



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Joana Filipa da Fonseca Araújo Ferreira Campos

**Avaliação da toxicidade das águas do rio  
Cubatão (Norte) - Joinville, SC, com base  
em ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia  
magna***



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Joana Filipa da Fonseca Araújo Ferreira Campos

**Avaliação da toxicidade das águas do rio  
Cubatão (Norte) - Joinville, SC, com base  
em ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia  
magna***

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Ecologia

Trabalho elaborado sob orientação da  
**Prof.<sup>a</sup> Doutora Therezinha Maria Oliveira**  
e supervisão da  
**Prof.<sup>a</sup> Doutora Fernanda Cássio**

outubro de 2015

## DECLARAÇÃO

Nome: Joana Filipa da Fonseca Araújo Ferreira Campos

Endereço electrónico: joanaffafcampos@gmail.com Telefone: 253 022 522 / 935 595 277

Número do Bilhete de Identidade: 13442015

Título dissertação:

Avaliação da toxicidade das águas do rio Cubatão (Norte) - Joinville, SC, com base em ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna*

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Therezinha Maria Oliveira

Supervisora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Fernanda Cássio)

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado em Ecologia

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, , MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 30/10/2015

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Aos meus Pais, pelo amor e apoio incessantes. À minha irmã, sobrinhos, cunhado, tios, primos e amigos. As saudades foram muitas, mas no fim tudo fica bem.

Ao meu marido, meu companheiro de jornada, pela dedicação, apoio, amor e amizade.

À Professora Doutora Therezinha, por me ter feito sentir tão bem-vinda, pela orientação, o incentivo, os ensinamentos e, acima de tudo pela amizade.

À Professora Doutora Fernanda Cássio, por ter ajudado a tornar tudo isto possível.

Ao Professor Doutor Bruno Castro, pelas preciosas contribuições.

À Jéssica Malgarin, minha parceira no crime. Obrigada pelos dias de 25 horas no laboratório, a fazer Ciência. Obrigada pela amizade, pelo apoio e pelas valiosas trocas de ideias.

Ao Professor Doutor Gilmar e ao Luciano Pinto. Obrigada por me terem deixado “agitar” o vosso laboratório.

Ao Sr. Luiz Américo e ao Sr. Orlando, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e pela vontade de ajudar.

Aos integrantes do CCJ, em especial à Giulia, Emanuelle, Maria, Yara e Wellington. Obrigada por todos os momentos que partilhámos.

Às técnicas dos laboratórios: Aline, Cláudia e Leslie. Obrigada por toda a ajuda e pelos momentos de aprendizagem.

Ao Professor Doutor Paulo França, por gentilmente ter cedido o laboratório de Biologia Molecular.

A todo o pessoal da UNIVILLE, que de uma forma ou de outra, cruzou o meu caminho e tornou esta experiência mais rica.

## **Avaliação da toxicidade das águas do rio Cubatão (Norte) – Joinville, SC, com base em ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna***

### **Resumo**

A gestão dos recursos hídricos com vista à obtenção de água doce de qualidade e em abundância, tem-se provado desafiadora. O crescimento demográfico e fatores daí procedentes, exercem pressões sobre a exploração este recurso, quantitativa e qualitativamente. Torna-se necessário regular a sua utilização e qualidade. No entanto, as análises químicas rotineiras são insuficientes para assegurar uma boa qualidade da água e a preservação do ecossistema aquático. Aqui os testes ecotoxicológicos tornam-se necessários, pois alcançam esta esfera e demonstram o impacto dos poluentes nos corpos de água.

O presente estudo consistiu na exposição do organismo *Daphnia magna*, a amostras do rio Cubatão (Norte) – Joinville, Santa Catarina, objetivando a implementação de testes ecotoxicológicos com vista à ampliação do banco de dados de gestão da sua bacia hidrográfica. Este rio constitui a principal fonte de abastecimento da cidade de Joinville, a maior do estado de Santa Catarina, com o maior PIB do estado e o quarto maior do sul do Brasil, em 2013.

Avaliou-se a toxicidade aguda através da imobilização dos organismos e crónica, por meio da sobrevivência, idade primípara, fecundidade taxa de incremento populacional e qualidade da sua descendência. Os organismos foram submetidos ao ensaio do cometa, com o intuito de criar um perfil genotóxico dos pontos amostrados.

Os ensaios agudos mostraram-se pouco sensíveis na avaliação ecotoxicológica. Já os parâmetros crónicos sugeriram, em algumas situações, a exposição a amostras com substâncias tóxicas. Isto não está de acordo com o exigido na legislação brasileira – Resolução CONAMA n.º 357/2005. A análise da correlação linear das medidas do comprimento ventral e largura abdominal dos juvenis, revelou uma correlação linear positiva entre as variáveis ( $r = 0.8596$ ,  $n = 251$ ,  $P < 0.001$ ), com um forte coeficiente de regressão linear ( $r^2 = 0.7389$ ).

O ensaio do cometa permitiu avaliar a genotoxicidade das amostras, de forma simples e com elevada sensibilidade. Elaborou-se um perfil genotóxico dos pontos amostrados, constatando a exposição dos organismos a amostras com substâncias genotóxicas.

Palavras-chave: *Daphnia magna*, Ecotoxicologia, Cubatão, genotoxicidade.

## Evaluation of the toxicity of the waters of the river Cubatão (North) – Joinville, SC, based on ecotoxicological assays with *Daphnia magna*

### Abstract

Management of water resources aiming to obtain water with good quality and in abundance, has proven challenging. Demographic growth and problems that arise from it, exert pressure on this resource, in qualitative and quantitative terms. It becomes necessary to regulate its use and quality. However, routine chemical analysis are insufficient to ensure good water quality and the conservation of the aquatic ecosystem. Ecotoxicological assays become then necessary, as they reach this sphere and demonstrate the impact of pollutants on water bodies.

The present research consisted on exposing the organism *Daphnia magna*, to samples from river Cubatão (North) – Joinville, Santa Catarina aiming the implementation of ecotoxicological assays in order to expand its watershed management database. This river is the main source of water for public supply of the city of Joinville, the largest city in the state of Santa Catarina, with the largest GDP of the state and fourth largest in the south of Brazil, in 2013.

Acute toxicity was assessed via immobilization of the organisms and chronic, through survival, primiparous age, fecundity, intrinsic rate of increase and offspring quality. Organisms underwent comet assay, in order to create a genotoxic profile of the points.

Acute assays revealed little sensitivity in ecotoxicological assessment. However, chronic endpoints suggested, in some cases, exposure to toxic compounds. This is not in agreement with brazilian law – CONAMA Resolution no. 357/2005. Linear correlation of ventral length and abdominal width of the offspring, revealed a positive linear correlation between both variables ( $r = 0.8596$ ,  $n = 251$ ,  $P < 0.001$ ), and a strong linear regression coefficient ( $r^2 = 0.7389$ ).

Comet assay allowed to assess sample genotoxicity, simply and with high sensitivity. A genotoxic profile was obtained, showing organism exposure to genotoxic compounds.

Keywords: *Daphnia magna*, Ecotoxicology, Cubatão, genotoxicity.

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract.....	v
Lista de abreviaturas .....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas .....	xi
Lista de anexos.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
3.1. Recursos hídricos e poluentes .....	17
3.2. Testes ecotoxicológicos .....	17
3.3. Organismo de estudo: <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820) .....	20
3.4. Políticas mundiais de conservação e legislação em vigor .....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Caracterização da área de estudo .....	33
4.2. Definição dos pontos de amostragem .....	35
4.3. Metodologia da amostragem.....	36
4.4. Índice de qualidade da água .....	38
4.5. Cultivo dos organismos-teste.....	39
4.5.1. Controlo da sensibilidade dos organismos-teste.....	40
4.6. Metodologia do ensaio agudo .....	40
4.7. Metodologia do ensaio crónico .....	41
4.7.1. <i>Endpoints</i> analisados no teste crónico .....	42
4.8. Metodologia do ensaio do cometa .....	45
4.9. Análise estatística.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1. Índice de Qualidade da Água.....	51
5.2. Parâmetros físico-químicos .....	52
5.3. Ensaios agudos .....	54
5.4. Ensaios crónicos .....	56
5.5. Ensaio do cometa.....	63

5.6. Aplicação da Diretiva-Quadro da Água no Brasil .....	67
6. CONCLUSÕES .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
8. ANEXOS .....	83



## Lista de abreviaturas

- CPDS – Comissão de Políticas de Desenvolvimento Sustentável
- ANA – Agência Nacional de Águas
- AChE – Acetilcolinesterase
- ACh – Acetilcolina
- BHRC – Bacia hidrográfica do rio Cubatão
- ONU – Organização das Nações Unidas
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- DQA – Diretiva-Quadro da Água
- UBA – *Umweltbundesamt* (Agência Federal do Meio Ambiente)
- SI – Sistema Internacional
- OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ISO – *International Organization for Standardization*
- CCJ – Comitê Cubatão Cachoeira Joinville
- APA – Área de Proteção Ambiental
- ETA – Estação de tratamento de águas
- NBR – Norma brasileira
- WGS – *World Geodetic System*
- EPSG – European Petroleum Survey Group
- IQA – índice de qualidade da água
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- PFN – Ponto de fusão normal
- BPF – Baixo ponto de fusão
- INCQS/FIOCRUZ – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz
- ANOVA – *Analysis of Variance*
- NaCl – Cloreto de sódio
- CL<sub>x</sub> – Concentração letal x
- CE<sub>x</sub> – Concentração efetiva x

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Anatomia geral de <i>Daphnia magna</i> .....	23
<b>Figura 2A.</b> Ciclo de vida de <i>Daphnia magna</i> , representando ambos os processos reprodutivos: partenogênese e reprodução sexual.....	26
<b>Figura 2B.</b> Fêmea com ovos partenogênicos na câmara incubadora. C. Fêmea com efípio totalmente formado.....	26
<b>Figura 3.</b> Confluência do rio do Braço (água turva) com o rio Cubatão (água límpida).....	35
<b>Figura 4A.</b> Mapa representativo da região amostral e das classes em que se enquadra a qualidade da água do rio Cubatão.....	37
<b>Figura 4B.</b> Pormenor da região amostral, onde é possível observar a posição relativa dos pontos amostrais, do ponto de colheita de água para o cultivo de <i>Daphnia magna</i> e da ETA Cubatão.....	37
<b>Figura 5.</b> Desenho experimental do teste agudo com <i>Daphnia magna</i> .....	41
<b>Figura 6.</b> Desenho experimental do teste agudo com <i>Daphnia magna</i> .....	42
<b>Figura 7.</b> Esquema das medições efetuadas aos juvenis de <i>Daphnia magna</i> , com o objetivo de medir a qualidade da descendência.....	44
<b>Figura 8.</b> Desenho experimental do ensaio do cometa.....	48
<b>Figura 9.</b> IQA obtido em cada um dos pontos, durante o período de estudo.....	51
<b>Figura 10.</b> Valores de OD, fósforo total e $DBO_5$ , no período estudado.....	52
<b>Figura 11.</b> Efeito da exposição a amostras não diluídas de diferentes pontos do rio Cubatão, nos parâmetros de sobrevivência, reprodutivos e populacionais de <i>Daphnia magna</i> (sobrevivência, idade primípara, fecundidade e taxa de incremento populacional).....	56
<b>Figura 12.</b> Diagrama de dispersão entre o comprimento dorsal (representado no eixo dos xx, em mm) e a largura abdominal dos neonatos (no eixo dos yy, em mm).....	60
<b>Figura 13.</b> Médias e respetivos desvios-padrão, do comprimento dorsal e largura abdominal dos neonatos de <i>Daphnia magna</i> .....	60
<b>Figura 14A.</b> Ovo abortado.....	62
<b>Figuras 14B-D.</b> Juvenis abortados com malformações.....	62
<b>Figura 15.</b> Exemplos das classes de cometas observadas.....	63
<b>Figura 16.</b> Percentagens de cometas em cada classe. Os gráficos representam as percentagens de cometas observados em cada classe de dano, obtidos nos ensaios do cometa	

consecutivos aos ensaios agudos.....	65
<b>Figura 17.</b> Percentagens de cometas em cada classe. Os gráficos representam as percentagens de cometas observados em cada classe de dano, obtidos nos ensaios do cometa consecutivos aos ensaios crónicos.....	65
<b>Figura 18.</b> Classificações totais dos cometas, obtidas em cada tratamento, em unidades arbitrárias.....	66

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Categorias e respectivos intervalos de ponderação para atribuição do Índice de Qualidade da Água.....	<b>38</b>
<b>Tabela 2.</b> Valores para as concentrações de azoto amoniacal e azoto total, durante o período de estudo.....	<b>53</b>
<b>Tabela 3.</b> Classificação do grau de toxicidade de amostras de água bruta dos rios do Braço (RB2 e RB4) e Cubatão (RC1, RC2 e RC3), a juvenis de <i>Daphnia magna</i> , com exposição de 48h.....	<b>55</b>
<b>Tabela 4.</b> Resultados da ANOVA de uma via e post-hoc de Dunnett, para o parâmetro de fecundidade, durante o período de estudo.....	<b>58</b>
<b>Tabela 5.</b> Resultados da ANOVA de uma via e post-hoc de Dunnett, para o parâmetro taxa de incremento populacional, durante o período de estudo .....	<b>59</b>
<b>Tabela 6.</b> Resultados da ANOVA de uma via e post-hoc de Dunnett, para os parâmetros de crescimento dos neonatos de <i>Daphnia magna</i> , durante o período de estudo.....	<b>61</b>
<b>Tabela 7.</b> Resultados da ANOVA de uma via e post-hoc de Dunnett, para os dados de classificação dos cometas obtidos nos ensaios do cometa consecutivos aos ensaios agudos e crônicos .....	<b>66</b>

## Lista de anexos

<b>Anexo A</b> – Parâmetros físico-químicos.....	<b>83</b>
<b>Anexo B</b> – Análise da potabilidade da água do meio de cultivo (Quiriri).....	<b>84</b>
<b>Anexo C</b> – Soluções adicionadas ao meio de cultivo.....	<b>85</b>
<b>Anexo D</b> – Mapa do uso e ocupação do solo da BHRC.....	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Sendo a água doce um recurso essencial à sobrevivência dos seres vivos, este tem vindo a sofrer diversas pressões, que colocam em risco a sua disponibilidade e qualidade. O seu uso pode ser variado, sendo necessária para o abastecimento, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a recreação, a aquicultura e, não menos importante, a harmonia paisagística.

Muito embora 70% da superfície terrestre esteja coberta por água, meramente 2.5% é doce. E desta, 70% encontra-se sob a forma de gelo. Dos restantes 30%, no estado líquido, 95% são águas subterrâneas demasiado profundas para se tornarem de fácil acesso e utilização (Cunha, 2002).

Não obstante, a escassez é atingida não só quando o recurso não se encontra disponível em volume suficiente para satisfazer a demanda originada pelo acelerado crescimento demográfico, mas também quando a sua qualidade é diminuída por fontes variáveis de poluição, como os esgotos domésticos, os efluentes industriais despejados sem tratamento, o deflúvio agrícola e urbano, a supressão da vegetação ciliar e a ocupação do solo de forma desordenada (CPDS, 2002). Há, então, dois principais obstáculos ligados à problemática da água: a demanda extraordinária em função do crescimento demográfico e a disposição inadequada de efluentes domésticos, industriais, urbanos e agrícolas, que denigrem a sua qualidade (ANA, 2011).

Micropoluentes emergentes são compostos orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, que apresentam um risco potencial para a saúde humana e do meio ambiente (Kummerer, 2011). A preocupação crescente com estes compostos, presentes no meio ambiente em concentrações na ordem de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{ng.L}^{-1}$ , tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Após a Segunda Guerra Mundial, houve um *boom* de produção de químicos sintéticos, para os mais variados fins. Desde o final do século XX, que produtos das indústrias química e farmacêutica, tais como medicamentos, desinfetantes, meios de contraste, detergentes, surfatantes, pesticidas, corantes, tintas, conservantes, aditivos alimentares e produtos para cuidados pessoais, se destacam como micropoluentes emergentes no ambiente aquático (Kummerer, 2011).

Estas substâncias podem ser tóxicas por si só, ou o seu metabólito pode tornar-se mais tóxico do que o composto precursor. Guilhermino *et al.* (1996), descrevem o constatado

por Costa (1988), onde o investigador verificou que o paratião – um potente inseticida - em si não é tóxico, mas após ser biotransformado por *Daphnia magna*, produz um análogo – paraoxão -, que é altamente tóxico, estando envolvido na inativação da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima é responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) que, por sua vez, está envolvida na transmissão do impulso nervoso motor. Quando a ACh não é degradada, o músculo não é capaz de voltar a um estado de relaxamento, provocando paralisia. Outras observações em estudos com moluscos, crustáceos, peixes, répteis, pássaros e alguns mamíferos, têm sugerido que possíveis alterações na saúde humana envolvendo o sistema reprodutivo, tais como cancro da mama e do testículo, além da infertilidade masculina, podem estar relacionadas com a exposição a micropoluentes emergentes (Ghiselli e Jardim, 2007).

Estes poluentes chegam facilmente aos recursos hídricos, uma vez que são de uso rotineiro doméstico e os processos convencionais de tratamento de água não os removem na totalidade, nem os sistemas de monitorização são eficientes quanto à análise dos efeitos dos mesmos no ambiente, exigindo avaliações ambientais mais criteriosas e realizadas de forma sistemática (López-Duval *et al.*, 2015).

Os recursos hídricos têm capacidade de diluir e assimilar efluentes mediante processos físicos, químicos e biológicos, que proporcionam a sua autodepuração, que consiste na biotransformação dos compostos orgânicos em substâncias inertes, que não sejam ecologicamente prejudiciais, conduzindo ao reequilíbrio do meio aquático. No entanto, essa capacidade está dependente da qualidade e da quantidade da carga poluidora recebida.

Os usos previstos da água exigem que a sua qualidade seja enquadrada em parâmetros padronizados, que estão baseados em análises de carácter físico-químico, que na maior parte das vezes não são suficientes para determinar o poder tóxico de um poluente ou mistura de poluentes (Guilhermino *et al.*, 1996; López-Duval *et al.*, 2015). Os sistemas biológicos são capazes de reagir a concentrações de substâncias bem abaixo dos limites de deteção por métodos de análise química (Knie e Lopes, 2004). Para colmatar esta falha, os ensaios toxicológicos alcançam esta esfera, uma vez que permitem apurar o mecanismo de ação e a magnitude da intoxicação destes compostos. Esses dados biológicos podem oferecer informações úteis sobre as consequências ecológicas destes compostos em

ambientes aquáticos, que podem manifestar-se no crescimento, reprodução, metabolismo, deformações e alterações comportamentais dos organismos.

Por meio de ensaios toxicológicos é possível monitorizar a qualidade da água, podendo servir como alerta para as entidades responsáveis (López-Duval *et al.*, 2015; Palma, Ledo e Alvarenga, 2016), mas estes devem ser sempre acompanhados de análises químicas que permitam identificar o(s) composto(s) responsável(eis) pelos efeitos deletérios observados (Knie e Lopes, 2004; Magalhães e Ferrão Filho, 2008; Palma, Ledo e Alvarenga, 2016).

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Norte (BHRC) está localizada na porção nordeste de Santa Catarina, com 75% da sua área no município de Joinville, a maior cidade do estado de Santa Catarina. A BHRC fornece diversos recursos à população, que se encontra em franco crescimento, desde abastecimento de água potável, agropecuária, indústria, turismo ecológico, entre outros (Gonçalves, Zanotelli e Oliveira, 2006). Sendo o rio Cubatão a principal fonte de abastecimento deste município, tende à escassez, devido à forte demanda associada ao crescimento demográfico e inadequado despejo de efluentes.

A qualidade da água da BHRC já é controlada por parâmetros físico-químicos. No entanto, a aplicação de testes ecotoxicológicos à gestão desta bacia é útil para retificar a abordagem analítica.

Viabilizar o uso da água nas atividades humanas, sem colocar em risco a biodiversidade e os serviços dos ecossistemas, é fundamental para atingir um estatuto de sustentabilidade. Garantir a manutenção dos ecossistemas com modificação antrópica delével, é essencial para que seja possível atingir esse estado de equilíbrio. Mas conciliar as esferas ambiental, económica e social, pode traduzir-se numa tarefa mais complexa do que aparenta.

Na verdade, este pode bem ser o maior desafio da Humanidade no século XXI: garantir às populações um fornecimento de água doce de qualidade e em quantidade suficiente para suprir as suas necessidades, nos padrões de consumo atuais.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade das águas do rio Cubatão do Norte – Joinville/SC ao organismo *Daphnia magna*, como contribuição para a ampliação do sistema de informações ambientais da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão do Norte – Joinville, Santa Catarina, Brasil.

### 2.2. Objetivos específicos

As *milestones* propostas para este estudo foram:

- i. Avaliar a toxicidade aguda de pontos de amostragem do rio Cubatão com *Daphnia magna*, no período 2014-15, analisando a imobilização;
- ii. Avaliar a toxicidade crônica de pontos de amostragem do rio Cubatão à *Daphnia magna*, no período 2014-15, através da análise da sua sobrevivência, da sua performance reprodutiva e da qualidade da descendência produzida;
- iii. Implementar a aplicação de testes genotóxicos na avaliação da qualidade das águas do rio Cubatão;
- iv. Correlacionar parâmetros físico-químicos e o uso e ocupação do solo, com as análises toxicológicas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Recursos hídricos e poluentes

A bacia hidrográfica é a área de drenagem natural da água proveniente da precipitação, onde os canais de escoamento convergem num canal principal (Finotti *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2013). A variação da qualidade da água numa bacia hidrográfica pode ser influenciada pelo seu enquadramento, que tem em conta as suas características geológicas e pedológicas; fatores hidrometeorológicos, como a pluviosidade; e a ação antrópica, como a demanda de água, descargas domésticas e industriais e escoamentos superficiais (Cunha *et al.*, 2013).

Os poluentes ambientais podem entrar nos corpos hídricos através de dois pontos: fontes pontuais, como descargas diretas de efluentes industriais e domésticos; ou por fontes difusas, onde não há um ponto de entrada caracterizado e procedem de deposições parciais do poluente antes de este atingir o corpo recetor (como, por exemplo, a lixiviação de poluentes do solo derivados da agricultura, ou o deflúvio urbano) (Ghiselli e Jardim, 2007; ANA, 2011).

Os efluentes domésticos e agrícolas são, geralmente, uma fonte de azoto e fósforo, que para além destes nutrientes, são fontes de agrotóxicos e poluentes orgânicos persistentes (Santos, 2008; ANA, 2011). Os efluentes industriais são, frequentemente, compostos por metais, matéria orgânica, solventes e hidrocarbonetos, tal como o deflúvio urbano.

