxicológico que para *Chironomus xanthus* é muito superior (9 dias) ao utilizado para *Daphnia similis* (2 dias). Quanto maior o tempo de exposição do organismo à substância tóxica, sua sensibilidade aumenta consideravelmente (Haring et al. 2009).

A avaliação de toxicidade aquática utilizando várias espécies de *Daphnia* como organismo-teste, para outros tipos de azocorantes, por exemplo, o direto e o reativo têm demonstrado resultados de 48h-CE₅₀ inferiores ao

encontrado no presente estudo (Bae & Freeman, 2007). Isto indica que para estes azocorantes as Daphnias não foram sensíveis o suficiente, mas para outros azocorantes, elas respondem significativamente bem.

7.2. Influência do tipo de sedimento

Os tipos de sedimento não demonstraram diferenças quanto a sua toxicidade. Através das figuras 2 e 3 observou-se que o sedimento artificial não diferenciou do sedimento natural, obtendo o percentual de sobrevivência próximos.

Este resultado foi diferente do encontrado por Akerblom, (2008) em seu estudo com pesticidas, comparou a diferença entre os sedimentos natural e artificial, utilizando a metodologia da OECD, também utilizada no presente estudo, resultando em maior sobrevivência no sedimento natural. A explicação para este fato foi a diferença do pH, a concentração de cálcio e a quantidade de matéria orgânica que podem ter afetado a biodisponibilidade e assim, a toxicidade do pesticida. A eficiente ligação do pesticida a matéria orgânica, contribuiu para a diminuição da biodisponibilidade no sedimento natural. No entanto, Akerblom (2008) descreve que o sedimento natural utilizado em seus testes possui 12% de matéria orgânica, enquanto que o sedimento artificial possui 4 a 5% de matéria orgânica. No presente estudo a matéria orgânica no sedimento natural é praticamente zero, uma vez que é calcinado a 500°C durante 4 horas e o sedimento artificial possui 5% de matéria orgânica (musgo) e 20% de argila.

A argila é um mineral que possui grande potencial de aplicação como material adsorvente (Bouberka et al., 2005), sendo utilizada por algumas indústrias têxteis para a adsorção da cor, possuindo a capacidade de remoção para uma grande variedade de poluentes orgânicos e pesticidas e até mesmo para remoção de metais pesados (Bouberka et al., 2005; Lyim & Guçlu, 2009).

Alguns pesquisadores testaram a capacidade de adsorção da argila natural ou quimicamente modificada (Bouberka et al., 2005; Lyim & Guçlu, 2009; Tahir & Rauf, 2006; Baskaralingam et al., 2006) observando que de acordo com a estrutura do corante, pH e tempo de exposição aumentam o efeito de adsorção do corante na argila, podendo chegar até a remoção de 99% em apenas 15 minutos. Lyim & Guçlu (2009), observaram que a argila natural foi capaz de adsorver em apenas 8 horas 45mg de corantes básicos /g de argila, e de acordo com o aumento do tempo de exposição do corante, aumentava também a adsorção. Estes resultados são relevantes para o presente estudo, uma vez que a composição do sedimento artificial possui 20% de argila e o período de incubação para a utilização do teste ecotoxicológico com *Chironomus xanthus* e para o elutriato com *Daphnia similis* é de 10 dias, sendo então o azocorante provavelmente bastante adsorvido ao sedimento.

7.3. Determinação da concentração de azocorante associada ao sedimento

A utilização da espectrofotometria para avaliação da concentração de corantes em amostras é um procedimento tradicionalmente utilizado (Bouberka et al., 2005; Lyim & Guçlu, 2009; Galindo & Kalt, 1999; Gurses et al., 2006;

Rehorek et al., 2004; Forgacs et al., 2004; Cunico et al., 2009), sendo uma metodologia rápida e eficiente. Através desta metodologia, observou-se grande transferência do azocorante azul da solução para os sedimentos. Isto pode ser explicado pela baixa solubilidade do corante, formando apenas suspensão aquosa. Assim, grande parte deste azocorante depositou no fundo do pote ou se associou diretamente ao sedimento, ao longo dos dez dias de experimento, e concentração da suspensão diminuiu de maneira expressiva.