#### 3.2. Testes ecotoxicológicos

A Ecotoxicologia pode ser caracterizada como a ciência que converge a Ecologia e a Toxicologia, com o objetivo de gerir o risco de exposição dos organismos a substâncias nocivas presentes no meio ambiente e estabelecer medidas de segurança que previnam os efeitos nocivos das mesmas (Magalhães e Ferrão Filho, 2008; Finotti *et al.*, 2009; Zagatto, 2014).

As análises químicas utilizadas como meio singular de monitorização da qualidade das águas não são suficientes, uma vez que são incapazes de expor o efeito da biodisponibilidade das substâncias, da sua persistência no ambiente, da interação entre substâncias e da sua toxicidade ao ecossistema aquático.

Os ensaios ecotoxicológicos são capazes de demonstrar as respostas fisiológicas dos organismos às substâncias presentes no compartimento em estudo (Becker *et al.*, 2014) e

devem ser a primeira linha na bateria de testes, seguidos das análises químicas, para estabelecer relações diretas com substâncias tóxicas específicas (Knie e Lopes, 2004; Jones, Reynolds e Raffaelli, 2006; Santos, 2008, Palma, Ledo e Alvarenga, 2016).

Os efeitos tóxicos de uma substância ou conjunto de substâncias podem ser agudos ou crônicos. No primeiro caso, o organismo é exposto por um curto período de tempo e os *endpoints* medidos são, geralmente, morte ou imobilização. Estes testes permitem obter concentrações de efeito para a substância em estudo, que podem ser concentrações letais ( $CL_x$ ) ou concentrações efetivas ( $CE_x$ ), dependendo do *endpoint* utilizado. Os efeitos crônicos pressupõem a exposição do organismo a uma concentração subletal, por um período que seja representativo do seu ciclo de vida, com o intuito de estudar as consequências na reprodução, desenvolvimento, crescimento e comportamento.

Os testes agudos são amplamente aplicados para a avaliação da toxicidade, pois são mais rápidos e baratos, mas não fornecem muita informação (Palma, Ledo e Alvarenga, 2016). Apesar de a toxicidade aguda ser de extrema importância para compreender a ação de um poluente quando, por exemplo ocorre uma exposição acidental ao mesmo, a principal ameaça dos contaminantes está relacionada com os seus efeitos crônicos, quando os organismos são expostos a concentrações tão baixas que afetam os processos biológicos essenciais à sua sobrevivência e reprodução a médio-longo prazo, mas podem ficar obscuros durante gerações, colocando em causa o seu papel no ecossistema e contribuindo para a perda da biodiversidade (Knie e Lopes, 2004; Ghiselli e Jardim, 2007; Devaux *et al.*, 2011).

Ensaio ecotoxicológicos que detetem toxicidade a diferentes níveis, aumentam a sensibilidade da avaliação e complementam-se, ao trazerem informações adicionais que possibilitem uma melhor compreensão do mecanismo de toxicidade. Os ensaios genotóxicos podem complementar a informação obtida nos ensaios ecotoxicológicos rotineiros, uma vez que permitem detetar efeitos tóxicos a nível celular e molecular, com elevada sensibilidade, praticabilidade e segurança.

A Genotoxicologia Ambiental é uma disciplina que fornece ferramentas práticas e sensíveis, de monitorizar substâncias genotóxicas no meio ambiente (Santos, 2008), complementando a informação fornecida pelos ensaios ecotoxicológicos convencionais.

Uma substância genotóxica é aquela que interage com o DNA, alterando a sua configuração e/ou as suas funções e que tem potencial mutagénico, ou seja, é capaz de induzir mutações aos níveis somático ou germinativo (Umbuzeiro e Roubicek, 2014).

Um teste reconhecidamente sensível para a biomonitorização ambiental é o chamado ensaio do cometa ou eletroforese de gel de células individuais – *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*. Este é um ensaio de genotoxicidade, amplamente empregue para avaliação de danos no DNA de células individuais. É capaz de detetar quebras na cadeia de DNA, que podem ser induzidas pouco após a exposição à substância genotóxica. É um método simples, de baixo custo, de execução relativamente fácil, o que o torna apelativo para avaliação de produtos industriais, farmacêuticos, agroquímicos, efluentes, etc (Collins, 2004; Moller, 2005; Lacaze *et al.*, 2011; Pellegrini, Gorbi e Buschini, 2014). Aliás, a Agência Ambiental Federal da Alemanha (UBA), sugere que este ensaio seja incluído numa bateria de testes para detetar, com segurança, genotoxicidade nas águas de superfície (Buschini *et al.*, 2004).

A técnica possui este nome, pois a imagem obtida é semelhante àquela de um verdadeiro cometa. O seu princípio consiste na lise das membranas celulares, seguida da migração eletroforética em ambiente alcalino, dos fragmentos de DNA. Isto permite que, observando ao microscópio, seja possível identificar uma cabeça (região nuclear) e uma cauda que consiste dos fragmentos de DNA migrantes. O tamanho da cauda e a sua intensidade são proporcionais à quantidade de danos presentes no DNA.

Para se tornarem visíveis, os cometas necessitam de ser corados. Existem diversos corantes disponíveis (Collins, 2004), mais o mais usual será o brometo de etídio, fluorescente, que se liga ao DNA intercalando com os pares de bases. Uma das desvantagens desta coloração e a mais pertinente, é o facto de o brometo de etídio ser um reagente com potencial mutagénico, podendo tornar-se cancerígeno quando a exposição ocorre num largo período de tempo (Collins, 2004), pelo que a sua utilização deve ser acompanhada do emprego de medidas de segurança.

Há vários métodos disponíveis para classificar cometas. O mais apelativo é o *scoring* visual (Collins *et al.*, 1997), onde os cometas são inspecionados visualmente e incluídos numa de 5 categorias: 0, quando não há dano; 1-4, representativas de crescente intensidade do dano. Pode ser uma medida potencialmente causadora de variação intra- e interlaboratorial

(Forchhammer *et al.*, 2010) e de sub- ou sobrestimação das classificações (Azqueta *et al.*, 2011). No entanto, este método aproxima-se ao obtido com *software* de análise de imagem e é bastante útil e rápido, quando o investimento neste último não é uma opção (Collins *et al.*, 2008; Azqueta *et al.*, 2011). O *software* de análise de imagem permite estimar outros parâmetros, como: comprimento total do cometa; comprimento, densidade em percentagem de DNA e o momento da cauda, que é uma medida da dispersão da cauda que relaciona o comprimento da mesma com a percentagem DNA presente; ou percentagem de DNA na cabeça.

Há ainda muita discórdia em torno da melhor medida a utilizar (Collins *et al.*, 2008). Há uma grande tendência para se utilizar o momento da cauda, uma vez que relaciona o comprimento da mesma com o teor em DNA presente. Collins *et al.* (2008) ressaltam o facto de existirem várias formas para esta ser calculada e não possuir uma unidade padronizada, muito embora o sistema possa ser calibrado de forma a medir comprimento em micrómetros (unidade do SI). Esta medida é de difícil interpretação, pois é variável de acordo com o organismo e o tipo de célula a utilizar. Desta forma, os autores aconselham a medição da % TI (% *Tail Intensity*, ou % Intensidade da cauda), que é uma medida universal e pode ser utilizada por qualquer laboratório, diminuindo assim a variação de resultados (Collins *et al.*, 2014).

Este tipo de metodologia pode ser muito interessante ao nível da biomonitorização ambiental, permitindo constatar a presença ou ausência de substâncias genotóxicas no meio ambiente, com bastante sensibilidade. No entanto, apesar de *Daphnia magna* ser um organismo recorrentemente utilizado para estudos ecotoxicológicos, apenas nos últimos anos tem surgido interesse em compreender a ação das substâncias genotóxicas sobre o mesmo (David *et al.*, 2011). A sequenciação do genoma de *Daphnia magna* foi publicada recentemente, em Março de 2015 (*Daphnia Genomics Consortium*), abrindo caminho para que a ecotoxicogenómica se torne numa ferramenta capaz de expor respostas ocultas nos testes toxicológicos convencionais.

### 3.3. Organismo de estudo: *Daphnia magna* (Straus, 1820)

*Daphnia magna* é um microcrustáceo planctónico de água doce, que pode ser encontrado na Região Holártica e África (Benzie, 2005), em lagoas em regiões temperadas a

áridas, frequentemente em *habitats* marginais, eutróficos ou ligeiramente salinizados. Embora possa reproduzir-se o ano inteiro, se as condições do local o permitirem, a reprodução atinge o seu pico no período do Verão, no hemisfério norte. É um organismo euritermo, que tolera temperaturas entre 2-28 °C, condutividade até 2000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e pH 6.5-9.9 (Benzie, 2005). A sua anatomia pode ser visualizada na figura 1.

Possui um exosqueleto transparente, incolor-amarelado, fixo ao corpo no canto anterior-dorsal do tórax, que mimetiza uma capa que cobre o corpo (à exceção da cabeça), constituído por quitina, geralmente endurecido pela assimilação de  $\text{CaCO}_3$ , que lhe confere proteção e impermeabilidade (Becker, 1965; Covich, Thorp e Rogers, 2010), impedindo o crescimento de algas e protozoários.

Na região posterior da cabeça, encontram-se as antenas secundárias, projetadas bilateralmente e estão envolvidas na locomoção. Possui um olho composto central, de pigmentação escura, anterior a um olho simples – ocelo -, um pequeno ponto preto. O olho composto é constituído por estruturas denominadas omatídeos, que distinguem luz de escuridão (Benzie, 2005). A imagem obtida é uma composição da informação obtida de cada omatídeo.

Na região abdominal, encontram-se os membros torácicos ou filópodos, 4 a 6 pares, cobertos de cerdas. Juntamente com as antenas, a sua função é criar corrente que permita que as partículas de alimento possam ser filtradas e conduzidas até à boca. O alimento capturado é transportado para a boca e triturado pelas mandíbulas, alongadas e pouco visíveis, misturado com muco, formando o bolo alimentar. Desta forma, qualquer deficiência que coloque em causa a integridade destas estruturas, pode colocar em risco a sobrevivência do organismo (Covich, Thorp e Rogers, 2010).

Apesar de a maior parcela de alimento ser composta por fitoplâncton, podem ingerir também bactérias, protozoários, ou materiais originados de nanoplâncton em decomposição e detritos. No caso de *Daphnia magna*, habitualmente encontrada em ambientes lênticos, é capaz de criar correntes que ressuspendem os materiais sedimentados através do batimento dos seus membros torácicos, filtrando os primeiros (Benzie, 2005). No pós-abdómen, encontra-se a garra, responsável por limpar os membros torácicos e recusar o bolo desagradável ou que possua algas tóxicas (Dodson, Cáceres e Rogers, 2010). O intestino

inicia-se na boca, passa pela cabeça, segue pelo tórax e abdómen e termina no ânus. O intestino médio, no tórax, é o local de absorção de nutrientes. Aqui podem encontrar-se glóbulos amarelos ou alaranjados, onde são armazenados lípidos.

Junto ao intestino médio, encontram-se as gónadas, bilaterais. Quando se inicia o ciclo reprodutivo, os ovos abandonam as gónadas e desenvolvem-se na câmara incubadora, na região posterior do abdómen.

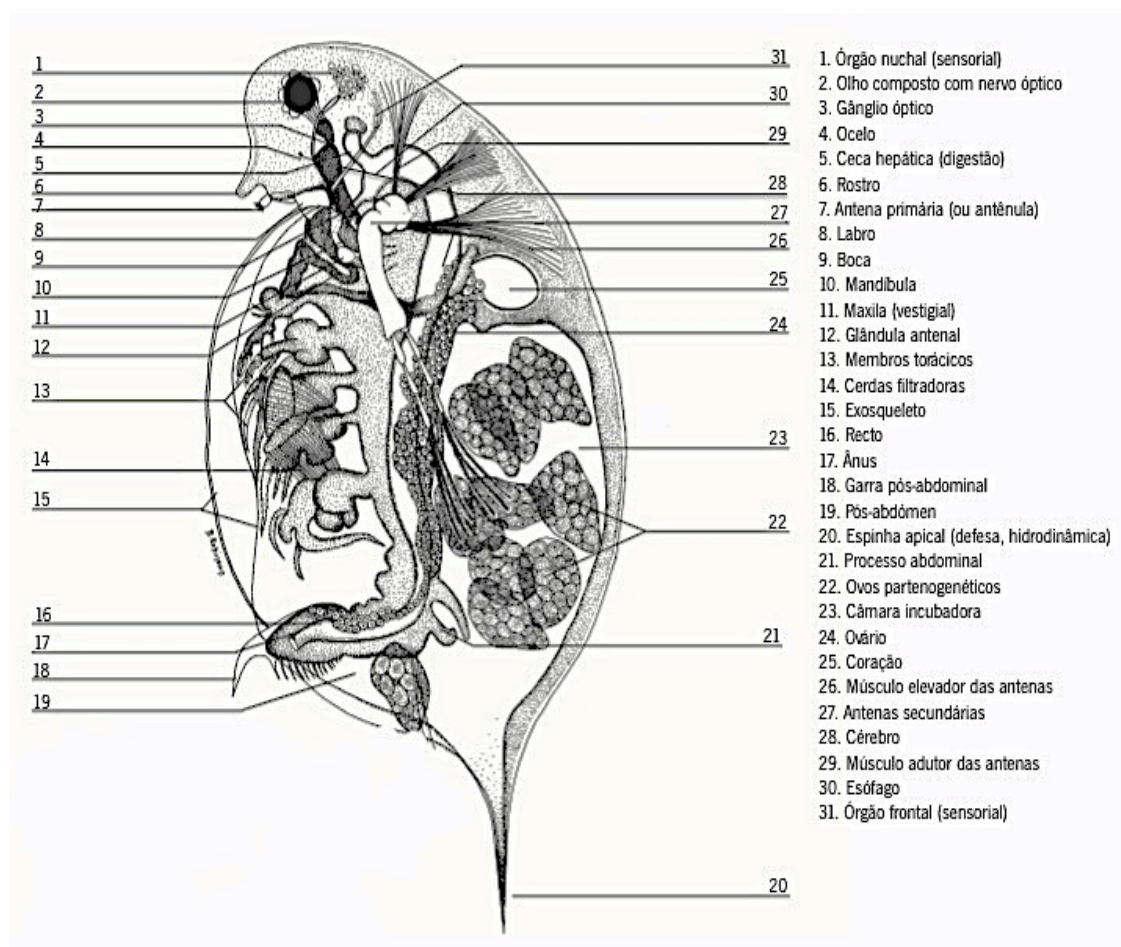
O sistema circulatório é composto pelo coração e as cavidades corporais. O primeiro encontra-se no tórax, na região anterior à câmara incubadora.

*Daphnia magna* possui uma esperança média de vida de 60 dias. O seu desenvolvimento compreende quatro fases: ovo, juvenil, adolescente e adulto. Num estágio inicial do desenvolvimento, é possível observar a existência de uma estrutura – náuplio -, onde as larvas se encontram protegidas no interior do ovo. Quando este eclode na câmara incubadora, dá origem aos juvenis, morfologicamente idênticos aos adultos, que serão libertados cerca de dois dias após este acontecimento. A ausência de estádios larvares externos e a produção de juvenis idênticos aos adultos, indica que se trata de um desenvolvimento direto (Covich, Thorp e Rogers, 2010).

Após a libertação dos juvenis, novos ovos são depositados na câmara incubadora. Os juvenis crescem apenas quando sofrem ecdise, que corresponde à libertação do exosqueleto, seguida do crescimento do organismo, enquanto a nova carapaça é elástica (Barros, 2001; Benzie, 2005; Covich, Thorp e Rogers, 2010). Reabsorvem a parte interna do seu exosqueleto, iniciam a síntese de um novo exosqueleto, absorvem água e, por fim, puxam o seu corpo para fora do antigo exosqueleto. Este processo pode demorar minutos a horas, expondo o organismo à vulnerabilidade da colonização por organismos epibiontes e exoparasitas, ou mesmo do *stress* fisiológico que se impõe (Barros, 2001) – o novo exosqueleto ainda pouco calcificado, é sensível à diminuição do pH do meio, p.e. (Covich, Thorp e Rogers, 2010). Juvenis sofrem 3 a 5 ecdises, até se tornarem sexualmente maduros, quando têm cerca de 6-10 dias (Barros, 2001; Benzie, 2005; Aragão e Araújo, 2014). Cada ecdise marca um estágio juvenil e a maturidade é assinalada pela passagem da primeira postura de ovos para a câmara incubadora.

A fase adolescente é representada pelo amadurecimento dos ovos na câmara incubadora, finda qual se segue a fase adulta, entre o 10<sup>o</sup> e o 13<sup>o</sup> dia de vida, que demarca o restante ciclo de vida do organismo (Barros, 2001). Machos e fêmeas de *Daphnia magna* continuam a sofrer ecdise, mesmo após se tornarem organismos adultos, embora o crescimento intermudas desacelere com o amadurecimento. A energia passa a ser transferida para a reprodução, em vez do crescimento.

Ocasionalmente, pode ocorrer o aborto de ovos, embriões ou juvenis, quando estes indivíduos são inviáveis (Barros, 2001; Covich, Thorp e Rogers, 2010; OCDE, 2012).



**Figura 1.** Anatomia geral de *Daphnia magna*. Fonte: B. Robinson.

Na região pós-abdominal existem quatro processos abdominais. Acredita-se que o primeiro e o segundo estarão envolvidos na proteção da câmara de incubação, ao selá-la, impedindo a predação dos ovos por outros organismos (Benzie, 2005). Em *Daphnia*, os indivíduos adultos são capazes de transferir hemoglobina para os ovos, sendo a concentração



de hemoglobina na hemolinfa superior em embriões, em relação aos adultos (Kobayashi e Takahashi, 1994 *apud* Barros, 2001). Isto diz-nos que os embriões presentes na câmara incubadora, que contata diretamente com o meio, podem sofrer com as oscilações de oxigênio dissolvido no mesmo, podendo afetar o seu desenvolvimento.

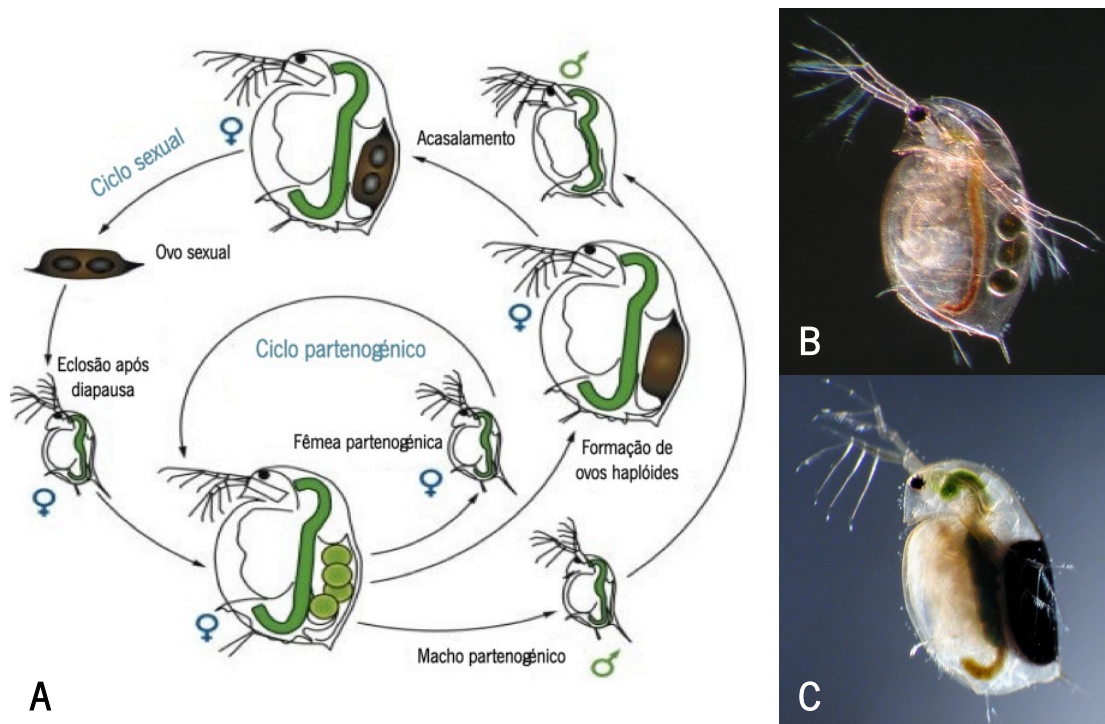
A duração e a qualidade do ciclo de vida dos cladóceros está profundamente relacionado com as condições ambientais. Este geralmente é proporcionalmente inverso à temperatura, devido à alteração metabólica dos organismos (Barros, 2001; Aragão e Araújo, 2014), mas depende intimamente da alimentação também. Quando a progenitora está bem alimentada, os ovos recebem uma grande quantidade de lípidos. Se o alimento for um fator limitante, a progenitora pode amadurecer com um tamanho mais reduzido que o normal produzindo descendência mais pequena do que o esperado (Enserink, Luttmmer e Maas-Diepeveen, 1990; Gabsi *et al.*, 2014). Por outro lado, se o alimento abundar, o tamanho inicial influencia a idade em que a fêmea atinge a maturidade: à medida que o tamanho inicial aumenta, diminui o tempo para atingir a maturidade (Gabsi *et al.*, 2014). Além disso, quanto maior a fêmea, maior o número de ovos que ela será capaz de carregar na câmara incubadora. Logo, fêmeas maiores tendem a produzir mais descendência, mas mais pequena (Gabsi *et al.*, 2014). A alimentação e fatores ambientais podem também afetar a duração do período intermudas, o número de mudas até atingir a maturidade sexual, a idade na primeira reprodução, o número de neonatos produzidos por ninhada e o seu tamanho (Barros, 2001; Covich, Thorp e Rogers, 2010).

A reprodução pode ocorrer sexuada ou assexuadamente. A reprodução assexuada ocorre por partenogénese cíclica (Fig. 2A), onde fêmeas produzem ovos diplóides que dispensam fertilização por machos, originando fêmeas com características genéticas idênticas às da progenitora. Esta é uma das características de *D. magna* que a torna um organismo útil em ensaios ecotoxicológicos, pois permite diminuir a variação das respostas na sensibilidade dos organismos. Ao eliminar este fator, permanece ainda a influência ambiental, que pode ser também controlada com maior ou menor dificuldade, ao conter todos os parâmetros físico-químicos associados à cultura do organismo, dentro de limites estipulados. No entanto, isto nem sempre é um benefício, pois este método de realização dos testes toxicológicos, pode mascarar a resposta que se obteria *in natura*.

Embora normalmente as populações sejam compostas por fêmeas partenogênicas, *Daphnia magna* é capaz de alternar entre reprodução sexuada e assexuada, daí se tratar de uma partenogênese cíclica. Quando as condições do meio se tornam adversas, as fêmeas podem passar a produzir somente machos para fertilizarem ovos haplóides, ou ninhadas mistas. Evidências mostram que as fêmeas sexuadas podem ser induzidas por alterações no fotoperíodo, disponibilidade de alimento e densidade populacional elevada, ao passo que os machos derivam de mudanças no fotoperíodo ou de substâncias químicas produzidas quando há uma elevada densidade de fêmeas (De Meester, 1991; Barros, 2001; Benzie, 2005).

Os ovos podem ser de três tipos: partenogênicos, em diapausa sexual e em diapausa pseudosexual (Figs. 3A e 3B). Os primeiros são produzidos assexuadamente e dão origem a neonatos, ainda na câmara de incubação. Ovos em diapausa, podem ser produzidos assexuadamente ou sexuadamente. No primeiro caso, são ovos pseudossexuais, diplóides, que dão origem a filhotes macho ou fêmea. No segundo, ovos haplóides são fertilizados pelos machos, originando embriões em diapausa, envolvidos por uma carapaça dura e escura - o efípio. Este é libertado para o meio quando ocorre a ecdise ou muda da carapaça. Os efípios são considerados “ovos de resistência”, pois são perduráveis à desidratação e ao congelamento. O desenvolvimento pode ser retomado, quando houver um estímulo externo: presença de água, aumento do período diurno e água bem oxigenada (Barros, 2001; Benzie, 2005).

A reprodução sexuada traz algumas vantagens, ao aumentar a variabilidade genética, originando novos genótipos, o que eleva a probabilidade de estes organismos se adaptarem melhor a um novo meio (Benzie, 2005). Já a reprodução assexuada permite maximizar a reprodução, mas não possibilita a adaptação genética ao meio e está associada à acumulação de mutações deletérias (Covich, Thorp e Rogers, 2010).



**Figura 2. A.** Ciclo de vida de *Daphnia magna*, representando ambos os processos reprodutivos: partenogénese e reprodução sexual. **B.** Fêmea com ovos partenogénicos na câmara incubadora. **C.** Fêmea com efépio totalmente formado. Fonte: Ebert (2005).

O género *Daphnia* é amplamente utilizado na investigação em Biologia e Ecologia, devido ao facto de serem espécies *keystone* nas cadeias alimentares dulcícolas (Artal *et al.*, 2013; Becker *et al.*, 2014), uma vez que são os principais consumidores de algas, bactérias e protozoários e são o primeiro alimento de peixes, tornando-os interessantes como género indicador da perturbação dos ecossistemas aquáticos (Covich, Thorp e Rogers, 2010; Dodson, Cáceres e Rogers, 2010). Uma espécie *keystone* (ou espécie-chave), é uma espécie cuja presença controla populações em níveis tróficos inferiores ou superiores.

*Daphnia* spp. pode também ser utilizada como indicador de eutrofização. Normalmente, a população de dafnídeos atinge o seu auge quando ocorre um *bloom* de algas, desde que estas sejam comestíveis. Quando os campos agrícolas são tratados com fertilizantes, estes podem ser lixiviados para os cursos de água, com as chuvas. Ao atingir este corpo recetor, as algas poderão assimilar o fósforo e o azoto, proliferando e constituindo uma fonte de alimento para *Daphnia* spp, intensificando a sua reprodução. Os dafnídeos podem

também ser utilizados na biorremediação destes corpos eutrofizados, pois são capazes de filtrar algas a uma taxa de até 4 mL/animal/hora (Dodson, Cáceres e Rogers, 2010).

A fácil manutenção, a reprodução partenogénica (Beaton e Peters, 2014), a sensibilidade a poluentes e a relevância ecológica (Benzie, 2005), tornam *Daphnia magna* uma espécie atrativa para cultivo em laboratório e para a realização de testes toxicológicos (Artal *et al.*, 2013), muito embora esta não ocorra naturalmente no Brasil (Domingues e Bertolotti, 2014).

Normas brasileiras e internacionais (ABNT, 2009; OCDE, 2012) permitem alguma flexibilidade nos parâmetros de cultivo, desde que garantam o bem-estar dos organismos, o que torna o sucesso do cultivo altamente dependente do conhecimento e experiência do técnico responsável e não fomenta a construção de bases comparativas, o que impede comparações interlaboratoriais. Alguns estudos demonstraram que a utilização de diferentes meios para cultivo e realização dos testes de toxicidade com dafnídeos, pode produzir respostas inconstantes dos organismos aos poluentes (Knie e Lopes, 2004; .

Os meios de cultura podem ser classificados em dois tipos: naturais, se são obtidos diretamente do meio natural, como a água de rio/lago filtrada; ou artificiais, se são obtidos em laboratório, através da síntese de compostos químicos.

Os meios naturais, são mais económicos e fáceis de preparar, mas podem possuir substâncias na sua composição que interfiram com a sensibilidade dos indivíduos ou com a toxicidade das amostras em estudo, pois são procedentes de corpos hídricos cuja constituição sofre flutuações constantes (Bradley *et al.*, 1993 *apud* Barros, 2001). É necessário, então, que a sua composição seja conhecida ao pormenor, de cada vez que esta é captada. No entanto, isto não é viável por diversas razões: os custos de uma análise composicional rigorosa e de largo espectro são elevados, a água pode estar contaminada com compostos orgânicos que são identificáveis apenas por análises muito específicas, que na maior parte das vezes não são requeridas devido aos seus custos avultados (Guilhermino *et al.*, 1997; Knie e Lopes, 2004).

Para colmatar esta falta, determina-se que alguns critérios devam estar dentro de uma faixa aceitável, de forma a permitir que a sobrevivência e a reprodução dos organismos se provem satisfatórias. Alguns parâmetros físico-químicos devem ser controlados, para garantir

uma boa adaptação dos organismos e, como tal, as variações mensais de dureza, pH e condutividade não podem exceder os 10% das suas médias.

Neste aspeto, os meios artificiais trazem uma vantagem, uma vez que a sua composição química é conhecida ao pormenor, podendo ser alterada de forma a maximizar o desempenho reprodutivo das fêmeas de *Daphnia magna*. No entanto, o uso do meio artificial, normalmente é acompanhado da redução do desempenho reprodutivo das fêmeas, em relação aos meios naturais (Baird *et al.*, 1989 *apud* Barros, 2001), possivelmente porque o meio natural pode ser mais rico em nutrientes que sirvam de alimento à *Daphnia*. Além disso, podem possuir substâncias que interfiram com a toxicidade da amostra a testar (Elendt e Bias, 1990; Guilhermino *et al.*, 1997 *apud* Barros, 2001). Todavia, conhecendo a sua composição, esta pode ser regulada para colmatar essas faltas.

Há parâmetros de cultivo que devem ser levados em conta, para além da qualidade do meio. A temperatura, a alimentação, o oxigénio dissolvido, o pH, a dureza da água, o fotoperíodo e a densidade populacional, devem ser controlados cuidadosamente.

Os dafnídeos demonstram sensibilidade a luz, químicos, temperatura, toque, gravidade, pressão e som (Covich, Thorp e Rogers, 2010). O cuidado deve ser redobrado, ao manusear este tipo de organismos e a influência do manuseador deve ser minimizada, de forma a não interferir com a viabilidade dos organismos, nem com a resposta destes no teste toxicológico a executar.

A viabilidade das culturas mantidas em laboratório é sujeita a flutuações temporais, portanto é aconselhável efetuar-se inspeções periódicas às culturas, de maneira a descartar possíveis infeções fúngicas, que para além da eventual morte dos organismos podem inibir e inviabilizar a reprodução (Barros, 2001).

Existem diversas substâncias passíveis de serem usadas para avaliar a sensibilidade de *Daphnia magna*. A substância de referência é o dicromato de potássio (ABNT, 2009; ISO, 2012; OCDE, 2012). No entanto, este traz alguns inconvenientes, em relação ao seu desempenho e segurança do manipulador.

A utilização de uma substância com manuseio mais seguro, ainda causa alguma controvérsia. Uma das substâncias recorrentes é o cloreto de sódio. Apesar de alguns autores defenderem que o mecanismo de toxicidade do NaCl se dá através da desregulação osmótica

do organismo (Knie e Lopes, 2004), outros autores (Santos, 2008) crêem que não será esse o mecanismo e que, portanto, esta é uma substância recomendável.

A alimentação pode ser constituída por algas verdes unicelulares de diversas espécies, *Selenastrum capricornutum* ou *Desmodesmus subspicatus*, por exemplo. A alga deve ser colhida na fase exponencial, em que o crescimento atinge o seu ápice. As células de alga em cultura, sofrem variações na sua composição bioquímica, em função da sua idade. Células mais velhas contêm mais proteínas, ao passo que aquelas em fase exponencial possuem mais lípidos, que são essenciais para o crescimento da *Daphnia*, principalmente no estágio juvenil (Barros, 2001; Jordão *et al.*, 2015).

As culturas podem ser suplementadas com bactérias, ração para peixes ou levedura, desde que de marcas específicas e cuja composição seja conhecida. Este procedimento não é aconselhável, pois pode representar um foco de contaminação.

#### **3.4. Políticas mundiais de conservação e legislação em vigor**

A problemática da água tem sido uma questão amplamente discutida. Desde a década de 1970, têm sido realizados vários encontros globais, com o intuito de melhorar a gestão deste recurso (Cunha, 2002). Dentre eles pode destacar-se a “Conferência da Água das Nações”, a primeira grande reunião internacional a discutir esta questão, que culminou na produção do Plano de Ação de *Mar del Plata*. Neste documento, foram apresentadas diversas resoluções e recomendações relacionadas a questões no âmbito dos recursos hídricos, tornando o primeiro na pedra basal da gestão dos recursos hídricos. No entanto, houve dificuldades em passar da retórica à prática e a questão foi olvidada nos anos seguintes, muito embora tenham ocorrido outros encontros mundiais, sem grande sucesso.

A Cimeira Mundial da ONU, realizada em 1992 no Rio de Janeiro, estabeleceu um marco na História no que diz respeito ao crescimento sustentável. O seu objetivo era implementar um plano de ação que visasse o desenvolvimento sustentável da sociedade, onde houvesse justiça social e proteção ambiental. O documento decorrente, a Agenda 21, ambiciona uma gestão integrada e sustentável dos recursos hídricos, promovendo a monitorização da qualidade da água para abastecimento público e produção de alimento

adequados à população e o desenvolvimento de tecnologias com menor impacto ambiental (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2011).

Tido como um esforço para conciliar a tríade Ambiente – Economia – Sociedade, a sua aplicação não pode ser considerada plenamente frutífera, pois há diversos obstáculos impostos. Talvez o mais árduo seja a conscientização da população do papel proativo que lhe é exigido. No caso da Agenda 21 brasileira (CPDS, 2002), outra das barreiras encontra-se com a interpretação do documento, que está repleto de ideias conscientes do ponto de vista ecológico, social e financeiro, mas não é claro sobre *como*, *porquê* e *para quê* aplicá-las.

Na legislação brasileira, o documento mais antigo relacionado com os recursos hídricos, foi publicado em 1934 e denomina-se Código das Águas. Este visava, principalmente, incentivar e padronizar a exploração dos recursos naturais, com vista ao desenvolvimento económico (Finotti *et al.*, 2009).

Em 1997, surge a Lei Federal n.º 9.433/97, através da Política Nacional de Recursos Hídricos, que estabelece parâmetros para a gestão de conflitos relacionados com o uso da água (Maia *et al.*, 2013) e culmina com a criação dos comités de gestão das bacias hidrográficas.

A Resolução CONAMA n.º 357/2005 (CONAMA, 2005) dispõe-se a classificar as águas superficiais de acordo com, inicialmente a sua salinidade e em relação aos múltiplos usos que podem deter, estabelecendo também padrões para o lançamento de efluentes nos corpos hídricos (Finotti *et al.*, 2009). Esta resolução é corrigida e complementada pelas Resoluções CONAMA n.º 397/2008 e n.º 430/2011 (CONAMA, 2011). Esta última dispõe sobre os padrões e as condições de lançamento de efluentes em corpos de água. Desta forma, as fontes de água doce podem ser enquadradas em cinco classes – classe especial e classes 1, 2, 3 e 4 -, num sentido decrescente da sua qualidade. Segundo este documento, nos cursos de água inseridos nas classes 1 e 2, não é permitido observar, por meio de ensaios toxicológicos, efeito tóxico crónico. Nas águas de classe 3 é possível observar efeito tóxico crónico, mas não agudo. A Resolução n. 357/2005 não leva em conta a diversidade natural observada em cada bacia hidrográfica, que pode influenciar as suas características e, desta forma, da água nela contida (Cardoso-Silva, Ferreira e Pompêo, 2013).

A Resolução CONAMA n.º 357/2005 é um documento ainda carente, mas que visa melhorar a sustentabilidade em relação aos recursos hídricos, procurando exaltar a sua importância ecológica. O que se torna muito desordenado na legislação brasileira no que respeita este tema é que a informação existe, mas encontra-se dispersa. Não há um só documento que determine os padrões de lançamento de efluentes, por exemplo. Há uma panóplia deles, onde um modifica e melhora pequenos aspetos dúbios do anterior, onde se avança mais um pouco, mas não existe síntese e os dados de interesse tornam-se difusos.

Na perspetiva europeia, a Diretiva-Quadro da Água (DQA), Diretiva 2000/60/CE, foi um imensurável avanço na política de gestão dos recursos hídricos da União Europeia. A DQA propõe que os estados-membro desenvolvam um quadro de ação comunitária na gestão dos recursos hídricos, de forma coordenada e integrada, tratando a água como um bem da Comunidade, que deve ser preservado e utilizado de forma sustentável (Alves *et al.*, 2004; Palma, Ledo e Alvarenga, 2016).

As águas de superfície são classificadas de acordo com o conceito de “estado ecológico”, baseado na avaliação pela integração de aspetos físico-químicos e ecotoxicológicos (Alves *et al.*, 2004; Baattrup-Pedersen, Larsen e Riis, 2013). O estado ecológico expressa-se num “desvio ecológico” em relação a um corpo de água idêntico em condições pristinas (de referência) (Alves *et al.*, 2004; Martinez-Haro *et al.*, 2015; Palma, Ledo e Alvarenga, 2016). Nesta tendência, elas são encaradas como ecossistemas aquáticos, livremente do seu uso ou potencial e a sua avaliação consiste numa de qualidade ecológica. As condições de referência são essenciais para classificar as águas de superfície. No entanto, na Europa existem poucos locais isentos de ação antrópica, estão distribuídos desproporcionadamente e não cobrem todos os tipos de habitat. Assim, esta definição deveria basear-se na análise de dados de locais de referência, considerando a sua variabilidade espaço-temporal nas comunidades biológicas (Baattrup-Pedersen, Larsen e Riis, 2013; Matinez-Haro *et al.*, 2015; Palma, Ledo e Alvarenga, 2016).

Uma das principais diferenças entre a DQA e a Resolução CONAMA n.º 357/2005, prende-se com o esforço de recuperação dos mananciais, com vista à utilização da água. Na DQA há uma preocupação em recuperar um corpo de água ao seu melhor estado ecológico exequível. Na Resolução CONAMA n.º 357/2005 o plano assemelha-se a um de contenção.



Há uma classificação do recurso hídrico de acordo com a finalidade daquela água e estabelecem-se parâmetros que delimitem a presença de elementos, sem ter em conta os efeitos dos contaminantes e da acumulação dos contaminantes naquele ecossistema.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização da área de estudo

O município de Joinville pertence à região hidrográfica do Atlântico Sul, onde o principal bioma é Mata Atlântica e os ecossistemas presentes são florestas, campos, manguezais e restingas (Maia *et al.*, 2013). O município é o maior pólo industrial do estado de Santa Catarina, com o maior PIB do estado e quarto maior dos estados do sul do Brasil (IBGE, 2015). Este facto cria pressão sobre a disponibilidade e a qualidade dos recursos hídricos locais, uma vez que implica o aumento da demanda de água, devido aos fatores demográfico e socioeconómico (Gonçalves, Zanotelli e Oliveira, 2006).

A Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão (Norte), divide-se entre os municípios de Garuva e Joinville, situados na região nordeste do Estado de Santa Catarina, com 75% da sua área englobada no segundo. Segundo Gonçalves, Zanotelli e Oliveira (2006), a BHRC destaca-se pela sua área e pelo uso do seu manancial para abastecimento doméstico, industrial, agropecuário e turismo ecológico. O Comitê Cubatão Cachoeira Joinville (CCJ), entidade formada para a monitorização da bacia, destaca também o seu uso na mineração, piscicultura, rodovias, barragens, aeroporto, aterro sanitário doméstico e industrial e as extensas áreas de ocupação antrópica (Anexo D). A qualidade da água do rio Cubatão é monitorizada pelo CCJ desde o ano 2000.

A BHRC está dividida em duas Áreas de Proteção Ambiental: APA Quiriri e APA Serra Dona Francisca. Incluída na última, encontra-se a Reserva Particular do Património Natural Caetezal. A BHRC é composta por 18 sub-bacias, sendo as mais representativas: Alto Cubatão, Quiriri, Campinas, Rio do Braço e Baixo Cubatão.

O rio Cubatão nasce a 1200 m do nível do mar, na Serra Queimada e desemboca na Baía da Babitonga, o maior sistema estuarino do estado, localizado na porção norte do litoral. No interior desta baía localizam-se diversos outros estuários de menor porte, como é o caso do estuário do rio Cubatão (Schettini e Carvalho, 1999). Na sua margem direita, o rio Cubatão (Norte) recebe contribuição dos seguintes tributários: Tigre, Jerônimo Coelho, Seco, Isaac, Prata, Fleith, Kundt, Lindo, Alandf, do Braço e Mississipi. Já na sua margem esquerda, possui os seguintes afluentes: Campinas, Vermelho, Rolando, Rio do Meio e Quiriri, sendo o último o maior contribuinte. Todos os afluentes nascem na Serra do Mar, em cotas altimétricas

elevadas, geralmente acima de 700 m, sendo as únicas exceções as nascentes dos rios Mississipi e do Braço, situadas nas cotas de 250 m e 18 m, respetivamente (Gonçalves, Zanotelli e Oliveira, 2006).

O rio Cubatão é a principal fonte de abastecimento público de água da cidade de Joinville. De acordo com o Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Cubatão, este está enquadrado como classe 1 desde as suas nascentes até ao ponto de captação de água para abastecimento público, classe 2, dali até à confluência com o rio do Braço e classe 3 desde este ponto até à sua foz (Fig. 4).

De acordo com o Comitê da Bacia e Pereira (2005), ao longo do trecho do rio destacam-se atividades que impactam negativamente a sua qualidade, como o reflorestamento de espécies exóticas desde os seus pontos mais altos, áreas de agricultura e pecuária, bem como concentrações populacionais nas suas margens, fatores que possibilitam a disposição de substâncias químicas no corpo hídrico, provocando alterações químicas, físicas e biológicas. Segundo a classificação do Índice de Qualidade de Água (parâmetro que mede a suscetibilidade de um corpo de água sofrer contaminação ambiental), a água do rio Cubatão é boa até atingir a estação de captação e tratamento de águas da empresa Águas de Joinville – ETA Cubatão -, responsável pelo abastecimento público do município. A partir daqui, atravessa zonas urbanizadas e acaba por se unir ao rio do Braço, um dos seus afluentes principais, que drena todo o Distrito Industrial de Joinville (Maia *et al.*, 2013). Nos anos 50, devido a um histórico de inundações, foi construído um canal de desvio com início a jusante da ETA (Fig. 4), que deflete a água do rio em dois sentidos: num canal artificial quase reto até perto da foz do rio e outro, original, que circula pelo interior da cidade.

O rio do Braço serve como um canal para o despejo de efluentes domésticos e industriais (Fig. 3). Constatou-se já a presença de esgoto doméstico sem tratamento, a desaguar neste rio e nas suas margens predomina a atividade agropecuária, que pode representar um ponto de entrada de agrotóxicos. A qualidade das suas águas e o facto de ser um afluente do Cubatão, tornam-no num caso preocupante, pois o rio do Braço corre na zona mais urbanizada e industrializada do município (Zanotelli, Homrich e Oliveira, 2009; Oliveira *et al.*, 2009). Em 2009, Oliveira *et al.* levaram a cabo um diagnóstico ambiental do estado das águas da Bacia Hidrográfica do Rio do Braço e identificaram despejos oriundos das zonas rural, industrial e urbanizada, sendo que o último se mostrou mais significativo em todos os

pontos de amostragem, exaltando a necessidade de um sistema de colheita e tratamento de esgoto doméstico. O ecossistema ribeirinho encontra-se descaracterizado, em alguns locais. Em estudos anteriores (Zanotelli, Homrich e Oliveira, 2009), constatou-se a supressão da vegetação ciliar para dar origem a campos de cultivo, zonas urbanizadas e zonas de lazer.



**Figura 3.** Confluência do rio do Braço (água turva) com o rio Cubatão (água límpida). Fonte: Oliveira, 2006.

Em 2006, Oliveira *et al.* relataram a presença de elevadas concentrações de metais e coliformes fecais, acima do permitido na legislação, na foz do rio Cubatão (Norte). Estas discrepâncias foram atribuídas à escassez de estações de tratamento de efluentes, que permitia o despejo de efluentes domésticos e industriais diretamente no corpo do rio e às atividades de dragagem conduzidas na baía, que levavam à ressuspensão dos contaminantes.

#### **4.2. Definição dos pontos de amostragem**

Foram definidos cinco pontos (Fig.4) para a monitorização através de testes ecotoxicológicos, dois inseridos na sub-bacia do rio do Braço e os restantes no canal principal do rio Cubatão:

- **RB2**, localiza-se nas coordenadas 26º 14' S e 48º 51' O, pertencente ao rio do Braço, tem por objetivo a deteção da influência dos efluentes industriais, provenientes do Distrito Industrial Norte;

- **RB4**, nas coordenadas 26° 13' S e 48° 49' O, localizado na foz do rio do Braço e na confluência deste com o rio Cubatão, objetiva determinar a contribuição das atividades rural, industrial e urbana;

- **RC1** pertence ao canal principal do rio Cubatão, nas coordenadas 26° 10' S e 48° 57' O. Localiza-se a montante da ETA Cubatão e a sua monitorização justifica-se com a necessidade de determinar a qualidade da água de abastecimento público do município;

- **RC2**, também no canal principal e original, encontra-se nas coordenadas 26° 8' S e 48° 57' O. Este ponto situa-se a jusante de RC1, mas a montante de RB4, local da confluência com o rio do Braço. Assim, permite esclarecer qual é o aporte da zona industrial e agrícola que atravessa este trecho, sem a influência das águas provenientes do rio do Braço;

- **RC3**, situado a jusante de RB4, nas coordenadas 26° 13' S e 48° 49' O, permite caracterizar o estado do rio Cubatão, após o aporte das águas do rio do Braço.