O azocorante amarelo teve comportamento diferente, tendo menos de 2% de diminuição da concentração, controle onde não havia sedimentos. Em todas as concentrações testadas o percentual de adsorção foi similar, chegando a quase 50%. Observou-se ainda que o tempo de impregnação dos sedimentos com este azocorante foi adequado para obter concentração máxima de adsorção no sedimento. Este resultado observado entre os dois azocorantes foi esperado, uma vez que possuem características químicas diferentes e já mencionadas.

7.4. Bioensaios ecotoxicológicos com *Daphnia similis*

Os testes feitos utilizando elutriato para *Daphnia similis* não resultou na 48h-CL₅₀, causando mortalidade/imobilidade de apenas 10% dos organismos. Apesar desta metodologia ser padronizada pela ABNT (1993), alguns autores a criticam, pois as condições utilizadas no processo de extração do contaminante não são idênticas as condições utilizadas em campo; o contaminante que está associado ao sedimento pode não ser totalmente liberado utilizando esta metodologia. As respostas ecotoxicológicas utilizando elutriato tendem a ser menos

sensíveis do que os testes com exposições no próprio sedimento, resultando dados menos confiáveis do quanto de contaminante realmente se depositou no sedimento (Burton Jr & Macpherson, 1995). Por outro lado, existem pesquisadores que compararam a técnica com a exposição direta ao sedimento utilizando organismos de coluna d'água e organismos bentônicos e obtiveram resultados similares, indicando que o elutriato é uma técnica de baixo custo, rápida e eficiente para contaminações com metais pesados e contaminações orgânicas (Haring et al., 2009; Burton et al., 1996; Yegane et al. 2008; Marin et al. 2001). Porém, esta não é uma técnica suficiente para monitorar, em todos os casos de contaminação, como o risco em potencial dos sedimentos (Ahlf and Wild-Metzko 1992; Burton 1992; Burton et al. 1996; Liß and Ahlf 1997).

7.5. Cultura e manutenção do organismo-teste – *Chironomus xanthus*

Observando que cada laboratório possui suas peculiaridades e o clima de São Paulo é totalmente diferente do Rio de Janeiro, foi necessário fazer um procedimento operacional padrão para a cultura das larvas de *Chironomus xanthus* que se adequasse melhor as nossas condições laboratoriais, mantendo as larvas em perfeitas condições para os testes ecotoxicológicos.

Os primeiros testes foram negativos, causando mortalidade das larvas ou quando se tornavam adultos, não se reproduziam. Após modificações na quantidade de água e sedimento e utilização de água mineral no lugar de água reconstituída ou uma parte de água mineral e outra parte de água do lago, chegamos ao ideal para manter a cultura estável e com reprodução bem acentuada. Além de diminuirmos variáveis ambientais como a água do lago

que apesar de não receber fonte poluidora, poderia ter algum componente químico proveniente de chuva ácida ou outra variável ambiental ou antrópica. Com a cultura saudável e altamente reprodutiva, observou-se que nos meses de inverno, apesar de ficarem em sala com temperatura controlada, observou-se diminuição de larvas nos meses de inverno, indicando que estes meses não são bons para testes ecotoxicológicos.

Para garantir a qualidade dos resultados nos testes ecotoxicológicos com *Chironomus xanthus* foram periodicamente realizados testes agudos com substância de referência. Desta forma, permite-se maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos ao longo do tempo. Os testes de sensibilidade feitos com Cloreto de Potássio ficaram dentro da faixa sugerida por Fonseca (1997) e com média do coeficiente de variação dentro dos limites recomendados pelo Environment Canada, garantindo a saúde dos organismos e confiabilidade nos resultados.