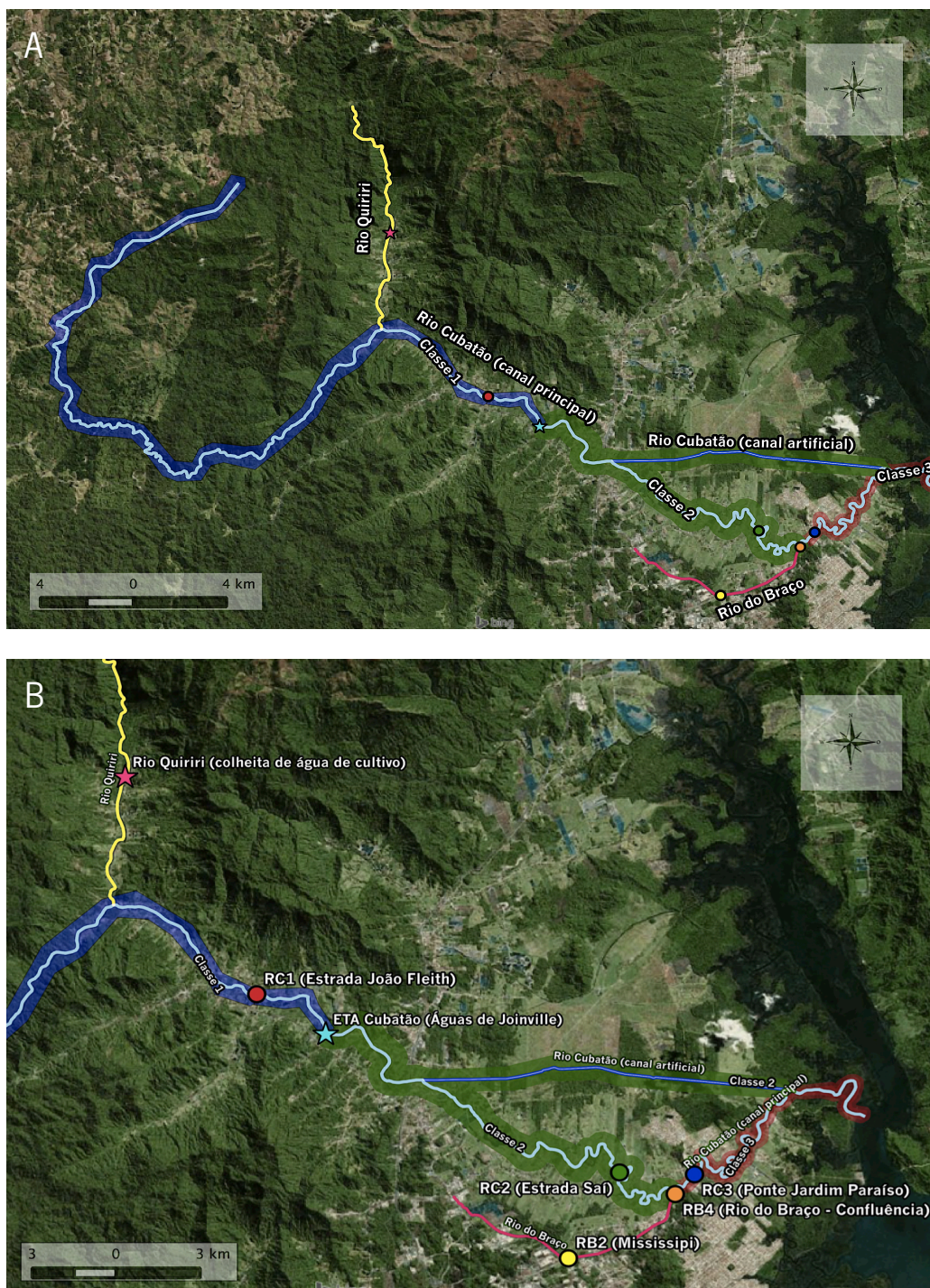
#### **4.3. Metodologia da amostragem**

Os parâmetros físico-químicos foram determinados no momento da amostragem, utilizando um multiparâmetro (modelo HI 9828, *Hanna Instruments, Inc.*). Para cada amostra mediu-se pH, oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), condutividade ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e turbidez (NTU). Os parâmetros analíticos que não foi possível determinar no momento da colheita, foram obtidos através de análises elaboradas por uma empresa que presta serviços ao CCJ.

A amostragem seguiu o recomendado pela norma técnica da ABNT, NBR 12.713 (ABNT, 2009).

A colheita de amostras foi realizada mensalmente, com o auxílio de um balde de polietileno, de 20 L de capacidade. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno de 500 mL de capacidade, devidamente identificados e mantidos em caixas isotérmicas com gelo até à chegada ao laboratório. Encheram-se os frascos com a amostra até ao topo, para evitar a alteração do pH, por presença de dióxido de carbono na bolha de ar.

Quando não era possível realizar o teste imediatamente, gelaram-se as amostras por 48 h, no máximo, ou congelaram-se por período inferior ou igual a 60 dias.



**Figura 4. A.** Mapa representativo da região amostral e das classes em que se enquadra a qualidade da água do rio Cubatão. **B.** Pormenor da região amostral, onde é possível observar a posição relativa dos pontos amostrais, do ponto de colheita de água para o cultivo de *Daphnia magna* e da ETA Cubatão. Coordenadas em datum WGS 84/Pseudo Mercator (EPSG: 3857). Fonte: Joana Campos.

#### 4.4. Índice de qualidade da água

O Índice de Qualidade de Água (IQA) tem como objetivo resumir os dados ambientais existentes e relacionar os fatores-chave, de forma a expor a qualidade do meio em questão e prever a suscetibilidade do mesmo a uma contaminação ambiental (Finotti *et al.*, 2009). Este foi desenvolvido como um método de avaliação da qualidade de água bruta, para o abastecimento público, após o seu tratamento. Surgiu a partir de um estudo desenvolvido nos EUA, nos anos 1970, onde foram consultados especialistas para a eleição dos fatores que consideravam mais pertinentes na avaliação da qualidade da água. A sua classificação dá-se num intervalo de 1 a 100 (Tab. 1), sendo 100 correspondente a água em ótima qualidade e 1 a água de qualidade péssima.

Para o cálculo do IQA mediram-se 9 parâmetros físico-químicos (Anexo A): pH, temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), coliformes termotolerantes ( $\text{NMP}.100 \text{ mL}^{-1}$ ), azoto ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), fósforo ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), sólidos totais ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), turbidez (NTU), oxigénio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e demanda bioquímica de oxigénio ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). A maioria destes parâmetros está ligada à contaminação proveniente de esgotos domésticos e a ausência de qualquer um destes, inviabiliza o cálculo do IQA.

Os índices para os diferentes pontos monitorizados, foram obtidos a partir de relatórios produzidos pelo CCJ, no período compreendido entre Outubro/2014 e Julho/2015, inclusivamente (CCJ, 2015).

**Tabela 1.** Categorias e respetivos intervalos de ponderação para atribuição do Índice de Qualidade da Água. Fonte: CETESB, 1988.

Categoria	Ponderação
Ótima	$79 < \text{IQA} \leq 100$
Boa	$51 < \text{IQA} \leq 79$
Razoável	$36 < \text{IQA} \leq 51$
Má	$19 < \text{IQA} \leq 36$
Péssima	$\text{IQA} \leq 19$

#### 4.5. Cultivo dos organismos-teste

As matrizes que deram origem ao cultivo foram cedidas pela Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e já eram cultivadas no laboratório de Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) há pelo menos dois anos, aquando do início do presente estudo. Os organismos foram cultivados em meio natural. A água para síntese do meio foi quinzenalmente colhida da nascente do rio Quiriri, o maior afluente do rio Cubatão, nas coordenadas 26° 6' S e 49° 0' O. Foi realizada uma análise de potabilidade, com vista a confirmar a aplicabilidade da água para este efeito (Anexo B). O critério de seleção do local dependeu da sensibilidade dos organismos à mesma e do local de onde seria captada (não poderia existir influência antrópica nas imediações) (ABNT, 2009). Esta água foi filtrada e foram adicionadas quatro substâncias (Anexo C), para evitar a propagação de algas e micro-organismos e para ajustar a dureza a um intervalo entre 175-225 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> (ABNT, 2009). Se necessário, o pH era ajustado a 7.6-8.0 (ABNT, 2009).

Segundo a norma da ABNT NBR 12.713 (2009), todas as semanas foi iniciado um novo lote com 50 organismos em 2 L de meio, com idade entre 2-26 h, provenientes de fêmeas de outros lotes com idades entre 10 e 60 dias. As idades dos lotes variaram de uma a oito semanas. Da mesma forma, todas as semanas se eliminou o lote mais antigo.

Os lotes foram mantidos em câmaras incubadoras, numa sala destinada apenas à manutenção do cultivo, num fotoperíodo 16 horas luz: 8 horas escuro, com intensidade 500–1000 lux, a temperatura 20±2 °C (ABNT, 2009).

O meio foi substituído duas vezes por semana, porém os juvenis foram retirados todos os dias, exceto ao fim de semana (ABNT, 2009).

Os organismos foram alimentados com a alga verde unicelular *Desmodesmus subspicatus*, cultivada em meio oligo (ABNT, 2009), retirada em fase exponencial. De acordo com a norma da ABNT NBR 12.713 (2009), foram fornecidos uma suspensão da alga verde unicelular, numa concentração de aproximadamente 10<sup>6</sup> céls.mL<sup>-1</sup> por organismo e um suplemento constituído por ração de peixes TetraMin® (Spectrum Brands Family, EUA) e levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a 0.02 mL por organismo (obtido a partir da solubilização de 5 g de ração e 2.5 g de levedura, em 1 L de água desionizada).



#### 4.5.1. Controlo da sensibilidade dos organismos-teste

A sensibilidade da cultura foi monitorizada mensalmente, utilizando dicromato de potássio como substância de referência. A  $CE_{50,24h}$ , expressa em  $mg.L^{-1}$ , foi calculada utilizando o método Trimmed-Spearman Karber (Hamilton, Russo e Thurston, 1977) e manteve-se sempre dentro do intervalo aceitável para *Daphnia magna* (0,6 - 2,1  $mg.L^{-1}$ ).

#### 4.6. Metodologia do ensaio agudo

Os testes agudos consistiram na exposição de indivíduos jovens às amostras não dilutas dos 5 pontos e um controlo negativo constituído de meio de cultivo, durante um período de 48 horas. Foram realizados mensalmente.

O protocolo seguido foi o recomendado pela norma NBR 12.713 (ABNT, 2009): quatro tubos de ensaio receberam uma alíquota de 10 mL de amostra, onde foram introduzidos 5 organismos neonatos por tubo (Fig. 5), com idades entre 2 e 26 horas, previamente alimentados apenas com alga. A introdução dos organismos foi realizada com uma pipeta de Pasteur, tendo cuidado para evitar diluir a amostra ou injetar ar sob a carapaça dos indivíduos.

Os testes foram realizados em duplicata e mantidos em câmara incubadora a uma temperatura de  $20 \pm 2$  °C, num fotoperíodo de 16 horas luz: 8 horas escuro, cobertos com filme PVC, de forma a evitar a evaporação da amostra ou possíveis contaminações. Os organismos não foram alimentados durante o teste. Para todas as amostras foi medido pH, oxigénio dissolvido, condutividade e temperatura, no início e no final do teste, procedendo apenas ao ajuste do valor de pH do controlo negativo ao intervalo 7.6-8.0, caso necessário.

No final das 48 horas, o *endpoint* medido foi a imobilização dos indivíduos. Qualquer indivíduo sob estímulo luminoso de 15 segundos que permanecesse imóvel, foi contado. A imobilização é diferente da mortalidade. Para *Daphnia magna* pode ocorrer imobilização, sendo que o organismo não consegue movimentar-se, sem que ocorra necessariamente mortalidade, pois os organismos continuam a apresentar batimentos cardíacos (Araújo e Buratini, 2005).

Os testes foram considerados válidos, quando a imobilidade no controlo negativo não excedeu 10% (ABNT, 2009).

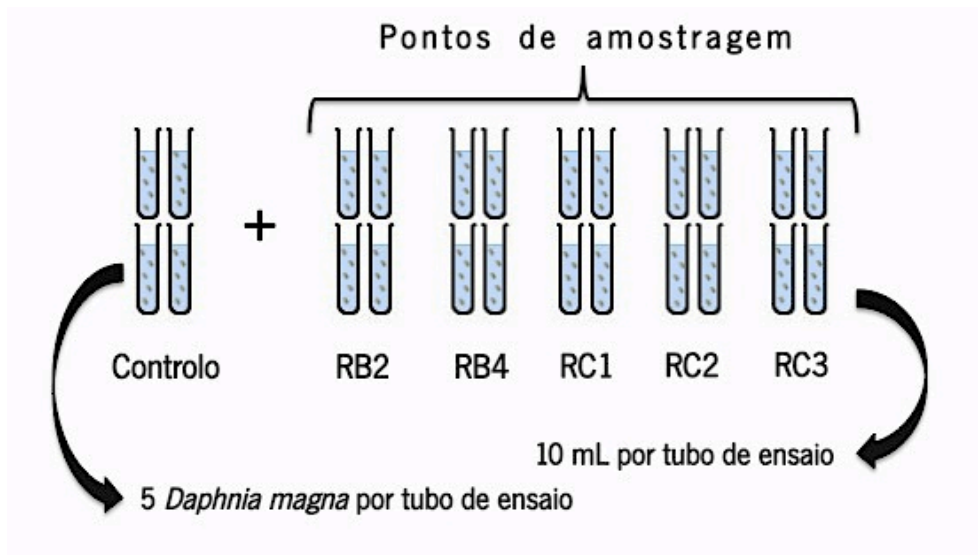


Figura 5. Desenho experimental do teste agudo com *Daphnia magna*.

#### 4.7. Metodologia do ensaio crónico

O ensaio crónico foi realizado de acordo com Brentano (2006), com algumas modificações. O método consiste na exposição dos organismos à amostra bruta, durante 21 dias, um período representativo do seu ciclo de vida, para avaliação dos efeitos na sobrevivência e reprodução dos organismos.

Os ensaios crónicos foram planeados sazonalmente, sendo que decorreria um ensaio por estação, uma vez que seriam complementados pelos ensaios agudos. No entanto, ao constatar-se a reduzida informação fornecida pelo ensaio agudo, optou-se por realizá-lo mensalmente. Assim, este ensaio foi levado a cabo nos meses de Outubro (2014), Fevereiro, Abril, Maio, Junho e Julho (2015).

Os tratamentos consistiram de um controlo negativo (meio de cultivo) e amostras brutas provenientes dos pontos RC1, RC2 e RC3. Dez gobelés por tratamento receberam uma

aliquota de 25 mL de amostra cada. Foi introduzido aleatoriamente um neonato com idade compreendida entre 2 e 26 horas, em cada gobelé (Fig. 6).

O sistema adoptado foi o semi-estático, em que os organismos são periodicamente transferidos para solução-teste fresca. Durante a primeira semana o meio foi substituído ao 7<sup>o</sup> dia. Nas duas semanas seguintes, foi substituído às segundas, quartas e sextas-feiras. O objetivo é manter sempre o potencial tóxico da amostra, visto que amostras ambientais são pouco estáveis e podem ser degradadas muito rapidamente (Knie e Lopes, 2004). Novos gobelés foram preparados com a amostra fresca e os indivíduos transferidos para os mesmos, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur com a ponta cortada, cuidando para evitar a diluição da amostra, ou causar *stress* aos organismos.

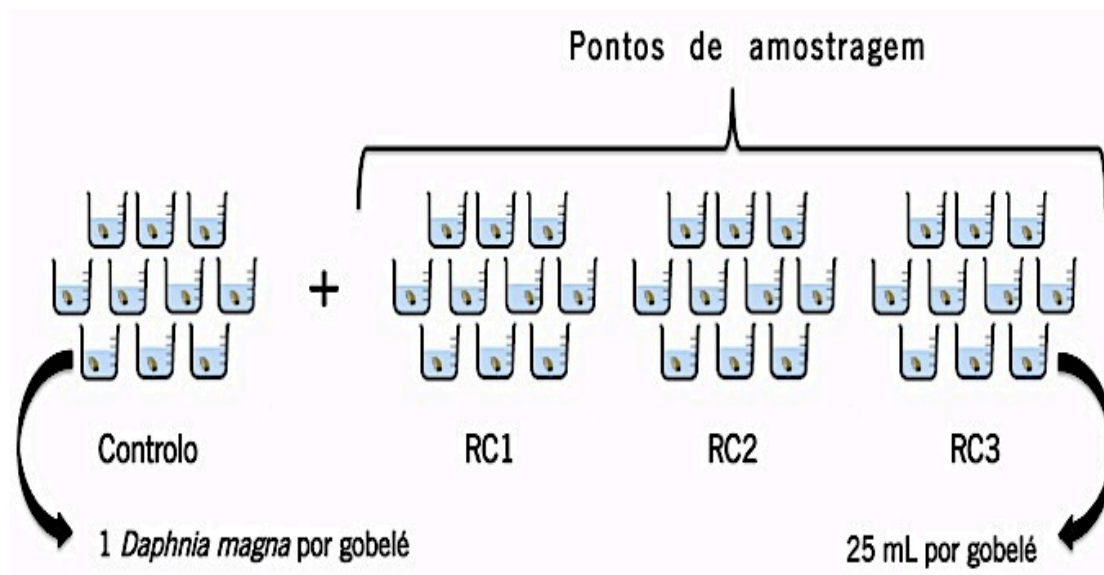


Figura 6. Desenho experimental do teste crónico com *Daphnia magna*.

Os indivíduos foram alimentados diariamente com a alga unicelular *Desmodesmus subspicatus*, durante a primeira semana de teste. Nas duas semanas subsequentes, foram alimentados a cada dois dias, aquando da renovação do meio.

Os organismos foram mantidos em câmara incubadora, num fotoperíodo 16 horas luz: 8 horas escuro, a 500-1000 lux e a uma temperatura  $20 \pm 2$  °C. Temperatura, oxigénio dissolvido, pH e condutividade foram medidos a cada substituição em cada tratamento, anotando os valores da amostra que era descartada e da nova aliqota.

As observações foram realizadas ao 7<sup>o</sup> dia e a partir daqui, todas as segundas, quartas e sextas-feiras, concomitantemente com a renovação do meio.

Os testes foram considerados válidos, quando a mortalidade no controlo negativo não excedeu 20% (OCDE, 2012).

#### 4.7.1. *Endpoints* analisados no teste crónico

De forma a avaliar a qualidade das amostras, os parâmetros analisados foram: sobrevivência, idade primípara, fecundidade, taxa de incremento populacional e qualidade da descendência.

A **sobrevivência** foi medida como o número de progenitoras sobreviventes no final dos 21 dias de teste.

A **idade primípara** foi avaliada, observando a idade das progenitoras no momento da sua primeira reprodução. A norma para o teste de químicos com *Daphnia magna* da OCDE, aconselha também o relato da idade primípara, entre outros parâmetros (OCDE, 2012).

A **fecundidade** foi traduzida no número médio de neonatos produzidos por fêmea. Se fosse observada a presença de machos, estes contavam apenas para os dados de sobrevivência.

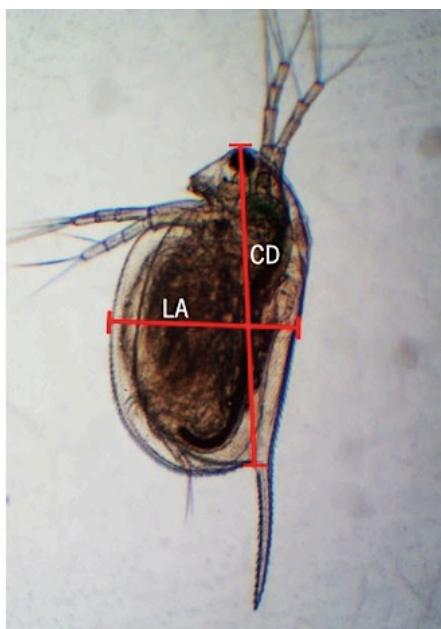
Caso ocorresse morte de alguma fêmea até ao 18º dia de teste, esta e a sua descendência deixariam de ser contados para efeitos de fecundidade. Se acontecesse após, os neonatos seriam tidos em conta, pois nesta altura a reprodução já é muito flutuante e eventuais adições não teriam grande efeito nas contagens.

A **taxa de incremento populacional ( $r$ , dia<sup>-1</sup>)**, uma medida que integra os parâmetros de fecundidade e mortalidade, foi calculada iterativamente a partir da equação de Euler-Lotka (McCallum, 2000; Begon *et al.*, 2006):

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x$$

onde  $e$  representa a taxa de crescimento discreto,  $r$  a taxa de incremento populacional (dia<sup>-1</sup>),  $x$  a faixa etária (em dias),  $l_x$  a probabilidade de sobrevivência à idade  $x$  e  $m_x$  a fecundidade à idade  $x$ . O valor de  $r$  para cada réplica foi obtido através da técnica de jack-knife (Meyers *et al.*, 1986; McCallum, 2000).

A **qualidade da descendência** foi medida através do crescimento dos juvenis (Fig. 7). As condições em que se encontram as progenitoras podem influenciar o *fitness* da descendência (Enserink, Luttmmer e Maas-Diepeveen, 1990; Gabsi *et al.*, 2014; Jordão *et al.*, 2015). Procurou-se verificar se existia influência das amostras no crescimento dos juvenis, medindo o seu comprimento dorsal (CD) (Navis *et al.*, 2013), mas também a largura abdominal (LA) (Sosak-Swiderská, Tyrawska e Dzido, 1998), uma vez que a zona abdominal é onde se alojam as vesículas lipídicas que servem de reserva de energia. Estas vesículas lipídicas são transferidas de progenitora para os embriões, durante o desenvolvimento na câmara de incubação e podem ditar o *fitness* da progénie a eventuais adversidades (Jordão *et al.*, 2015). O CL foi definido como a distância, em milímetros, do topo da cabeça até à base da espinha apical e LA como a medida em milímetros) da região mais larga da zona abdominal (Fig. 7). A investigação do crescimento em *Daphnia magna* não é novidade em Ecotoxicologia (Boersma, 1997; Pereira, Marques e Gonçalves, 2004; Navis *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2014). A qualidade da descendência já foi associada anteriormente à biomonitorização, pela medição do comprimento dorsal e da largura abdominal (Sosak-Swiderská, Tyrawska e Dzido, 1998). No entanto, não foram encontrados estudos que exponham a relação entre as duas medidas.



**Figura 7.** Esquema das medições efetuadas aos juvenis de *Daphnia magna*, com o objetivo de medir a qualidade da descendência. Foto: Joana Campos.