O uso do Dicromato de Potássio como substância de referência é muito comum na avaliação da sensibilidade de microcrustáceos. No entanto, observa-se uma tendência no país pelo uso de substâncias menos tóxicas, como o Cloreto de Sódio ou Cloreto de potássio, pela facilidade no manuseio e descarte. Os testes de sensibilidade com *Daphnia similis*, não são procedimentos de rotina no laboratório do LAPSA, afinal este organismo já possui procedimento operacional padrão bem definido. Segundo Nulty et al. (1999) os testes de sensibilidade são importantes, porém outros critérios de aceitabilidade de testes devem ser utilizados como a sobrevivência mínima, crescimento ou reprodução de organismos no controle experimental ao final do teste, fornecem informações mais úteis sobre a condição dos organismos-teste

do que os dados gerados por testes de sensibilidade com substância referência.

7.6. Importância dos organismos-teste para avaliação ambiental

A avaliação de risco ecológico envolve a tarefa difícil de estimar a probabilidade dos efeitos em um grande número de espécies baseada em dados de toxicidade para várias espécies representantes. Como as espécies diferem em sua sensibilidade aos contaminantes, pode-se supor que algumas serão mais sensíveis e outras menos sensíveis do que *Daphnia similis* e outras espécies padrões de teste. Quando os dados estão disponíveis para somente algumas espécies, uma margem de segurança deve ser aplicada para levar em conta a sensibilidade desconhecida de espécies não testadas. A falha da informação na variação na sensibilidade das espécies é assim a principal fonte da incerteza na avaliação de risco ecológico (Ecofram,1999).

As análises químicas são imprescindíveis na identificação e na quantificação de compostos químicos específicos no ambiente, mas aqueles não determinados pelas técnicas analíticas são negligenciados (Fent, 2003). Além disso, a caracterização química de uma amostra ambiental não indica o potencial tóxico de uma mistura complexa aos organismos aquáticos, assim como a ausência ou presença de toxicidade nos despejos tratados (Zagatto et al., 1992). O teste de toxicidade é uma ferramenta importante para avaliação da qualidade do sedimento. Atualmente são utilizadas as análises químicas e físicas do sedimento em conjunto com as análises dos testes de toxicidade

para uma melhor tomada de decisão em pesquisas de avaliação de risco ambiental (Dornfeld, 2006).

A ecotoxicologia é, portanto, uma ferramenta que pode ser utilizada antes ou após um evento de poluição ter ocorrido. Preventivamente, para investigar os efeitos relativos da introdução de uma substância química isolada ou uma mistura de substâncias. Após para avaliar o efeito adverso produzido no ambiente pela introdução de uma substância isolada ou uma mistura, considerando as interações químicas, físicas e biológicas do ambiente (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

Para testes ecotoxicológicos em sedimentos, é interessante que este seja feito com organismos tipicamente bentônicos e nativos, sendo então *Chironomus xanthus* um candidato ideal, como organismo-teste e *Daphnia similis* por ser um organismo-teste mundialmente utilizado, um ótimo organismo para comparação dos efeitos ecotoxicológicos.

Os quironomídeos podem e devem ser considerados como espécies passíveis de serem utilizadas em avaliações de risco, pois são sensíveis a contaminantes, mesmo sendo capazes de sobreviver em condições estressantes (ex: baixas concentrações de oxigênio dissolvido). Apresentam significância ecológica, encontram-se amplamente distribuídos no Brasil e possuem importância econômica: são considerados como o principal alimento de peixes na natureza, incluindo espécies de interesse comercial. Podem ser cultivados especialmente para servirem de alimentos em pesqueiros, sem causar a hipereutrofização desses ambientes, sendo também utilizados para a remoção de matéria orgânica em lagoas de estabilização, por utilizarem a matéria orgânica na confecção de seus casulos (Silva, 2005). Além disso,

apresentam ciclo de vida relativamente curto e estão presentes na natureza durante todo o ano. Todos estes aspectos fazem com que os quironomídeos sejam recomendados como organismo-teste.