O critério de seleção dos neonatos baseou-se na sua idade. Foram selecionados apenas aqueles obtidos nas observações de quarta e sexta-feira, para garantir que tinham, no máximo, 48 horas de idade. A cada observação, três juvenis de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente para medição, através de um MOC (modelo Leica DM1000; Leica Microsystems, Alemanha), com câmera acoplada, a uma ampliação de 40x numa objetiva HI PLAN 4x (Leica Microsystems, Alemanha). O CL e a LA foram medidos utilizando o *software* ToupView 3.7 (Hangzhou ToupTek Photonics Co., Ltd.; China), que permite a medição de imagens em pixels e efetua automaticamente a conversão para milímetros.

Foi também anotada qualquer observação que se mostrasse pertinente como, por exemplo, alterações morfológicas ou comportamentais.

#### **4.8. Metodologia do ensaio do cometa**

Para os testes ecotoxicológicos incluiu-se um controlo negativo, com o intuito de afastar qualquer influência do método, materiais empregues e reagentes, na resposta de toxicidade. Nos testes agudos de Abril a Julho e nos crónicos de Maio a Julho, nos quais foi realizado o ensaio do cometa, incluiu-se também um controlo positivo que consistiu de uma solução de  $K_2Cr_2O_7$  a uma concentração que permitisse a sobrevivência dos organismos, mas não tão baixa que impedisse a observação de qualquer efeito genotóxico. Assim, para o teste agudo optou-se pela concentração mais baixa utilizada nos testes de sensibilidade –  $0.125 \text{ mg.L}^{-1} K_2Cr_2O_7$  – e no teste crónico utilizou-se  $1/10$  da  $CE_{50,24h}(K_2Cr_2O_7)$  –  $0.07 \text{ mg.L}^{-1} K_2Cr_2O_7$ .

O ensaio do cometa seguiu-se sempre à exposição dos organismos nos testes agudos ou crónicos. Para evitar que o número de organismos fosse um factor limitante para a realização do ensaio, nos testes crónicos efetuou-se uma reserva de alguns organismos. Para cada tratamento foi destinado um gobelé com 5 a 10 organismos, dependendo da disponibilidade, que foram colocados sob as mesmas condições que os do teste crónico: alimentação, temperatura, fotoperíodo e densidade populacional.

A metodologia seguiu a aplicada por Pellegrini, Gorbi e Buschini (2014), com modificações (Fig. 8). O protocolo incide sobre a utilização de células da hemolinfa, de dois tipos, distinguíveis pela sua estrutura globular (granulócitos) ou irregular amebóide. A hemolinfa é um líquido circulatório, com funções análogas à do sangue nos vertebrados.

Os organismos foram colocados num tubo eppendorf de 1.5 mL – 20 e 10 organismos por tratamento para os testes agudos e crônicos, respetivamente -, com 400 µL de tampão P (0.1 M tampão fosfato, 0.2% ácido cítrico, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.8) (Pellacani *et al.*, 2006) e 100 µL de microesferas de vidro (Ø 0.25-0.50 mm). A suspensão celular foi obtida através do rápido choque num amalgamador (modelo Ultramat 2, Southern Dental Industries, Austrália; frequência de oscilação: 4550 opm) – 1 segundo para organismos do teste agudo e 2 segundos para organismos do teste crónico. O volume foi aspirado para um tubo eppendorf 1.5 mL, novo. Para um outro tubo eppendorf aspirou-se 25 µL para análise de viabilidade celular e reservou-se. O restante volume foi centrifugado a uma velocidade de 4000 rpm (INCQS/FIOCRUZ, 2011), por 5 minutos (modelo 5415R, Eppendorf Inc., Alemanha). Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão (BPF, 0.7%). Este volume foi distribuído equitativamente sobre quatro lâminas de microscopia previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal (PFN, 1.5%) e imediatamente cobertas com uma lamínula. Após a solidificação, retiraram-se gentilmente as lamínulas e as lâminas foram colocadas num banho de solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 1991), a 4 °C, pelo menos durante uma noite (*overnight*), mas não mais de 24 horas.

Após a lise, as lâminas foram colocadas numa cuba eletroforética, com tampão alcalino de eletroforese (NaOH 300 mM, 1 mM EDTA, pH>13) (Singh *et al.*, 1988), por 5 minutos para permitir o desenrolamento do DNA. No final deste período, procedeu-se à corrida eletroforética (10 minutos, 25 V, 300 mA) (Singh *et al.*, 1988; INCQS/FIOCRUZ, 2011). No final deste procedimento, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) (Singh *et al.*, 1988), da seguinte forma: três vezes 2 mL de tampão por lâmina, em intervalos de 5 minutos. Após a neutralização, foram fixadas em etanol absoluto.

Desde a trituração dos organismos até ao final da corrida eletroforética, todo o procedimento foi realizado com a luz do laboratório desligada, para evitar provocar mais danos ao DNA.

Para analisar as lâminas, adicionaram-se 30 µL de solução corante de brometo de etídio (20 µg.mL<sup>-1</sup>) e observaram-se sob microscópio de fluorescência (modelo Nova 606; Nova Instruments, Brasil), a um aumento de 400x, um filtro de excitação de 450-490 nm e

um filtro barreira de 520 nm, apresentando-se os cometas com uma coloração verde ou verde-alaranjada.

O critério de validação do teste determinou que seria aceite caso a análise da viabilidade celular acusasse pelo menos 80% de células viáveis. A viabilidade foi testada num MOC, a uma ampliação de 400x, utilizando o corante azul de tripano (0.5%) e procedendo-se à contagem das células viáveis e inviáveis, numa amostra de 200 células (Collins *et al.*, 1997; Zenkner *et al.*, 2012). As viáveis apresentavam-se brilhantes, ao passo que as inviáveis adquiriam uma coloração azul, devido à penetração do corante através da membrana plasmática desintegrada.

Foram analisadas 2 lâminas por tratamento, num total de 50 cometas (Tice *et al.*, 2000; Lacaze *et al.*, 2011; Zenkner *et al.*, 2012) e classificados por *scoring* visual, numa faixa de classes de 0 a 4 (Collins *et al.*, 1997; Collins, 2004). Este sistema de classificação baseia-se na observação da proporção de DNA presente na cabeça e na cauda do cometa, pressupondo que num cometa com dano mínimo o DNA estará concentrado na região da cabeça e naquele de dano máximo, a cabeça será quase inexistente e o DNA encontrar-se-á disperso na cauda (Collins *et al.*, 1997; Collins, 2004; García *et al.*, 2004). Assim, a classe 0 corresponderá a um dano mínimo, onde se espera observar uma cabeça arredondada e ausência de cauda. As classes 1-4 correspondem a intensidades crescentes de dano, sendo que na primeira observar-se-á uma cauda mínima em relação à cabeça e na final, a cabeça será virtualmente inexistente, dando lugar a uma cauda extensa. Collins *et al.* (1997) concluíram que a classificação manual é quase linearmente relacionada com a % DNA na cauda (obtida através de *software* de análise de imagens), sendo que cada classe corresponde a ~20 % de DNA na cauda.

Obteve-se uma classificação total por tratamento (**TCS – Total Comet Score**), calculada para cada tratamento, aplicando a seguinte fórmula (Collins *et al.*, 1997; Collins, 2004):

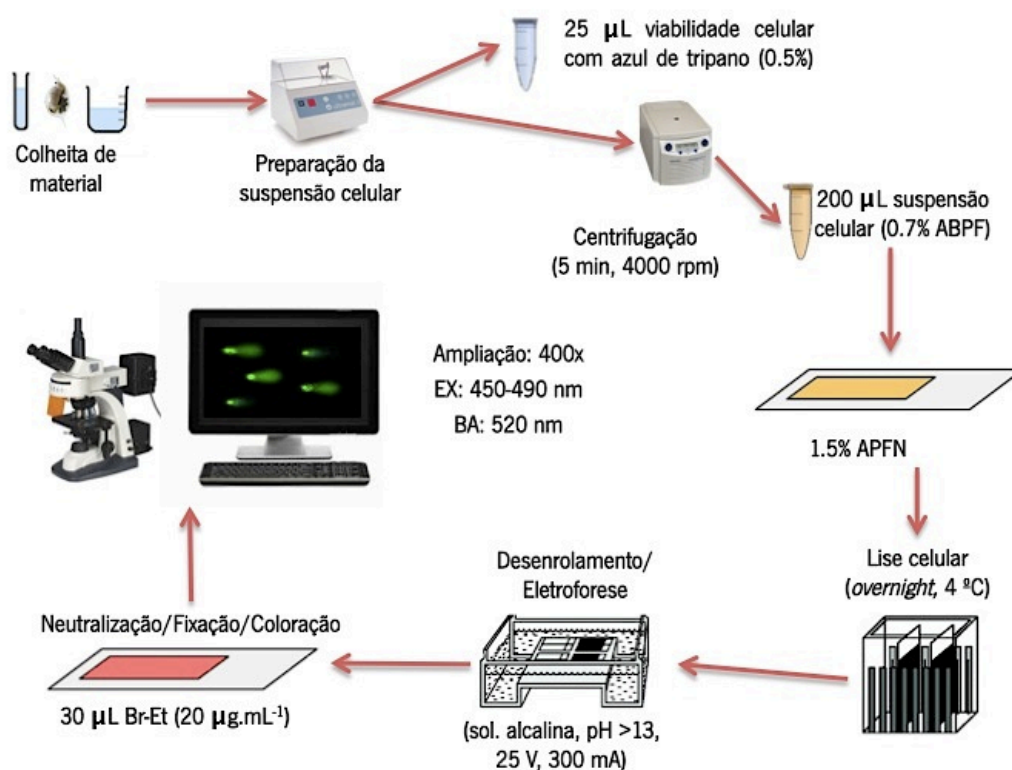
$$\text{TCS} = (\text{número de cometas na classe 0} \times 0) + (\text{número de cometas na classe 1} \times 1) + (\text{número de cometas na classe 2} \times 2) + (\text{número de cometas na classe 3} \times 3) + (\text{número de cometas na classe 4} \times 4)$$



Conseqüentemente, a classificação total manteve-se numa faixa entre 0 e 200, uma vez que foram classificados 50 cometas no total (Møller, 2005; Lacaze *et al.*, 2011; Zenkner *et al.*, 2012).

O problema surge com o tipo de análise estatística mais adequada a este tipo de dados, que normalmente seguem uma distribuição não-normal. Atualmente não existe consenso no método de análise estatística dos dados do ensaio do cometa (Lovell e Omori, 2008). Alguns autores sugerem que os dados devem ser analisados por testes não-paramétricos (García *et al.*, 2004), outros sugerem que eles sejam transformados de forma a verificarem os pressupostos de normalidade (Collins *et al.*, 1997) e há também quem aceite a aplicabilidade de testes paramétricos, mesmo violando o pressuposto da normalidade em determinadas condições, como homogeneidade de variâncias e número igual de observações em cada grupo (Lovell e Omori, 2008; Møller e Loft 2014; Pellegrini, Gorbi e Buschini, 2014).

Os critérios necessários para a determinação de um resultado positivo ou negativo de genotoxicidade, não estão bem definidos. No entanto, Lovell e Omori (2008) aconselham a comparação da média do dano e Bright *et al.* (2011), consideram que um aumento entre duas a três vezes em relação ao controlo negativo, é suficiente para uma resposta positiva.



**Figura 8.** Desenho experimental do ensaio do cometa.

#### 4.9. Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios agudos foram expressos qualitativamente, em percentagem de imobilização, de acordo com Barbosa (2000). Segundo a autora, existem três níveis de toxicidade para avaliar os testes agudos qualitativos: não tóxico, quando o *endpoint* está entre 0-10%; indício de toxicidade, quando compreendido entre 11-49% e tóxico, quando igual ou superior a 50%. Para cada ensaio mensal, utilizou-se o teste exato de Fisher para comparar os diferentes tratamentos com o controlo negativo, baseando no número de observações efetuadas de organismos móveis/imóveis.

Sendo o parâmetro de sobrevivência dos ensaios crónicos uma variável dicotómica (semelhante ao caso supracitado), traduzido em observações vivo/óbito, foi também analisado através do teste exato de Fisher, cruzando mensalmente os dados dos tratamentos com os do controlo negativo.

Os parâmetros idade primípara, fecundidade e taxa de incremento populacional, foram testados para a sua normalidade - teste de Shapiro-Wilk - e homocedasticidade - teste de Bartlett. O parâmetro “idade primípara” não seguiu uma distribuição normal, nem se observou homogeneidade de variâncias, pelo que cada ensaio foi analisado por métodos não-paramétricos – teste de Kruskal-Wallis. Observando-se diferenças significativas, este teste foi seguido de um outro teste não-paramétrico – teste de Mann-Whitney -, com o intuito de discernir entre que tratamentos existiam diferenças na distribuição. Os restantes parâmetros apresentaram distribuições normais e homogeneidade de variâncias, pelo que cada ensaio mensal foi analisado através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett para discriminar qualquer tratamento discrepante em relação ao controlo negativo.

A qualidade da descendência foi mensurada através da medição do CL e LA dos neonatos. Determinou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ) entre as variáveis, de forma a definir de que forma se relacionam e obteve-se uma reta através da regressão linear. Ambas as variáveis foram testadas para a normalidade e homocedasticidade dos dados. Foi aplicada, então, a ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett.

Os dados relativos ao ensaio cometa também foram testados para a sua normalidade e homocedasticidade. Embora se tenha observado homogeneidade de variâncias, estes não seguiram uma distribuição normal. No entanto, uma vez que os dados eram homocedásticos e o número de observações era elevado e igual para cada tratamento, optou-se por se aplicar

uma ANOVA de uma via, sendo que o teste não perde tanto poder e robustez se estas condições forem estabelecidas e a probabilidade de se observar um erro do tipo I é muito reduzida (Zar, 2010). Seguiu-se o teste de Dunnett, novamente para discriminar diferenças significativas entre tratamentos e o controlo negativo.

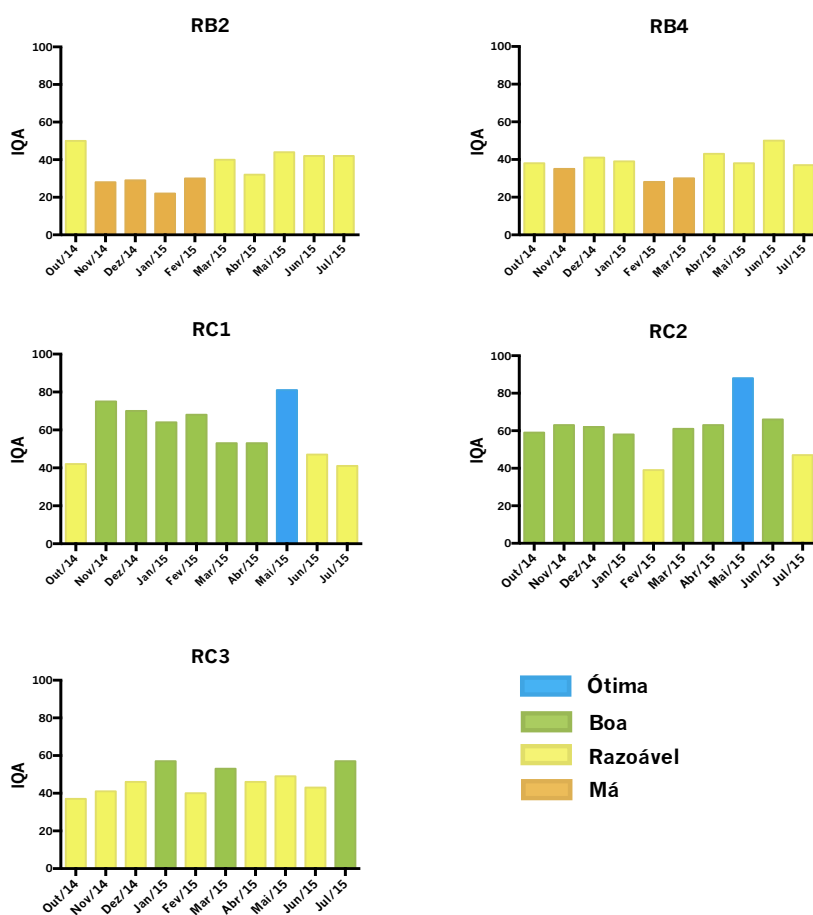
Os dados mensais do ensaio do cometa são apresentados em percentagens de cometas em cada classe de dano e em TCS (unidades arbitrárias – **u.a.**).

Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 0.05. A análise estatística foi elaborada no *software* STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.; EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Índice de Qualidade da Água

Os dados de IQA para o período de estudo, permitem constatar que, de uma forma geral, a pior classificação (Tab.1) não foi atingida em nenhum dos pontos monitorizados. Da mesma forma, apenas os pontos pertencentes ao rio Cubatão atingiram as melhores classificações.



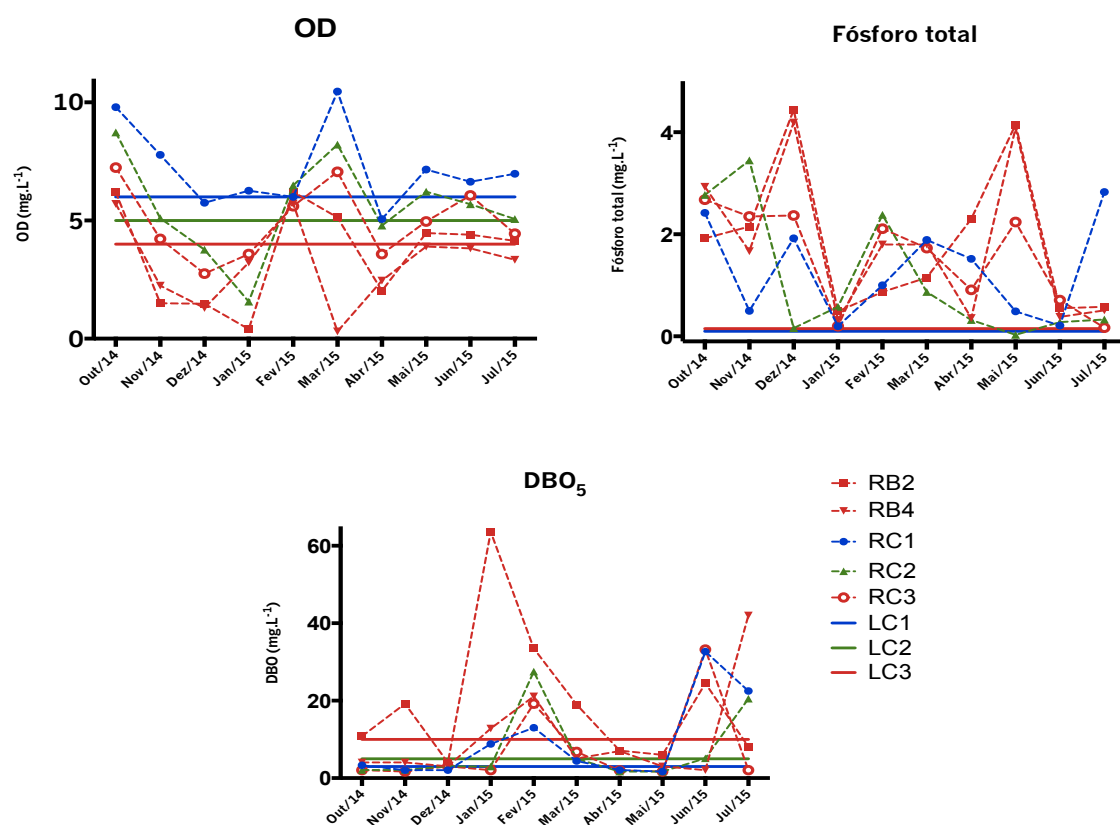
**Figura 9.** IQA obtido em cada um dos pontos, durante o período de estudo. Fonte: CCJ, 2015.

Não aparentam existir diferenças significativas entre os pontos RB2 e RB4, ou entre os pontos RC1 e RC2. No entanto, parece existir uma degradação acentuada da qualidade da água, atingindo o ponto RC3. Este facto pode dever-se ao aporte de águas contaminadas com efluentes industriais e domésticos (nomeadamente estes últimos), provenientes do rio do Braço (Anexo D). O ponto RC3 encontra-se a jusante do ponto RB4, que corresponde à

confluência do rio Cubatão com o rio do Braço e recorde-se que o motivo da sua monitorização se deve precisamente ao eventual aporte de águas contaminadas por parte deste último. Estudos prévios já haviam identificado a acção antrópica associada à descaracterização da região circundante ao ponto RB4, onde predominam as áreas de exploração agropecuária, industrial e urbana (Zanotelli, Homrich e Oliveira, 2009), resultando em despejos de contaminantes no curso do rio do Braço, sendo que os despejos domésticos são os mais representativos (Oliveira *et al.*, 2009).

## 5.2. Parâmetros físico-químicos

A Resolução CONAMA n.º 357/2005 não enquadra todos os parâmetros associados à avaliação da qualidade das águas, em limites específicos. Daqueles delimitados, apresentam-se os casos em que se verificou recorrentemente a falta de contenção nessa faixa de valores.



**Figura 10.** Valores de OD, fósforo total e DBO<sub>5</sub>, no período estudado (os parâmetros são apresentados em mg.L<sup>-1</sup>). LC1 - limite classe 1; LC2 – limite classe 2; LC3 – limite classe 3. A cor das linhas relaciona o ponto com o respetivo limite. No parâmetro “fósforo total”, LC1 e LC2 encontram-se representados pela cor azul.

O parâmetro fósforo total manteve-se sempre acima do permitido pela Resolução CONAMA n.º 357/2005, à exceção de RC1 e RC2, em Novembro e Maio, respetivamente. A DBO<sub>5</sub> também se apresentou recorrentemente acima do limite permitido, o que pode indicar a presença de matéria orgânica em decomposição. O OD também esteve frequentemente abaixo do limite mínimo, nomeadamente no ponto RC2 (classe 2), e em RB2, RB4 e RC3 (classe 3).

**Tabela 2.** Valores para as concentrações de azoto amoniacal e azoto total, durante o período de estudo. Fonte: CCJ, 2015.