Os testes demonstraram que os azocorantes foram tóxicos para os *Chironomus xanthus* abaixo da concentração de 100mg/L. Ali et al. (2009) em seu trabalho, encontrou de 10 a 200mg/L de corantes têxteis no efluente, demonstrando que esta quantidade é altamente tóxica para a comunidade aquática bentônica. Até o momento, não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando Chironomidae como organismo-teste para corantes têxteis, sendo o mesmo mais utilizado para testes com metais pesados (Dornfeld, 2006; Bramorski, 2004), pesticidas (Akerblom, 2008; Ristola et al., 1995), avaliações de rios sob influencia de estações de tratamento de água e esgoto (Silva, 2008) entre outros.

8. CONCLUSÃO

O procedimento operacional padrão da cultura de *Chironomus xanthus* revelou-se uma ferramenta eficaz para a reprodução saudável dos organismos, evitando modificações na manipulação dos organismos de forma inadequada.

Os testes de sensibilidade com cloreto de potássio certificaram que a cultura além de saudável está sensível o suficiente para realização dos bioensaios ecotoxicológicos.

As análises espectrofotométricas se mostraram uma ferramenta relevante para a avaliação da transferência de poluentes de soluções aquosas para a fase sólida (ex: quantificação da associação dos corantes com os sedimentos utilizados nos bioensaios)

Os resultados utilizando *Daphnia similis* demonstraram que a escolha do organismo-teste adequado ao tipo de contaminante é extremamente importante, já que este organismo é de coluna d'água e não sofre impacto em contaminações nos sedimentos, não sendo o organismo ideal para avaliação ambiental em sedimentos. *Chironomus xanthus* demonstrou ser um organismo sensível para este tipo de contaminante e eficaz para bioensaios ecotoxicológicos em sedimentos, podendo servir como organismo padrão nestes testes.

Os valores da CE_{50} e CL_{50} para estes azocorantes utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis* não são encontrados na literatura. Estes dados são importantes no estabelecimento de concentrações aceitáveis, de forma a permitir a preservação da vida aquática.

Os resultados obtidos nos experimentos com sedimento artificial não foram diferentes estatisticamente do sedimento natural podendo ser utilizado como uma ferramenta eficaz para avaliação ecotoxicológica, além de evitar a contaminação com a fauna nativa.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados utilizando *Daphnia similis* e *Chironomus xanthus* servem como modelo para extrapolar as implicações toxicológicas causadas pelos azocorantes testados no ambiente aquático, mas estes resultados não são suficientes para determinar a saúde do corpo receptor do ecossistema aquático. No entanto, a toxicidade nestes organismos é suficiente para sugerir o seu risco potencial no ecossistema aquático, enfatizando a necessidade de estudos toxicológicos em indústrias têxteis.

Conseqüentemente existe a necessidade de avaliar as alternativas de tratamento de corantes têxteis, principalmente do grupo azo, visando a redução do seu lançamento nos corpos d'água.

A falha da informação na variação da sensibilidade das espécies pode ser evitada, existindo uma padronização da sensibilidade de contaminantes nos organismos-teste rotineiramente utilizados. Desta forma, facilitaria o estudo de risco ecológico visando a normatização e uso pelos órgãos ambientais.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas): 1993. Água – Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Norma ABNT- NBR 12713. 16p.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas): 2004a. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. Norma ABNT- NBR 12713. 21p.

Andrade, F. L. I. Possibilidades de redução da carga poluidora para a indústria de acabamentos de malhas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, Saneamento e Recursos Hídricos/UFMG, 1999. 85f. (Dissertação de Mestrado)

Alcântara, M. R. e Daltin, D.; Química do processamento têxtil. *Química Nova* v.19, p. 320, 1996.

Aksu, Z. Donmez, G. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for remazol blue reactive dye. *Chemosphere*, oxford, v.50 n.8, p 1075-1083, mar. 2003.

Anjaneyulu, Y.; Chary, N. S.; Raj, D.; Samuel S. Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review. *Review in Environmental Science and Bio/Technology*. v. 4, p. 245-273, 2005

Akerblom, N; Arbjork, C; Hedlund, M; Goedkoop W; Deltamethrin toxicity to the midge *Chironomus riparius* Meigen—Effects of exposure scenario and sediment quality; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 70, 53–60, 2008.

Armitage, P. D.; Craston, P. S.; Pinder L. C. V.: *The chironomidae: the Biology and Ecology of Non-Biting Midges*. London. Chapman & Hall ,1995. 572p.

Buikema, A. L, Jr & Sherberger, S. R. *Daphnia Carolina Tips* Vol. XL nº 10-Carolina Biological Supply Company, ISSN 0045-5865, 1977.

Banat , I. M. et al Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresourc. Technol.*, Oxford, v.58, n.3, p217-227, dec. 1996.

Bronberg, N., Durán, N. Biodescoloração da violaceína: Um modelo para tratamento de efluente têxtil. In: Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 07, 2000, Recife. *Anais...* Recife, 2000. p. 62

Burton, JR, G.A. (Ed.) *Sediment toxicity assessment*. Boca Ratón, Lewis Publ. Inc., 457p., 1992.

Burton, JR, G.A. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 10, p. 1585-1627, 1991

Bae, J. S.; Freeman, H. S.; Aquatic toxicity evaluation of copper-complexed direct dyes to the *Daphnia magna*. *Dyes and Pigments* 73 (2007) 126 e 132.

Bramorskim J.; Avaliação da qualidade de sedimentos dos rios Tiete e Piracicaba nos seus compartimentos de entrada no reservatório de Barra Bonita, SP. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo 2004. 112p.

Brunelli, T. F. T., Guaraldo, T. T., Paschoal, M. M. F., Zanoni, M. V. B., Degradação fotoeletroquímica de corantes dispersos em efluente têxtil utilizando fotoanodos de Ti/TiO₂. *Química Nova*. Vol. 32, n 1, p.67-71, 2009.

Chapman P. M. Sediment quality criteria from the sediment quality triad: an example. *Environ. Toxicol. Chem.*, New York, Vol. 5, n 11, p. 957-964, 1986.

Chapman, P.M.; Dexter, R.N.; Long, E.R. Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. *Mar. ecol. Prog. Ser.*, Amelinghausen, v. 37, p. 75-96.1987.

Chapman, P.M. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *The science of the total Environment*, Amsterdam, Vol. 97-98, p. 815-825, 1990.

Chapman, P.M.; Anderson, B.; Carr, S.; Engle,V.; Green, R.; Hameedi, J.; Harmon, M.; Haverland, P.; Hyland, J.; Ingersoll, C.; Long, E.; Rodgers JR., J.; Salazar, M.; Sibley, P.K.; Smith, P.J.; Swartz, R.C.;Thompson, B. Windom, H. General guidelines for using the sediment quality triad. Mar. Pollut. Bull., Oxford, v. 34, n. 6, p. 368-372, 1997.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1998. Série relatórios CETESB, 1999.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1999. Série relatórios CETESB, 2000.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2000. Série relatórios CETESB, 2001.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2001. Série relatórios CETESB, 2002.

Costa J. B.; Avaliação ecotoxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radia-

ção ultravioleta. Dissertação (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007. 167p.

Correia L. C. S.; Trivinho-Strixino, S. Macroinvertebrados da rizosfera de *Scirpus cubencis* na Lagoa do Infernã (Lagoa Ecológica de Jataí, SP): Estrutura e função. *Acta Limnológica Brasileira*, Vol. 10, n. 1, p 37-47, 1998.

Coughlin, M. F.; Kinkle, B. K.; Bishop, P. L.; High performance degradation of azo dye acid orange 7 and sulfanilic acid in a laboratory scale reactor after seeding with culture bacterial strains, *Water Res.*, New York, Vol. 37, n.11, p 2757-2763, jun. 2003.

Dearfield, K.L., Cimino, M.C., Mccarroll, N.E., Mauer, I., Valcovic, L.R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy, *Mutation Research*, Vol. 521, 121-135, 2002.

Dornfeld C. B. Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. Dissertação (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 239p. 2006.