Ponto	Mês	pH	Azoto amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	Azoto total (mg.L <sup>-1</sup> )
RB2	Out/14	7,23	1,2	13,7
	Nov/14	7,23	9,0	16,4
	Dez/14	7,12	1,5	12
	Jan/15	8,04	12,0*	12,3
	Fev/15	7,26	2,9	3,8
	Mar/15	7,34	11,0	11
	Abr/15	6,98	1,7	5,7
	Mai/15	7,50	23,2*	25,1
	Jun/15	7,12	5,8	10
Jul/15	7,20	2,2	8,2	
RB4	Out/14	7,00	1,80	6,4
	Nov/14	7,01	1,84	4,7
	Dez/14	7,00	2,07	4,1
	Jan/15	7,17	2,62	4,8
	Fev/15	6,48	0,66	2,9
	Mar/15	7,03	1,24	4,9
	Abr/15	6,79	1,61	4,6
	Mai/15	6,77	5,50	6,5
	Jun/15	6,71	1,36	3,9
Jul/15	7,02	2,17	5,3	
RC1	Out/14	8,14	<0,55	0,9
	Nov/14	8,08	<0,55	1,7
	Dez/14	7,61	<0,55	<0,6
	Jan/15	7,45	<0,55	1,5
	Fev/15	7,05	<0,55	1,2
	Mar/15	7,20	<0,55	2,5
	Abr/15	7,13	<0,55	1,9
	Mai/15	7,23	<0,55	<0,6
	Jun/15	6,95	<0,55	1
Jul/15	7,40	<0,55	<0,6	
RC2	Out/14	7,07	< 0,55	1,6
	Nov/14	7,06	< 0,55	<0,6
	Dez/14	6,80	< 0,55	<0,6
	Jan/15	7,23	< 0,55	28,7
	Fev/15	6,55	< 0,55	1,7
	Mar/15	6,83	< 0,55	2,5
	Abr/15	6,72	< 0,55	2
	Mai/15	7,01	< 0,55	<0,6
	Jun/15	6,82	< 0,55	1,2
Jul/15	6,98	< 0,55	<0,6	
RC3	Out/14	6,98	< 0,55	1,9
	Nov/14	6,94	< 0,55	1,8
	Dez/14	6,82	< 0,55	<0,6
	Jan/15	6,92	0,81	3,1
	Fev/15	6,49	< 0,55	1,9
	Mar/15	6,74	< 0,55	1,9
	Abr/15	6,83	< 0,55	2,2
	Mai/15	6,30	0,99	1,3
	Jun/15	6,71	< 0,55	1,7
Jul/15	7,12	0,81	2,7	

\* Valores que ultrapassam o permitido pela Resolução CONAMA n.º 357/2005.

O azoto e o fósforo existem sob duas formas nos sistemas aquáticos: orgânica e inorgânica. As espécies mais estáveis no meio ambiente e, desta forma, mais facilmente absorvidas pelos organismos são, no caso do azoto, a amónia ( $\text{NH}_4^+$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e, no caso do fósforo, o ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e compostos formados a partir da complexação deste (Jones, Reynolds e Raffaelli, 2006; Finotti *et al.*, 2009).

A análise da proporção de azoto amoniacal para azoto total é muito útil, pois permite estabelecer uma janela temporal do momento da contaminação (Tab.2). A determinação da forma de azoto presente numa amostra ambiental pode ser importante para estabelecer o estágio de poluição de um corpo hídrico. Nos lançamentos de efluentes mais recentes predominará a forma amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) e nos mais antigos, o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), devido ao processo de nitrificação pelos micro-organismos presentes no meio (Finotti *et al.*, 2009).

Elevadas concentrações destes nutrientes podem ser indicativas de eutrofização, uma vez que são fonte nutricional de algas (Finotti *et al.*, 2009; ANA, 2011). Elevadas concentrações de azoto amoniacal podem diminuir as taxas de crescimento em populações de *Daphnia magna* (Palma, Ledo e Alvarenga, 2015), o que não parece ser o caso presente, uma vez que as concentrações de azoto amoniacal nos pontos RC1, RC2 e RC3 se mantiveram sempre em valores muito abaixo do limite da Resolução CONAMA n.º 357/2005.

### 5.3. Ensaio agudos

Não se verificou a presença de toxicidade ou indício de toxicidade aguda em qualquer dos tratamentos, em qualquer uma das colheitas mensais, com exceção dos pontos RB2 e RC1, na colheita de Janeiro. Estes pontos apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo ( $P < 0.001$ , para ambos os pontos – teste exato de Fisher).

Uma vez que os episódios de toxicidade aguda ocorreram pontualmente em Janeiro, com elevada imobilidade em apenas dois dos cinco pontos (Tab. 3) e não adjacentes, sugere que se esteja perante um caso de falso positivo e que tenha existido algum tipo de interferência no teste, possivelmente em relação à qualidade do material utilizado, que a partir deste momento foi controlada com maior cuidado.

**Tabela 3.** Classificação do grau de toxicidade de amostras de água bruta dos rios do Braço (RB2 e RB4) e Cubatão (RC1, RC2 e RC3), a juvenis de *Daphnia magna*, com exposição de 48h. Os números entre parêntesis representam o número de organismos imobilizados, num total de 20 organismos. Valores marcados com \* mostram diferença significativa em relação ao controlo (teste exato de Fisher,  $\alpha = 0.05$ ).

	TRATAMENTOS					
	Controlo	RB2	RB4	RC1	RC2	RC3
Out/14	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (1)	Não tóxico (1)	Não tóxico (1)	Não tóxico (1)
Nov/14	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)
Dez/14	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)
Jan/15	Não tóxico (0)	Tóxico (14) *	Não tóxico (0)	Tóxico (10) *	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)
Fev/15	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)
Mar/15	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)
Abr/15	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)
Mai/15	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)
Jun/15	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (1)	Não tóxico (0)
Jul/15	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)	Não tóxico (0)

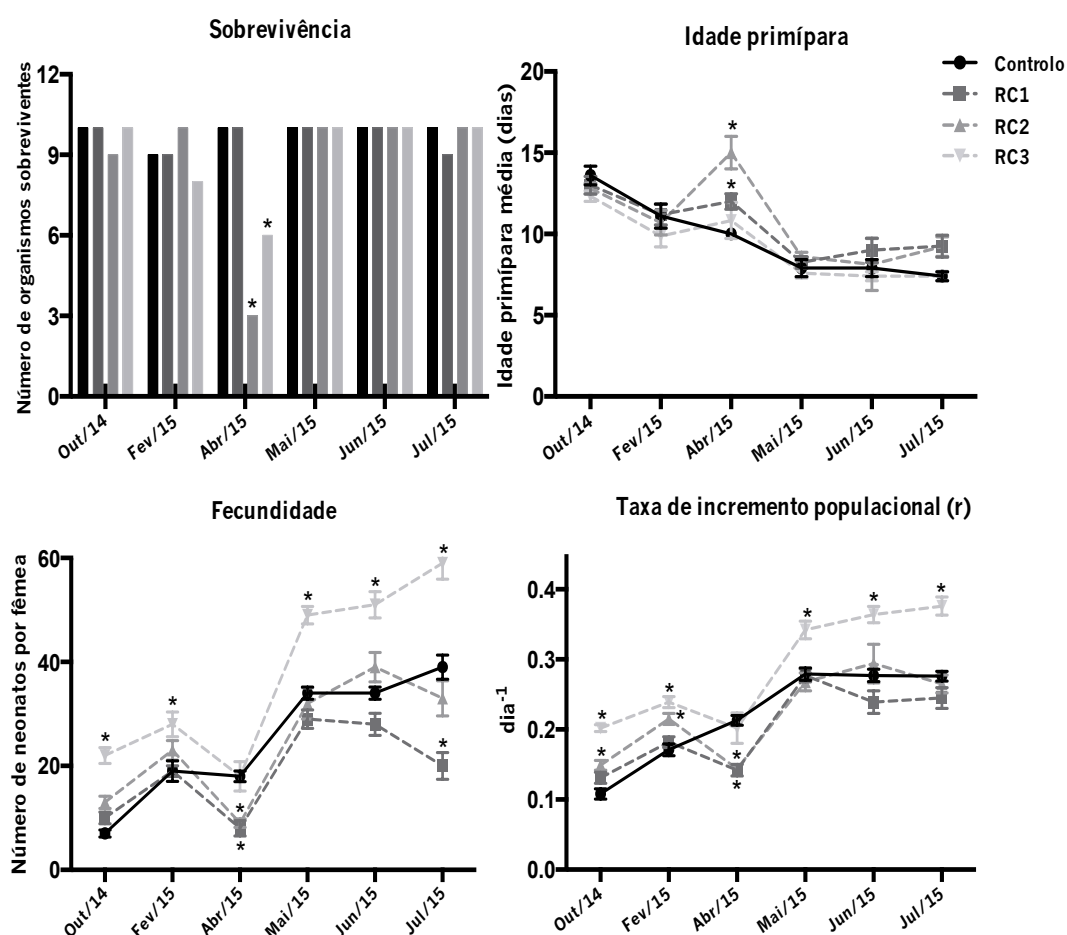
Não tóxico: 0-10%; início de toxicidade: 11-49%; tóxico:  $\geq 50\%$ .

Os resultados obtidos nos ensaios agudos, estão de acordo com aqueles obtidos por Palma, Ledo e Alvarenga (2016), onde os autores concluíram que este teste não é um bom indicador para a classificação do estado da qualidade de águas, pois é dependente da presença de concentrações suficientemente elevadas, que se traduzam no comprometimento da sobrevivência do organismo. Isto não é sinónimo da ausência de tais substâncias, nem da ineficácia da sua ação. Ela pode apenas ocorrer em relação a outros aspetos da vida e do desenvolvimento do organismo.



## 5.4. Ensaio crônicos

Em geral, a sobrevivência foi sempre elevada ao longo do estudo ( $\geq 80\%$ ). No entanto, no mês de Abril, observaram-se diferenças significativas nos tratamentos RC2 e RC3 ( $P < 0.01$  e  $P = 0.043$ , teste exato de Fisher), com percentagens de sobreviventes bastante abaixo do observado no controlo, em torno de 30 e 60%, respetivamente (Fig. 11).



**Figura 11.** Efeito da exposição a amostras não diluídas de diferentes pontos do rio Cubatão, nos parâmetros de sobrevivência, reprodutivos e populacionais de *Daphnia magna* (sobrevivência, idade primípara, fecundidade e taxa de incremento populacional). Os dados são apresentados para cada ensaio crónico. Os parâmetros idade primípara, fecundidade e taxa de incremento são representados pela média e respetivo desvio-padrão. Os tratamentos com diferenças significativas do controlo estão assinalados com \* ( $\alpha = 0.05$ ).

A idade primipara apresentou uma tendência decrescente desde Outubro a Maio, altura em que parece ter estabilizado (Fig. 11). Uma vez que o controlo negativo se comportou da mesma forma, sugere que esta variação esteja relacionada com o próprio organismo de estudo, com o cultivo ou a sua manipulação durante os ensaios, e que não seja resultado de exposição a contaminantes.

As diferenças significativas em relação ao controlo negativo ocorreram no mês de Abril ( $H_{(3,28)} = 14.28$ ,  $P = 0.003$ , teste de Kruskal-Wallis), nos pontos RC1 e RC2 ( $U = 10$ ,  $P = 0.003$  e  $U = 0$ ,  $P = 0.007$ , respetivamente; teste de Mann-Whitney), que se caracterizaram por uma idade à primeira reprodução mais elevada que os restantes tratamentos.

O parâmetro fecundidade pareceu evoluir positivamente ao longo do estudo. O tratamento correspondente ao ponto RC3 destacou-se sempre dos demais (Fig.11), com exceção do mês de Abril, em que ocorre uma queda abrupta da fecundidade em todos os tratamentos (exceto no controlo, que parece atingir um *plateau*), traduzindo-se em valores de fecundidade semelhantes entre o controlo e RC3.

A ANOVA de uma via revelou uma fecundidade elevada deste tratamento em relação ao controlo negativo, com diferenças significativas (Tab.4), nos seguintes meses: Outubro, Fevereiro, Maio, Junho, Julho. Os pontos RC1 e RC2 também apresentaram diferenças significativas em relação ao controlo negativo, com uma menor performance, nomeadamente no mês de Abril e no mês de Julho.

É de notar, também, o facto de não ter sido cumprido o critério de aceitabilidade determinado pela OCDE (2012), onde se deve esperar uma fecundidade média de 60 neonatos por fêmea para o controlo negativo. Além disso, existe um evidente padrão temporal nos tratamentos, inclusivamente no controlo negativo. Isto pode dever-se ao facto de, neste estudo, ter sido utilizado um controlo negativo proveniente de meio natural, que está sujeito à sazonalidade da composição do corpo de água de onde origina.

**Tabela 4.** Resultados da ANOVA de uma via e *post-hoc* de Dunnett, para o parâmetro de fecundidade, durante o período de estudo (**F**: valor-F, estatística da ANOVA; **P**: valor-p; **df1**: graus de liberdade intergrupos; **df2**: graus de liberdade intragrupos;  $\alpha = 0.05$ ).

Mês	Fecundidade				Post-hoc Dunnett Tratamento: valor-P
	F	P	df1	df2	
Outubro	9.62	< 0.001	3	35	RC3: P < 0.001
Fevereiro	3.89	0.018	3	31	RC3: P = 0.028
Abril	10.71	< 0.001	3	25	RC1: P < 0.001 RC2: P = 0.019
Mai	21.32	< 0.001	3	30	RC3: P < 0.001
Junho	18.73	< 0.001	3	29	RC1: P < 0.001
Julho	35.29	< 0.001	3	68	RC1: P = 0.014 RC3: P < 0.001

A taxa de incremento populacional ( $r$ ) seguiu sensivelmente o mesmo padrão de evolução que o parâmetro de fecundidade (Fig.11). No mês de Abril, embora os tratamentos provenientes dos pontos de amostragem do rio Cubatão tenham sofrido uma queda acentuada na taxa de incremento populacional, em relação aos ensaios anteriores (Outubro e Fevereiro), o controlo negativo não respondeu da mesma forma, apresentando uma taxa com crescimento positivo.

O aumento nos parâmetros reprodutivos, pode estar associado a elevadas concentrações de nutrientes nas amostras, que já em outros casos foi demonstrado poder camuflar o efeito de substâncias contaminantes, pela assimilação do fosfato, que está associado a uma melhor performance em *D. magna* (Ieromina *et al.*, 2014; Palma, Ledo, Alvarenga, 2016).

**Tabela 5.** Resultados da ANOVA de uma via e *post-hoc* de Dunnett, para o parâmetro taxa de incremento populacional, durante o período de estudo (**F**: valor-F, estatística da ANOVA; **P**: valor-p; **df1**: graus de liberdade intergrupos; **df2**: graus de liberdade intragrupos;  $\alpha = 0.05$ ).

Mês	Taxa de incremento populacional				<i>Post-hoc</i> Dunnett Tratamento: valor-P
	F	P	df1	df2	
Outubro	16.39	< 0.001	3	29	RC2: P = 0.003 RC3: P < 0.001
Fevereiro	14.72	< 0.001	3	32	RC2: P < 0.001 RC3: P < 0.001
Abril	6.63	0.002	3	25	RC1: P = 0.001 RC2: P < 0.001
Maio	9.93	< 0.001	3	33	RC3: P < 0.001
Junho	10.82	< 0.001	3	34	RC3: P = 0.001
Julho	21.13	< 0.001	3	33	RC3: P < 0.001

O tamanho de um neonato pode ser assumido como a quantidade de energia que lhe foi transferida pela progenitora, durante o seu desenvolvimento (Enserink, Luttmmer e Maas-Diepeveen, 1990; Gabsi *et al.*, 2014; Jordão *et al.*, 2015). Desta forma, pode ser um factor discriminante da qualidade da descendência produzida pela mesma progenitora, uma vez que pode ser indicativo do *fitness* da progénie.

A análise estatística permitiu constatar que existe uma forte correlação positiva ( $r = 0.8596$ ,  $n = 251$ ,  $P < 0.001$ ) entre o comprimento dorsal e a largura abdominal dos neonatos (Fig. 12). O coeficiente de regressão linear ( $r^2 = 0.7389$ ), permite-nos afirmar que uma dada medida é boa estimadora da outra, ou seja, dado um valor hipotético de comprimento dorsal, é possível estimar o valor da largura abdominal aproximado e vice-versa. Isto pode tornar-se útil para avaliar a condição nutricional da descendência, ou efeito de alguma substância, ou conjunto de substâncias, que interfira com o seu normal desenvolvimento, por exemplo.

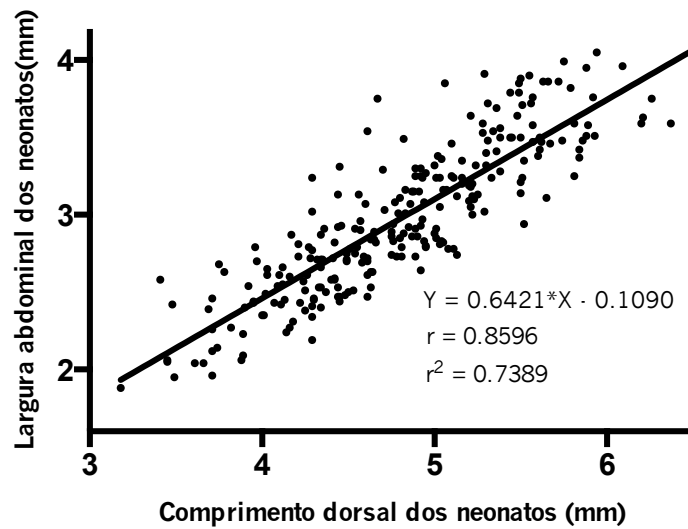


Figura 12. Diagrama de dispersão entre o comprimento dorsal (representado no eixo dos xx, em mm) e a largura abdominal dos neonatos (no eixo dos yy, em mm). Os dados são acompanhados do coeficiente de correlação de Pearson (r), da reta de regressão linear e do correspondente coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ).

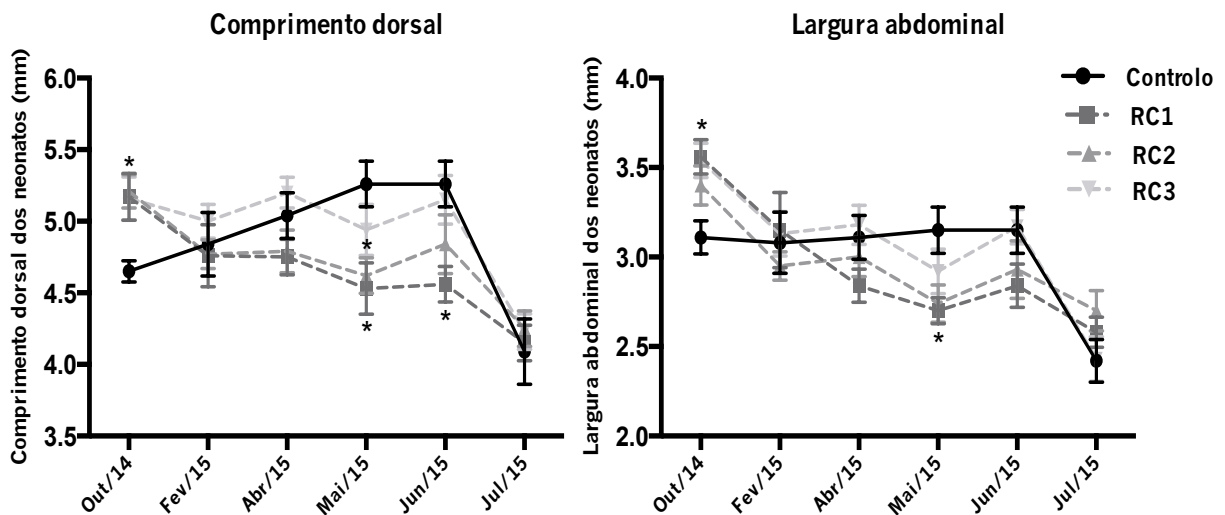


Figura 13. Médias e respetivos desvios-padrão, do comprimento dorsal e largura abdominal dos neonatos de *Daphnia magna*. Os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controlo, estão assinalados com \* (ANOVA de uma via,  $\alpha = 0.05$ ).

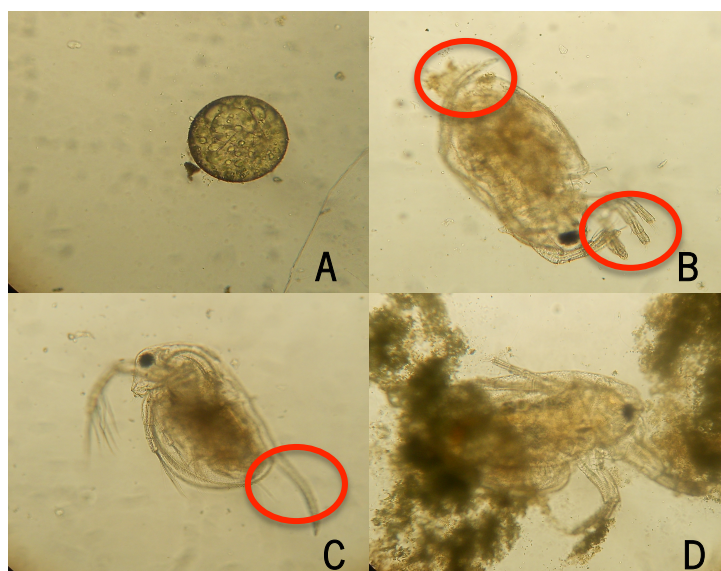
De um modo geral, nos tratamentos provenientes de amostras obtidas do rio Cubatão, observa-se uma tendência decrescente em ambos os parâmetros medidos (Fig.13). Esta tendência não se observa no controlo, sendo que no comprimento dorsal tende a ser positiva, ou seja, aumenta ao longo do período de estudo, ao passo que a largura abdominal parece manter-se estável, muito embora ambos os parâmetros sofram uma queda acentuada no mês de Julho. Esta estabilidade ao longo do período de estudo no parâmetro LA, permite uma melhor comparação com os restantes tratamentos, do que o parâmetro CL, que sofre variação durante este período.

A análise estatística revelou diferenças significativas para os três tratamentos no mês de Outubro, e em Maio para RC1 e RC2, em ambas as variáveis. Em Junho, RC1 foi o único tratamento estatisticamente diferente, em relação ao comprimento dorsal (Fig.13; Tab.6).

**Tabela 6.** Resultados da ANOVA de uma via e *post-hoc* de Dunnett, para os parâmetros de crescimento dos neonatos de *Daphnia magna*, durante o período de estudo (**F**: valor-F, estatística da ANOVA; **P**: valor-p; **df1**: graus de liberdade intergrupos; **df2**: graus de liberdade intragrupos;  $\alpha = 0.05$ ).