Dornfeld, C. B.; Comparação de Bioensaios Laboratoriais e “in situ” Utilizando *Chironomus xanthus* na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP) *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, Vol. 1, n. 2, 161-165. 2006.

Dornfeld C. B; E. Espíndola L. G; Fracácio R; Rodrigues B. K & Novelli A. Comparação de Bioensaios Laboratoriais e “in situ” Utilizando *Chironomus xanthus* na Avaliação da Toxicidade de Sedimentos do Rio Monjolinho (São Carlos, SP). J. Braz. Soc. Ecotoxicol., Vol. 1, n. 2, 2006, 161-165

DIAS, A. Testes de toxicidade com *Artemia salina*: contaminante (K₂CrO₇) e efluentes químicos (tratado e não-tratado). Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 2002.

Environment Canada, 1990 Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Report EPS 1/RM/12. 85p.

ECOFRAM - Ecological Committee on FIFRA risk assessment methods: Report of the aquatic Workgroup. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Pesticides Programs, Washington, DC. 1999.

FATMA - Fundação do Meio ambiente do Estado de Santa Catarina. Limites Máximos de Toxidade Aguda para efluentes de diferentes origens. PORTARIA Nº 017/02 – 18 abr. 2002.

Fent, K. Ecotoxicological problems associated with contaminants sites. Toxicology Letter. Vol.140, p. 353-365, 2003.

Fonseca, A. L. Avaliação da qualidade da água na bacia do rio piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados bentônicos. Dissertação

(Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos-USP, São Carlos, 1997.
184p.

Forgacs, E. Cserhádi, T.; Oros, G. Removal of synthetic dyes from wastewater: a review. *Environ. Int.*, New York, Vol.30, n.7, p 953-971, 2004.

Guaratini, C. C. I.; Zanoni, M. V. B. Corantes Têxteis. *Química Nova*, São Paulo, Vol. 23, p. 71-78, 1999.

Gomes, N. C. M.; Mendonça-Hagler, L. C. S. ; Savaidis, I. Metal bioremediation by microorganisms. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, Vol.29, n 2, p.85-92, 1998.

G€ubitz, G.; Tauber, M.; Rehorek, A.; Application of power ultrasound for azo dye degradation. *Ultrasonics Sonochemistry* Vol. 11, 177-182, 2004.

Guçlu G., Banu, T. İ., Removal of basic dyes from aqueous solutions using natural clay. *Desalination* Vol.249, p.1377-1379, 2009.

Haring H. J.; Smith M. E.; Lazorchak J. M.; Crocker P. A.; Euresti A.; Wratschko M. C.; Schaub M. C.; Comparison of Bulk Sediment and Sediment Elutriate Toxicity. *Testing Methods. Arch Environ Contam Toxicol.* Vol. 1, p. 24-29. 2009.

Immich A. P. S.; Remoção de corantes de efluentes têxteis utilizando folhas de *Azadirachta indica* como adsorvente. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade Federal de Santa Catarina, 119p. 2006.

Immich A.P.S; Souza A. A. U; Souza S. M. A. U; Removal of Remazol Blue RR dye from aqueous solutions with Neem leaves and evaluation of their acute toxicity with *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*. v.164. p.1580–1585, 2009.

Kunz, A., Moraes, S., Durán, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v.25, p.78-820, 2002.

Kummrow, F., Rech, C.M., Coimbrao, C.A., Roubiceck, D.A., Umbuzeiro, G.A. Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and the blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutation Research*, v.541, p.103-113, 2003.

Leão, M. M. D. et al. Controle ambiental na indústria têxtil: acabamento de malhas. Belo Horizonte: Projeto Minas Ambiente, 2002.

Nulty, E. W.; Dwyer, F. J.; Ellersick, M. R.; Greer, E. I.; Ingersol, C. G.; Rabeni, C. F.; Evaluation of ability of reference toxicity tests to identify stress in laboratory populations of the amphipod *Hyalella azteca*. *Environmental and Chemistry*, 18 (3): 544-548, 1999.