Mês	Comprimento dorsal				<i>Post-hoc</i> Dunnett Tratamento: valor-P	Largura abdominal				<i>Post-hoc</i> Dunnett Tratamento: valor-P
	F	P	df1	df2		F	P	df1	df2	
Outubro	3.34	0.032	3	30	RC1: P = 0.036 RC2: P = 0.022 RC3: P = 0.042	3.73	0.022	3	30	RC1: P = 0.015 RC3: P = 0.018
Fevereiro	0.47	0.705	3	38		0.38	0.767	3	38	
Abril	2.85	0.050	3	37		2.16	0.110	3	37	
Maio	4.38	0.009	3	43	RC1: P = 0.006 RC2: P = 0.018	3.66	0.019	3	43	RC1: P = 0.013 RC2: P = 0.027
Junho	3.71	0.019	3	43	RC1: P = 0.012	1.57	0.211	3	43	RC1: P = 0.012
Julho	0.21	0.892	3	44		1.49	0.230	3	44	

Frequentemente, nos tratamentos (exceto no controlo) se encontraram exosqueletos pós-ecdisse contendo ovos abortados (Fig. 14A) ou indivíduos em estágios finais do desenvolvimento (Figs. 14B-D), com antenas secundárias ou espinhas apicais malformadas. Estas estruturas são essenciais para a sobrevivência dos organismos, pois estão associadas à locomoção e equilíbrio e interferem em diversas funções básicas, como a alimentação ou a fuga predatória.



**Figura 14.** A. Ovo abortado; B-D. Juvenis com malformações. Os círculos vermelhos assinalam os locais das malformações (antenas secundárias e espinha apical).

Os resultados obtidos nos parâmetros de sobrevivência e reprodutivos (Fig.11), nomeadamente no ensaio do mês de Abril, e as observações pontuais efetuadas em relação à presença de indivíduos com malformações (Fig.14), estão de acordo com o obtido por diversos autores, na exposição de *Daphnia magna* a diferentes substâncias tóxicas (Mu e LeBlanc, 2004; Navis *et al.*, 2013). Exposição a um xenobiótico pode afetar o desenvolvimento da população, ao reduzir a sobrevivência ou a fertilidade da mesma. Ao ser exposta a uma substância tóxica, a produção de descendência pode ser diminuída e/ou a idade na primeira reprodução pode ser aumentada, por duas principais razões: o organismo pode não ser capaz de obter os recursos energéticos necessários, ou pode ter necessidade de alocar energia para reparar a sua maquinaria metabólica, ao invés de a utilizar na reprodução (Gabsi *et al.*, 2014).

As medições obtidas dos neonatos também sugerem a exposição a substâncias tóxicas (Sosak-Swidarska, Tyrawska e Dzido, 1998; Reyes, Ramos-Jiliberto e González-Barriento, 2015), na presença de alimento elevado.

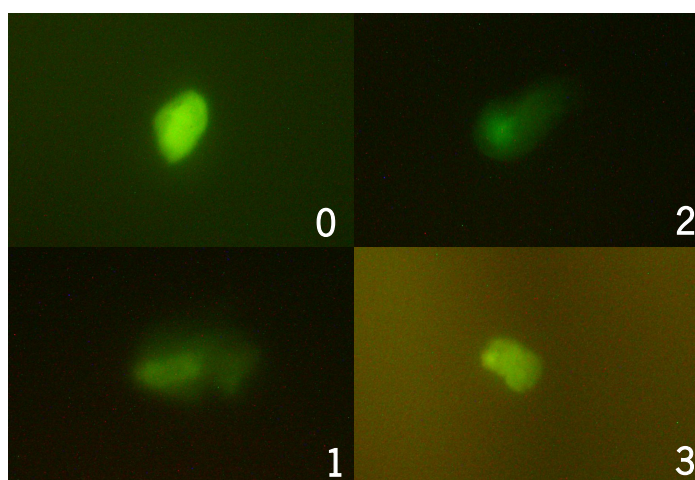
Em 2014, o relatório elaborado pelo CCJ, acusou a presença de algumas substâncias tóxicas para *Daphnia magna*, como os inseticidas deltametrina e paratião, em alguns pontos do rio do Braço e do rio Cubatão, muito embora em limites muito inferiores àqueles determinados pela Resolução CONAMA n.º 357/2005 (CCJ, 2014).

De qualquer forma, para constatar a influência destes compostos, ou análogos, nos resultados obtidos, é essencial a execução de análises químicas específicas, que comprovem a sua presença e permitam determinar a sua identidade.

### 5.5. Ensaio do cometa

A figura 15 exemplifica as classes observadas nos ensaios. A classe 4, de dano máximo, não foi observada em nenhuma situação.

O ensaio do cometa permitiu delinear um perfil de genotoxicidade dos pontos amostrados. Collins *et al.* (1997) já haviam concluído que cada classe obtida através de *visual scoring* corresponderia a aproximadamente 20% de DNA na cauda do cometa. É comum no controlo negativo encontrar cometas com % DNA na cauda a rondar os 10% (Collins *et al.*, 1997), que no atual sistema de classificação, corresponderá a aproximadamente 20 unidades arbitrárias, o que se confirmou neste estudo.



**Figura 15.** Exemplos das classes de cometas observadas. Cada número a branco representa a classe associada. Fonte: Joana Campos.

Embora teoricamente o controlo negativo deva ser livre de dano, na prática isto não se verifica, pois há sempre interferências provocadas no desenvolvimento do protocolo e a própria ação de enzimas sobre o DNA, como endonucleases, provoca um dano basal (Collins *et al.*, 1996).



As figuras 16 e 17 expõem as percentagens de cometas de cada classe, obtidos em cada um dos ensaios. Aqui, é possível observar a presença de, maioritariamente, cometas em classe 0 e 1 no controlo negativo, apresentando-se sempre a primeira em maioria. No caso dos meses de Junho e Julho, observou-se uma reduzida percentagem de cometas em classe 2 no controlo negativo. As amostras provenientes destes meses foram analisadas concomitantemente, utilizando o mesmo controlo negativo. Desta forma, é possível que devido à sazonalidade a que está sujeita a água de campo utilizada para produzir o meio de cultivo que dá origem ao controlo negativo, estejam presentes substâncias no lote utilizado, que produzam estes efeitos.

Foi possível constatar, também, que parece haver maior presença das classes de maior dano nos pontos do rio do Braço, havendo uma ligeira melhoria no rio Cubatão. No entanto, mesmo neste parece haver uma ação gradativa crescente de dano no sentido de RC1 para RC3.

Pela análise dos gráficos da figura 18 e dos resultados da ANOVA de uma via (Tab.7), é possível constatar que o controlo positivo utilizado foi suficientemente forte para acusar a presença de toxicidade, muito embora não se tenham obtido TCS tão elevadas como em outros estudos (Collins *et al.*, 1997; Azqueta *et al.*, 2011; Bright *et al.*, 2011).

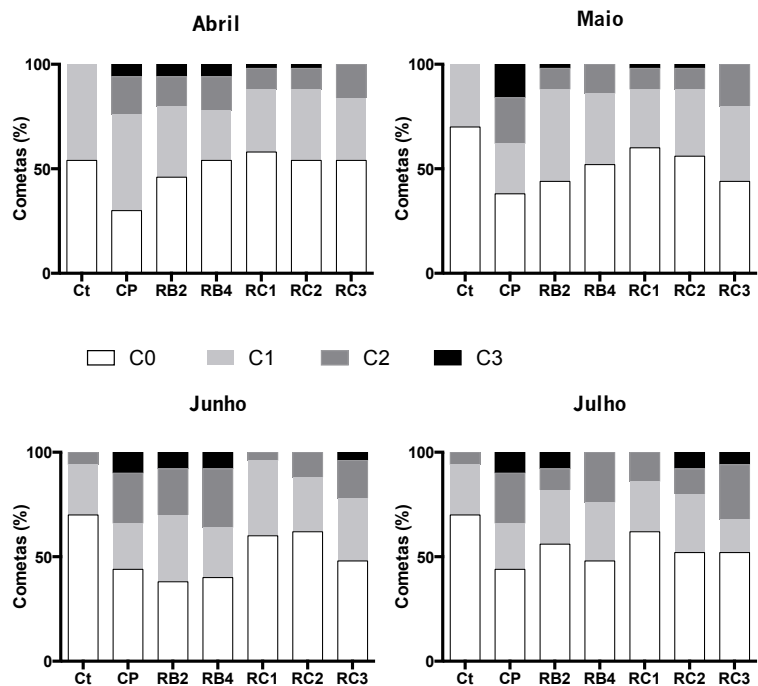


Figura 16. Percentagens de cometas em cada classe. Os gráficos representam as percentagens de cometas observados em cada classe de dano, obtidos nos ensaios do cometa consecutivos aos ensaios agudos. Ct – controlo negativo; CP – controlo positivo.

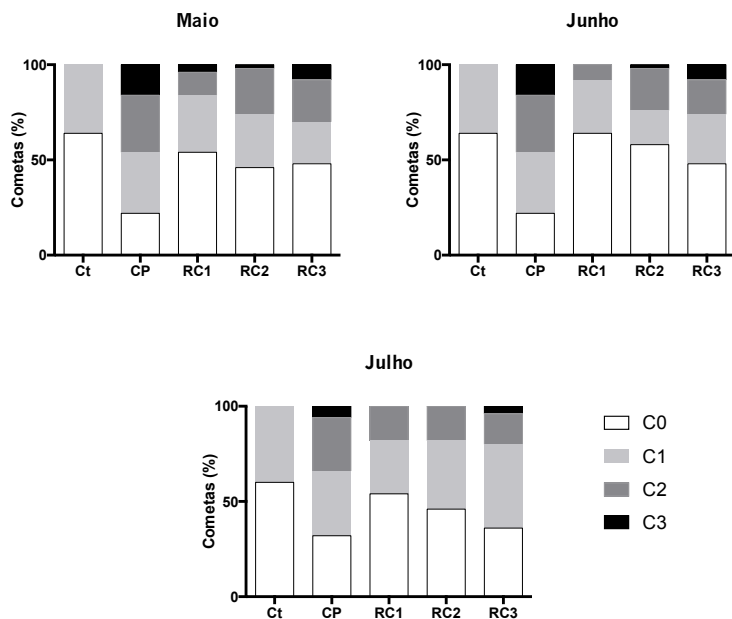
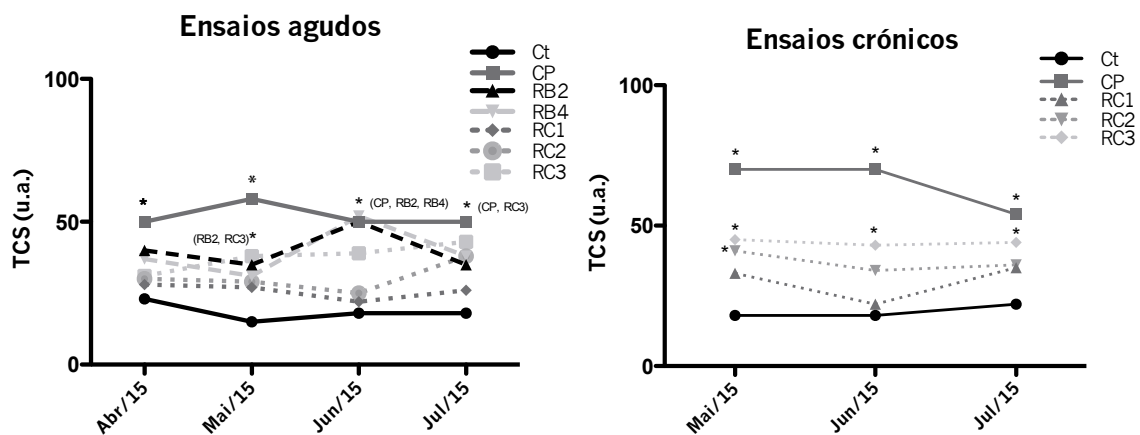


Figura 17. Percentagens de cometas em cada classe. Os gráficos representam as percentagens de cometas observados em cada classe de dano, obtidos nos ensaios do cometa consecutivos aos ensaios crónicos. Ct – controlo negativo; CP – controlo positivo.



**Figura 18.** Classificações totais dos cometas, obtidas em cada tratamento, em unidades arbitrárias. Ct – controlo negativo; CP – controlo positivo. Os tratamentos com diferenças significativas em relação ao controlo negativo, estão assinalados com \* (ANOVA de uma via,  $\alpha = 0.05$ ).

**Tabela 7.** Resultados da ANOVA de uma via e *post-hoc* de Dunnett, para os dados de classificação dos cometas obtidos nos ensaios do cometa consecutivos aos ensaios agudos e crónicos (F: valor-F, estatística da ANOVA; P: valor-p; df1: graus de liberdade intergrupos; df2: graus de liberdade intragrupos;  $\alpha = 0.05$ ).

Mês	Scores cometas				Post-hoc Dunnett Tratamento: valor-P
	F	P	df1	df2	
Abril Agudo	3.16	0.005	6	336	CP: P = 0.007
Maio Agudo	5.85	< 0.001	6	329	CP: P = 0.001 RB2: P = 0.047 RC3: P = 0.015
Junho Agudo	6.00	< 0.001	6	343	CP: P = 0.001 RB2: P = 0.001 RB4: P < 0.001
Julho Agudo	2.94	0.008	6	329	CP: P = 0.002 RC3: P = 0.023
Maio Crónico	9.62	< 0.001	4	245	CP: P < 0.001 RC2: P = 0.03 RC3: P = 0.008
Junho Crónico	12.48	< 0.001	4	245	CP: P = 0.009
Julho Crónico	4.47	0.002	4	245	CP: P < 0.001 RC3: P = 0.021

Geralmente, um aumento entre duas e três vezes da intensidade do dano, em relação ao grupo controlo (Fig.18), pode ser classificado como um resultado biologicamente significativo (Bright *et al.*, 2011), que aliado à análise estatística (Tab.7), sugere que hajam evidências para afirmar a presença de substâncias com efeito genotóxico, ainda que moderado, em todos os pontos amostrados, à exceção do ponto RC1 (no entanto, este deve ser mantido sob vigilância, devido às elevadas TCS obtidas nos ensaios crónicos de Maio e Julho, superiores às do controlo negativo).

Os resultados obtidos no ensaio do cometa sugerem a presença de substâncias com potencial mutagénico. No entanto, este ensaio, tal como os ensaios agudo e crónico, não é capaz de identificar que tipo de substância se encontra aqui presente. E, neste aspeto, a análise química torna-se essencial.

As variações protocolares no desenvolvimento do ensaio do cometa, normalmente associadas à duração da lise, desenrolamento do DNA e/ou corrida eletroforética, têm demonstrado resultar em maiores percentagens de DNA na cauda dos cometas (Collins *et al.*, 2014). Portanto, urge que se desenvolvam protocolos universais, que permitam a comparação inter-laboratorial, reduzindo este tipo de variações e o erro associado.

## 5.6. Aplicação da Diretiva-Quadro da Água no Brasil

Apesar de a Resolução CONAMA n.º 357/2005 aconselhar a aplicação de testes ecotoxicológicos para a determinação da qualidade das águas, o seu foco é a manutenção da qualidade mínima da água, para que possa ser viável para o seu uso previsto por lei – a avaliação da qualidade é realizada no sentido da exploração do recurso.

A DQA, pelo contrário, exige que qualquer massa de água atinja um bom estado ecológico, onde haja impacte antrópico mínimo e não é permissiva à regressão desta categoria. Aborda a água do ponto de vista ecossistémico e não de acordo com os usos que dela possam provir para o ser humano. A DQA permite uma gestão flexível dos recursos hídricos, tendo em conta as variações qualitativas entre os corpos de água, em função do seu enquadramento hidrogeomorfológico (Cardoso-Silva, Ferreira e Pompêo, 2013). Todavia, a análise das comunidades é a metodologia aconselhada, que é essencial para a compreensão dos efeitos dos poluentes nos ecossistemas, mas não permite compreender os mecanismos

de intoxicação dos mesmos, nas espécies individuais. Estes mecanismos são conhecidos através da aplicação dos ensaios ecotoxicológicos, que não correspondem à análise por meio da DQA, mas são exigidos pela Resolução CONAMA n.º 357/2005 (Martinez-Haro *et al.*, 2015). Portanto, seria interessante a aplicação da DQA ao sistema brasileiro, sem negligenciar o que de útil traz a Resolução CONAMA n.º 357/2005: os ensaios ecotoxicológicos. Porque a análise das comunidades é útil para confirmar se o ecossistema se encontra saudável. No entanto, quando isto não se verifica, o essencial passo seguinte deveria corresponder à aplicação de testes ecotoxicológicos, seguidos da análise química, para compreender o *como* e o *porquê* dessa situação.

No entanto, o acesso ao saneamento básico é uma premissa básica para que a DQA possa ser aplicada no Brasil e este facto não se verifica. Em 2008, o IBGE concluiu que 44.8% dos municípios brasileiros, nomeadamente no Norte e Nordeste do país, não possuíam acesso à rede coletora de esgotos (Cardoso-Silva, Ferreira e Pompêo, 2013), essencialmente devido à deficiente política pública, questões financeiras e ausência de instrumentos reguladores. Em consequência, têm sido detetadas elevadas concentrações de nutrientes e de contaminantes nos ecossistemas aquáticos sul-americanos e a intervenção das entidades competentes na identificação destas substâncias e tratamento dos locais afetados, tem-se mostrado aquém do necessário (López-Duval *et al.*, 2015).

A aplicação da DQA no Brasil é uma mudança imensamente profunda que requer uma revisão das relações de poder. Requer que os órgãos governativos brasileiros vejam a água como um bem comum que deve ser valorizado e preservado, colocando sempre em primeiro lugar a saúde, a segurança, e o bem-estar da população. Exige também, que se uniformize o desempenho das equipas de monitorização, de estado para estado, de forma a permitir comparações ao longo do país e, acima de tudo, a cooperação interestadual na partilha de informação. A gestão efetiva dos recursos hídricos implica uma integração e um constante diálogo entre órgãos governativos e pesquisadores da área, por forma a fomentar uma tomada de decisão consciente, no melhor interesse de todos.

A disponibilização de informação sobre a qualidade da água é de importância extrema para que se conheça a extensão da acção antrópica nas massas de água, com o intuito de se melhorar a tomada de decisão e permitindo a correcção da mesma.

A abordagem comunitária parece interessante na perspectiva de análise da qualidade ecológica, mas a compreensão dos mecanismos que produzem tal cenário, podem e devem ser avaliados por ensaios ecotoxicológicos que permitam estabelecer relações de causa-efeito (Martinez-Haro *et al.*, 2015).

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu extrair algumas conclusões, que se apresentam abaixo.

Quanto ao **IQA**, este mede principalmente a influência de despejos domésticos na qualidade da água, pelo que não pode ser considerado uma medida sensível para a monitorização da qualidade da água. Ele pode, porém, servir como um preliminar ou um ponto de partida, um elemento que permita criar uma percepção do estado do curso de água.

Quanto à **avaliação aguda**, esta é sensível em expor a qualidade de amostras que coloquem em risco a sobrevivência dos organismos, mas não fornece mais informação para além deste parâmetro, nem permite compreender o que pode surgir quando a morte não se concretiza e o papel ecológico do organismo é degradado.

A Resolução CONAMA n.º 357/2005 dita que nos cursos de água doce, com classificação 1 ou 2 não podem ser observados efeitos tóxicos crónicos. No entanto, para os de classe 3, podem observar-se efeitos tóxicos crónicos, mas não agudos. A **avaliação crónica** permitiu verificar que os pontos RC1 e RC2 não se harmonizam com o enquadramento pela legislação brasileira em vigor, uma vez que se detetaram efeitos crónicos em todos os *endpoints* medidos.

Quanto à **alometria das medidas** obtidas dos juvenis, o estudo permitiu concluir que existe uma forte relação entre ambas as medidas, podendo tornar-se útil na monitorização ambiental. Aqui, permitiu reiterar aquilo que já fora sugerido por outros *endpoints*, que é suscetível à qualidade do meio. No entanto, a relação entre as duas medidas necessita de ser investigada com maior profundidade, em cenários alternativos.

Quanto ao **ensaio do cometa**, este revelou ser uma ferramenta útil e altamente sensível na biomonitorização.

A realização demorada tornam-no menos apelativo, mas o seu baixo custo e resultado direto, tornam-no interessante para aplicação na monitorização da qualidade da água da bacia hidrográfica do rio Cubatão, e de outras bacias hidrográficas e a sua aplicação como método de biomonitorização, deveria ser considerado em futuras monitorizações.

No que respeita ao **organismo-teste** utilizado, *Daphnia magna* é um crustáceo que geralmente habita ambientes lênticos. A utilização de *Daphnia magna* em testes ecotoxicológicos é compreensível, pois é uma espécie bem caracterizada, é utilizada por diversos laboratórios globalmente e é muito sensível à presença de substâncias poluentes. Seria interessante, no entanto, avaliar a viabilidade da utilização desta espécie em testes ecotoxicológicos, face a espécies autóctones do ecossistema em estudo.

Num teste toxicológico, o controlo é essencial para se poder debater os dados e chegar a conclusões precisas e exatas. Portanto, seria interessante em estudos futuros, investigar a produtividade dos meio natural e artificial e o seu peso nas leituras dos dados. Da mesma forma, seria importante examinar a composição e a influência da ração administrada ao meio de cultivo, uma vez que possui substâncias, como a etoxiquina, utilizada como um conservante nas rações de animais domésticos, impedindo a peroxidação lipídica e que é reconhecidamente carcinogénica, mutagénica e teratogénica, sendo o seu uso proibido na Europa e na Austrália. O seu efeito em *Daphnia magna* ainda carece de estudo. No entanto, já foi provado ser tóxica para peixes (Lundbebye *et al.*, 2010).

A questão da observação de malformações nos juvenis abortados é preocupante, principalmente por se ter observado também no ponto RC1. Tal como foi observado, o aborto em *Daphnia magna* pode ocorrer por efeito da presença de substâncias nocivas no meio. Seria interessante aplicar este parâmetro à monitorização com *D. magna*.