Maund, S. J., Hamer, M. J., Lane, M. C. G., Farrelly, E., Rapley, J. H., Goggin, U. M. And Gentle, W.E. Partitioning, Bioavailability, and Toxicity of the Pyrethroid

Insecticide Cypermethrin in Sediments. *Environ. Toxicol. and Chem.*, Vol. 21, p. 9-15, 2002.

M. Mohorčič, J. Friedrich, A. Pavko Decoloration of the diazo dye reactive black 5 by immobilised *Bjerkandera adusta* in a stirred tank bioreactor. *Acta Chim. Slov.* Vol. 51, p. 619-628, 2004.

Oliver, Life History Of The Chironomidae. *Annual Review of entomology*. Vol. 16, p. 211-230, 1971.

Rand, G. M. Detection bioassay In: GUTHRIE, F. E. & Perry, J. J. *Introduction to environmental toxicology*. North Holland, Elsevier, Vol. 1, p. 390-401, 1980.

Rand, G. M. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. 2 ed. Taylor & Francis, 1995.

Silva, M. A. Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo. 162p. 2005.

Umbuzeiro, G. A.; Freeman, H. S.; Warren, S. H.; Oliveira, D. P.; Terao, Y.; Watanabe, T.; Claxton, L. D.; The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere* 60 55–64, 2005.

Umbuzeiro, G.A., Roubicek, D.A., Rech, C.M., Sato, M.I.Z., Claxton, L.D. Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures. *Chemosphere*, Vol. 54, p. 1589-1597, 2004.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency. USEPA/600/R-94/024. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, D.C., 133p. 2004.

Villegas-Navarro et al, 2000; Determination of Wastewater LC50 of the Different Process Stages of the Textile Industry *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 56-61, 2001.

Verma, P.; Madamwar, D. Decolorization of azo dye using basidiomycete strain PV 002. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Oxford, Vol. 21, n.4, p.481-485, 2005.

Wang, Y.; Yu, J. Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *trametes versicolor*. *Water Sci. Technol.*, Oxford, Vol.38, p 233-238, 1998.

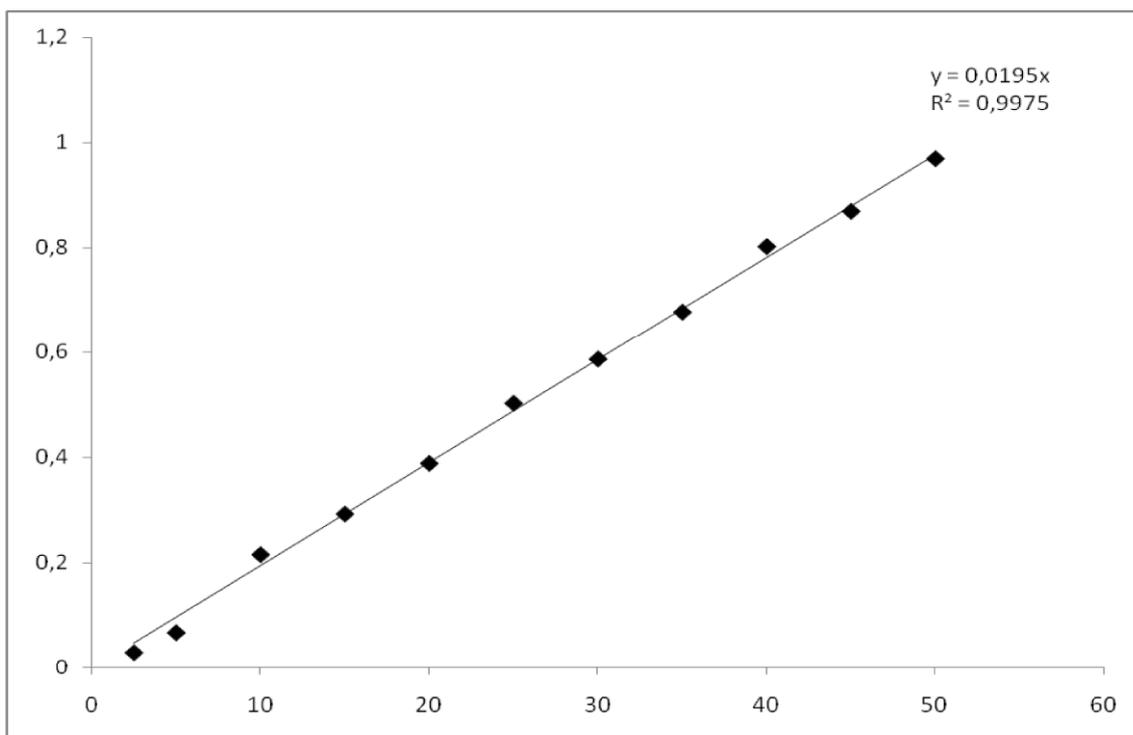
Zagatto, P.A. & Bertoletti, E. 2006. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações*. 478 p. Rima, 2008.

Zanoni, M.V.B., Carneiro, P.A. O descarte dos corantes têxteis. *Ciência Hoje*, Vol. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.

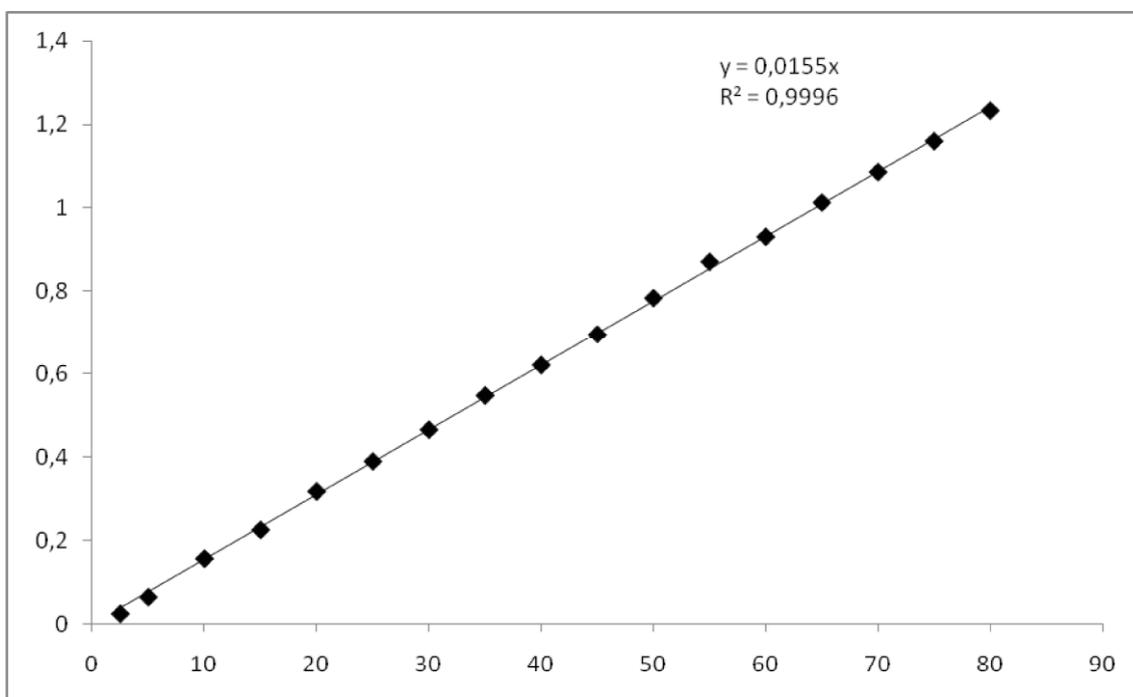
Zoratto, A. C.; Avaliação ecotoxicológica de compostos naturais produzidos por *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* no Vale do Rio Doce, Minas Gerais.

Dissertação (Mestrado). Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 222p. 2007.

11. ANEXOS



Anexo I: Curva de calibração do azocorante reativo amarelo ouro



Anexo II: Curva de calibração do azocorante disperso azul marinho