Em nota de recomendação, seria importante prosseguir com a aplicação dos testes ecotoxicológicos à BHRC, acompanhados de análises químicas para algumas substâncias de interesse, como metais e agrotóxicos, de forma a tornar possível a identificação das substâncias presentes, na eventual presença de toxicidade nos ensaios agudos ou crónicos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (2009). *NBR 12.713: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com Daphnia spp. (Cladocera, Crustacea)*. Rio de Janeiro, 23pp.
- Alves, M. H., Bernardo, J. M., Figueiredo, H. D., Martins, J. P., Pádua, J., Pinto, P., Rafael, M. T. (2004). Directiva-quadro da água: tipologias de rios segundo o sistema. In *Actas del III Congreso Ibérico sobre Gestión y Planificación del Agua*. Sevilha, 347–354.
- ANA - Agência Nacional de Águas (2011). *Cuidando das Águas: Soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos*. Brasília: ANA, 154pp.
- Aragão, M. A., Araújo, R. P. A. (2014). Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos in Zagatto, P. A., Bertoletti, E. (orgs.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações (2ª Ed.)*. São Carlos: RiMa, 117-152.
- Araújo, R. P. de A., Buratini, S. V. (2005). Manutenção, cultivo e realização de testes de toxicidade com *Daphnia* in CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (org.) *Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos Vol. I*. Cursos e Treinamentos. São Paulo, 51-78.
- Artal, M. C., De-Almeida, G., Caloto-Oliveira, A., Santos, M. A. P. F., Umbuzeiro, G. A., Conegliana, C. M. R. (2013). Toxicity assessment of an effluent derived from an inactivated uranium mine: the Poços de Caldas (Brazil) example. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 8(1), 35–40.
- Baatrup-Pedersen, A., Larsen, S. E., Riis, T. (2013). From expert judgement to supervised classification : A new approach to assess ecological status in lowland streams. *Science of the Total Environment*, 447: 116–122.
- Baird, D. J., Soares, A. M. V. M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M. C., Calow, P. (1989). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems

- and prospects in Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (orgs.) *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. 17-19 Outubro, Lyngby: 144-148.
- Barros, P. A. G. de. (2001). Efeitos Tóxicos de Cianobactérias em Cladóceros. *Tese de doutoramento em Biologia*. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 131pp.
- Beaton, M. J., Peters, C. M. (2014). A Cytological Perspective. *Physiology of the Cladocera*. London: Academic Press, 199-218.
- Becker, D., Van Damme, K., Turner, E., Shaw, J. R., Colbourne, J. K., Pfrender, M. E. (2014). The Genomics of Cladoceran Physiology. *Physiology of the Cladocera*. London: Academic Press, 235–258.
- Begon, M., Townsend, C. R., Harper, J. L. (2006). *Ecology: from individuals to ecosystems*. 4th Ed. New York: Wiley-Blackwell, 720pp.
- Benzie, J. A. H. (2005). CLADOCERA: The Genus *Daphnia* (including *Daphniopsis*) in Dumont, H. J. F. (org.) *Guides to the identification of the macroinvertebrates of the continental waters of the world*. Leiden: Backhuys Publishers, The Netherlands, 376pp.
- Boersma, M. (1997). Offspring size and parental fitness in *Daphnia magna*. *Evolutionary Ecology*. 11: 439-450.
- Bradley, M. C, Naylor, C., Calow, P., Baird, D. J., Soares A. M. V. M. (1993). Reducing variability in *Daphnia* toxicity tests - A case for further standardization in Soares, A. M. V. M., Calow, P. (orgs.). *Progress in Standardization of Aquatic Toxicity Tests*. Lewis Publishers, Boca Raton: 57-70.
- Brentano, D. M. (2006). Desenvolvimento e aplicação de testes de toxicidade crónica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. *Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 145pp.

- Bright, J., Aylott, M., Bate, S., Geys, H., Jarvis, P., Saul, J. and Vonk, R. (2011). Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay. *Pharmaceutical statistics*. 10(6): 485-493.
- Buschini, A., Martino, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Rizzoni, M. (2004). Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(2), 119–129.
- Cardoso-Silva, S., Ferreira, T., Pompêo, M. L. M. (2013). Directiva-Quadro D'Água: Uma revisão crítica e a possibilidade de aplicação ao Brasil. *Ambiente & Sociedade*. 16(1): 39-58.
- CCJ - Comitê de Gerenciamento das Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira (2014). Relatório final da consultoria técnica individual no acompanhamento e auxílio das atividades do Comitê de Gerenciamento das Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira. Joinville: UNIVILLE.
- CCJ - Comitê de Gerenciamento das Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira (2015). Relatório final da consultoria técnica individual no acompanhamento e auxílio das atividades do Comitê de Gerenciamento das Bacias Hidrográficas dos Rios Cubatão e Cachoeira. Joinville: UNIVILLE.
- Collins, A. R., Dusinská, M., Gedik, C. M., Stětina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?. *Environmental Health Perspectives*, 104(3): 465.
- Collins, A. R., Dušinská, M., Franklin, M., Somorovská, M., Petrovská, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Rašlová, K., Vaughan, N., (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 30(2): 139-146.
- Collins, A. R., (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26: 249-261.

- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Štětina, R. (2008). The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143–151.
- Collins, A. R., El Yamani, N., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., Azqueta, A. (2014). Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in genetics*, 5.
- CPDS - Comissão de Políticas de Desenvolvimento Sustentável e da Agenda 21 Nacional (2002). Agenda 21 brasileira: acções prioritárias. Brasília, DF: MMA: PNUD, 142pp.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). *Resolução CONAMA n.º 357/2005*. Brasília, DF: MMA, 27pp.
- Costa, L.G., (1988). Organophosphorus Compounds *in* Galli, C. L., Manzo, L., Spencer, P. S.(orgs.). Recent Advances in Nervous System Toxicology, New York: Plenum Press.
- Covich, A. P., Thorp, J. H., Rogers, D. C. (2010). Introduction to the Subphylum Crustacea. *in* Thorp, J. H., Covich, A. P. (orgs.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (3ª Ed.). Academic Press, 695-724.
- Cunha, L. V. da (2002). Perspectivas da Gestão da Água para o Século XXI: Desafios e Oportunidades. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 7(4): 65–73.
- Cunha, D. G. F., Calijuri, M. C., Lamparelli, M. C., Menegon Jr., N. (2013). Resolução CONAMA 357 / 2005 : análise espacial e temporal de não conformidades em rios e reservatórios do estado de São Paulo de acordo com seus enquadramentos (2005 – 2009). *Eng. Sanit. Ambient.*, 18(2): 159–168.
- David, R. M., Dakic, V., Williams, T. D., Winter, M. J., Chipman, J. K. (2011). Transcriptional responses in neonate and adult *Daphnia magna* in relation to relative susceptibility to genotoxicants. *Aquatic Toxicology*, 104(3-4), 192–204.
- De Meester, L. (1991). An analysis of the phototactic behaviour of *Daphnia magna* clones and their sexual descendants. *Hydrobiologia*, 225: 217-227.

- Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S. (2011). Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology*, 101(2), 405–411.
- Dodson, S. L., Cáceres, C. E., Rogers, D. C. (2010). Cladocera and other branchiopods in Thorp, J. H., Covich, A. P. (orgs.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates* (3<sup>a</sup> Ed.). Academic Press, 774-828.
- Domingues, D. F., Bertoletti, E. (2014). Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos in Zagatto, P. A., Bertoletti, E. (orgs.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações* (2<sup>a</sup> Ed.). São Carlos: RiMa, 153-184.
- Ebert, D. (2005). Introduction to *Daphnia* Biology in *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda: National Library of Medicine.
- Elendt, B. P., Bias, W. R. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24(9): 1157–1167.
- Enserink, L., Luttmmer, W., Maas-Diepeveen, H. (1990). Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. *Aquatic Toxicology*, 17, 15-26.
- Finotti, A. R., Finkler, R., Silva, M. D., Cemin, G., (2009). *Monitoramento de Recursos Hídricos em Áreas Urbanas*. Caxias do Sul: Educs, 272pp.
- García, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., Piloto, J., Gonzalez, J. E., Alvarez, A. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1): 25-34.
- Ghiselli, G., Jardim, W. F. (2007). Interferentes Endócrinos no Ambiente. *Quím. Nova*, 30(3): 695–706.

- Gonçalves, M. L., Zanotelli, C. T., Oliveira, F. A. (2006). *Diagnóstico e prognóstico das disponibilidades e demandas hídricas do Rio Cubatão do Norte*. Joinville: UNIVILLE. 92pp.
- Guilhermino, L., Lopes, M. C., Carvalho, A. P., Soares, A. M. V. M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 32(4): 727–738.
- Guilhermino, L., Diamantino, T. C., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Soares, A. M. V. M. (1997). Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 38: 292-295.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., Thurston, R. V. (1977). Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol*, 11(7), 714–719.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015). Produto Interno Bruto dos Municípios 2013. Rio de Janeiro. 200pp.
- Ieromina, O., Peijnenburg, W.J.G.M., de Snoo, G.R. and Vijver, M.G. (2014). Population responses of *Daphnia magna*, *Chydorus sphaericus* and *Asellus aquaticus* in pesticide contaminated ditches around bulb fields. *Environmental Pollution*, 192: 196-203.
- INCQS/FIOCRUZ - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (2007). Ensaio Cometa *in* Manual da Qualidade. Brasil.
- ISO - International Organization for Standardization (2012). ISO 6341: Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea): Acute toxicity test. pp.
- Jones, J. C., Reynolds, J. D., Raffaelli, D. (2006). Environmental Variables *in* Sutherland, W. J. (orgs.). *Ecological Census Techniques*. Cambridge: Cambridge University Press, 370-407.

- Jordão, R., Casas, J., Fabrias, G., Campos, B., Piña, B., Lemos, M. F. L., Soares A. M. V. M., Tauler, R., Barata, C., (2015). Obesogens beyond Vertebrates: Lipid Perturbation by Tributyltin in the Crustacean *Daphnia magna*. *Environmental health perspectives*.
- Knie, J. L. W., Lopes, E. W. B. (2004). Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 289pp.
- Kobayashi, M., Takahashi, Y. (1994). In vivo oxygenation of hemoglobin in early embryos of *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107 A(l): 127-131.
- Kummerer, K. (2011). Emerging contaminants versus Micro-pollutants. *Clean- Soil, Air, Water*, 39(10): 889-890.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O. (2011). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution*. 159: 1682-1691.
- López-Duval, J. C., Meirelles, S. T., Cardoso-Silva, S., Moschini-Carlos, V., Pompêo, M. (2015). Ecological and toxicological responses in a multistressor scenario: Are monitoring programs showing the stressors or just showing stress? A case study in Brazil. *Science of The Total Environment*, 540: 466-476.
- Lovell, D. P., Omori, T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), pp.171-182.
- Lundbebye, A. K., Hove, H., Mage, A., Bohne, V. J., Hamre, K. (2010). Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 27(12): 1652-1657.
- Machado, C. K., Pinto, L. H., Ciampo, L. F. D., Lorenzi, L, Correia, C. H. G., Hader, D. P., Erzinger, G. S. (2014). Potential environmental toxicity from hemodialysis effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 102: 42-47.

- Magalhães, D. de P., Ferrão Filho, A. Da S. (2008). A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. *Oecol. Bras.*, 12(3): 355-381.
- Maia, B. G. de O., Klostermann, D., Ribeiro, J. M. G., Simm, M., Oliveira, T. M. N. de, Barros, V. G. (2013). *Bacias Hidrográficas da Região de Joinville*. Joinville: Zirkua Estúdio, 60pp.
- Martinez-Haro, M., Beiras, R., Bellas, J., Capela, R., Coelho, J.P., Lopes, I., Moreira-Santos, M., Reis-Henriques, A.M., Ribeiro, R., Santos, M.M. and Marques, J.C. (2015). A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecological Indicators*, 48: 8-16.
- McCallum, H. (2000). Chapter 5: Rate of increase of a population. *Population parameters: estimation for ecological models*. 1st Edt. Brisbane: Blackwell Science, Ltd., 139-156.
- Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L. L., Boyce, M. S., (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs Bootstrap techniques. *Ecology*, (67): 1156-1166.
- Møller, P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96(1): 1-42.
- Møller, P. and Loft, S. (2014). Statistical analysis of comet assay results. *Frontiers in genetics*, 5.
- Mu, X., Leblanc, G. A. (2004). Cross communication between signaling pathways: juvenoid hormones modulate ecdysteroid activity in a crustacean. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(10): 793-801.
- Navis, S., Waterkeyn, A., Voet, T., De Meester, L., Brendonck, L. (2013). Pesticide exposure impacts not only hatching of dormant eggs, but also hatchling survival and performance in the water flea *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, (22): 805-814.
- OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (2012). *Daphnia magna* Reproduction Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, 211: 1–21.



- Oliveira, T. M. N. de, Medeiros, S. H. W., Magna, D. J., Bittelbrunn, D. (2009). Caracterização da Qualidade da Água *in* Oliveira, T. M. N. de, Ribeiro, J. M. G., Magna, D. J. (orgs.) Diagnóstico Ambiental do Rio do Braço. Joinville: UNIVILLE, 5: 87-106.
- Palma, P., Ledo, L., Alvarenga, P. (2015). Assessment of trace element pollution and its environmental risk to freshwater sediments influenced by anthropogenic contributions: the case study of Alqueva reservoir (Guadiana Basin). *Catena* 128: 174–184.
- Palma, P., Ledo, L. and Alvarenga, P. (2016). Ecotoxicological endpoints, are they useful tools to support ecological status assessment in strongly modified water bodies? *Science of The Total Environment*, 541: 119-129.
- Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P., Rossi, C., (2006). A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquat. Toxicol.* 77, 1–10.
- Pellegrini, V., Gorbi, G., Buschini, A. (2014). Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*, 155: 261-268.
- Pereira, J. L., Marques, C. R., Gonçalves, F. (2004). Allometric relations for *Ceriodaphnia* spp. and *Daphnia* spp. *Ann. Limnol.- Int. J. Limnology*. 40(1): 11-14.
- Pereira, M. E. (2005). Compartilhando a Gestão dos Recursos Hídricos: Joinville e o Rio Cubatão. Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental – Procam. Universidade de São Paulo, São Paulo, 142pp.
- Reyes, C. A., Ramos-Jiliberto, R., Gonzalez-Barrientos, J. (2015). Temporal variability of food determines the outcome of pesticide exposure in *Daphnia*. *Ecological Research*, 30(3): 451-460.
- Santos, M. A. P. F. dos. (2008). Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos. *Tese de doutoramento em Ciências*. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 186pp.

- Schettini, C. A. F., Carvalho, J. L. B. (1999). Caracterização Hidrodinâmica do Estuário do Rio Cubatão, Joinville. *Notas Téc. FACIMAR*, 87-97.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175: 184–191.
- Singh, N. P, Tice, R. R., Stephens, R. E., Schneider, E. L. (1991). A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.* 252(3): 289-296.
- Śosak-Swidarska, B., Tyrawska, D., Dzido, D. (1998). *Daphnia magna* ecotoxicity test with parathion. *Chemosphere*, 37(14): 2989-3000.
- Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O., Singh, N. P. (1991). The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *In: Witmer, C. R., Snyder, R. R., Jollow, D. J., Kalf, G. F., Kocsis, J. J., Sipes, I. G., (Eds). Biological reactive intermediates IV. Molecular and cellular effects and their impact on human health.* New York: Plenum Press. 157–164.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3): 206-221.
- Tundisi, J. G., Matsumura-Tundisi, T. (2011). Recursos hídricos no século XXI. São Paulo: Oficina de Textos, 328pp.
- Umbuzeiro, G. de A., Roubicek, D. A. (2014). Genotoxicidade Ambiental *in* Zagatto, P. A., Bertoletti, E. (orgs.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.* São Carlos: RiMa (2ª Ed.), 327-346.
- Zagatto, P. A. (2014). *Ecotoxicologia* *in* Zagatto, P. A., Bertoletti, E. (orgs.). *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.* São Carlos: RiMa (2ª Ed.), 1-13.

Zanotelli, C. T., Homrich, A. P. M., Oliveira, F. A. (2009). *Conhecendo a bacia hidrográfica do Rio Cubatão do Norte*. Joinville: UNIVILLE, 50pp.

Zenkner, F. F., Athanásio, C. G., Ellwanger, J. H., Prá, D., Rieger, A., Acayaga, E. A. L. (2012). Análise genotóxica de efluente de lavanderia hospitalar: ensaio cometa com *Daphnia magna* Straus, 1820. *Revista Jovens Pesquisadores*. 1: 29-36.

## 8. ANEXOS

### Anexo A – Parâmetros físico-químicos

		pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	Condutividade (µS.cm <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	DBO <sub>5</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Fósforo total (mg.L <sup>-1</sup> )	Azoto amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	Azoto total (mg.L <sup>-1</sup> )	Coliformes termotolerantes (NMP.100 mL <sup>-1</sup> )
RB2	Out/14	7,23	6,19	410	22,0	12,2	10,8*	1,92*	1,2	13,7	1900
	Nov/14	7,23	1,50*	1119	22,1	28,2	19,2*	2,15*	9,0	16,4	1900
	Dez/14	7,12	1,48*	543	24,7	4,3	4,3	4,44*	1,5	12	1900
	Jan/15	8,04	0,40*	803	26,1	10,7	63,6*	0,49*	12,0*	12,3	4400*
	Fev/15	7,26	6,21	189	24,4	118,0*	33,5*	0,87*	2,9	3,8	2700*
	Mar/15	7,34	5,13	378	22,3	11,3	19,0*	1,15*	11,0	11	4400*
	Abr/15	6,98	2,02*	223	22,4	19,8	7,9	2,30*	1,7	5,7	2700*
	Mai/15	7,50	4,47	710	18,8	14,2	6,2	4,15*	23,2*	25,1	760
	Jun/15	7,12	4,40	305	19,4	12,3	24,5*	0,55*	5,8	10	460
	Jul/15	7,20	4,14	477	19,4	51,4	8,8	0,58*	2,2	8,2	2700*
RB4	Out/14	7,00	5,70	266	23,0	13,9	4,4	2,93*	1,80	6,4	4400*
	Nov/14	7,01	2,24*	244	23,1	30,1	4,7	1,67*	1,84	4,7	7600*
	Dez/14	7,00	1,30*	303	25,9	9,8	3,4	4,19*	2,07	4,1	1900
	Jan/15	7,17	3,22*	286	27,0	9,2	12,8*	0,32*	2,62	4,8	2700*
	Fev/15	6,48	5,72	113	24,2	130,0*	21,1*	1,80*	0,66	2,9	2700*
	Mar/15	7,03	0,31*	155	22,2	20,2	5,7	1,80*	1,24	4,9	4400*
	Abr/15	6,79	2,46*	324	22,8	18,1	7,0	0,36*	1,61	4,6	4400*
	Mai/15	6,77	3,90*	223	19,3	12,3	3,5	4,08*	5,50	6,5	4400*
	Jun/15	6,71	3,82*	201	18,7	10,3	2,4	0,38*	1,36	3,9	1900
	Jul/15	7,02	3,34*	354	19,7	47,0	42,0*	0,51*	2,17	5,3	76000*
RC1	Out/14	8,14	9,80	40	22,1	2,4	3,3*	2,42*	<0,55	0,9	290*
	Nov/14	8,08	7,78	46	21,4	3,3	2,5	0,05	<0,55	1,7	290*
	Dez/14	7,61	5,75*	48	24,3	1,6	2,4	1,92*	<0,55	<0,6	0
	Jan/15	7,45	6,26	37	21,1	4,2	8,8*	0,20*	<0,55	1,5	290*
	Fev/15	7,05	6,00	45	23,8	2,3	13*	1,00*	<0,55	1,2	36
	Mar/15	7,20	10,46	43	20,4	3,6	4,4*	1,89*	<0,55	2,5	1900*
	Abr/15	7,13	5,06*	45	21,4	1,9	2,9	1,52*	<0,55	1,9	150
	Mai/15	7,23	7,16	41	18,2	2,3	<1,7	0,49*	<0,55	<0,6	0
	Jun/15	6,95	6,64	42	17,5	1,9	32,7*	0,21*	<0,55	1	95
	Jul/15	7,40	6,98	43	19,0	9,7	22,5*	2,83*	<0,55	<0,6	2700*
RC2	Out/14	7,07	8,73	34	21,7	3,4	2,8	2,77*	<0,55	1,6	150
	Nov/14	7,06	5,10	51	23,1	6,1	2,8	3,45*	<0,55	<0,6	0
	Dez/14	6,80	3,77*	54	26,4	0,3	3,6	0,16*	<0,55	<0,6	290
	Jan/15	7,23	1,57*	453	28,1	6,9	3,0	0,58*	<0,55	28,7	290
	Fev/15	6,55	6,49	57	24,5	26,4	27,5*	2,38*	<0,55	1,7	1900
	Mar/15	6,83	8,21	43	21,2	3,5	5,0	0,87*	<0,55	2,5	460
	Abr/15	6,72	4,79*	53	22,0	2,9	<1,7	0,32*	<0,55	2	290
	Mai/15	7,01	6,22	49	18,4	2,3	<1,7	<0,03	<0,55	<0,6	0
	Jun/15	6,82	5,69	48	18,0	2,9	5,1*	0,28*	<0,55	1,2	36
	Jul/15	6,98	5,06	49	19,5	6,0	20,5*	0,33*	<0,55	<0,6	1900
RC3	Out/14	6,98	7,24	98	23,0	5,5	2,7	2,68*	<0,55	1,9	760
	Nov/14	6,94	4,22	97	23,9	13,4	<1,7	2,35*	<0,55	1,8	19000*
	Dez/14	6,82	2,75*	82	25,9	4,8	3,3	2,37*	<0,55	<0,6	1900
	Jan/15	6,92	3,58*	122	27,6	6,2	2,6	0,2*	0,81	3,1	760
	Fev/15	6,49	5,61	84	24,9	56,7	19,2*	2,11*	<0,55	1,9	460
	Mar/15	6,74	7,06	78	22,1	8,6	6,8*	1,73*	<0,55	1,9	2700*
	Abr/15	6,83	3,58*	109	22,7	8,5	2,1	0,91*	<0,55	2,2	2700*
	Mai/15	6,30	4,86	86	18,4	5,1	<1,7	2,24*	0,99	1,3	950
	Jun/15	6,71	6,06	84	18,3	5,3	33,2*	0,71*	<0,55	1,7	290
	Jul/15	7,12	4,44	186	19,6	20,1	2,7	0,17*	0,81	2,7	1900

\* Valores que ultrapassam o permitido pela Resolução CONAMA n.º 357/2005.

Fonte: CCJ, 2015.

Anexo B – Análise da potabilidade da água do meio de cultivo (Quiriri)

Parâmetro	Valor	Limite CONAMA
pH	7.4	6.0-9.0
Amónia	< 0.70 mg.L <sup>-1</sup>	-
Cor aparente	14.00 Pt	Limite detecção: 0.2 Pt
Dureza	8.0 mg.L <sup>-1</sup>	-
Sólidos totais dissolvidos	138.0 mg.L <sup>-1</sup>	500 mg.L <sup>-1</sup>
Sulfato	< 1.5 mg.L <sup>-1</sup>	250 mg.L <sup>-1</sup>
Turbidez	1 NTU	40 NTU
Bactérias heterotróficas	2100 UFC.mL <sup>-1</sup>	-
Coliformes totais	1.9 x 10 <sup>3</sup> NMP.100mL <sup>-1</sup>	-
<i>E. coli</i>	290 NMP.100mL <sup>-1</sup>	200 NMP.100mL <sup>-1</sup>
Alumínio	0.059 mg.L <sup>-1</sup>	0.1 mg.L <sup>-1</sup>
Cloreto	9.93 mg.L <sup>-1</sup>	250 mg.L <sup>-1</sup>
Ferro	0.066 mg.L <sup>-1</sup>	0.3 mg.L <sup>-1</sup>
Manganês	< 0.005 mg.L <sup>-1</sup>	0.1 mg.L <sup>-1</sup>
Sódio	2.027 mg.L <sup>-1</sup>	-
Zinco	< 0.005 mg.L <sup>-1</sup>	0.18 mg.L <sup>-1</sup>

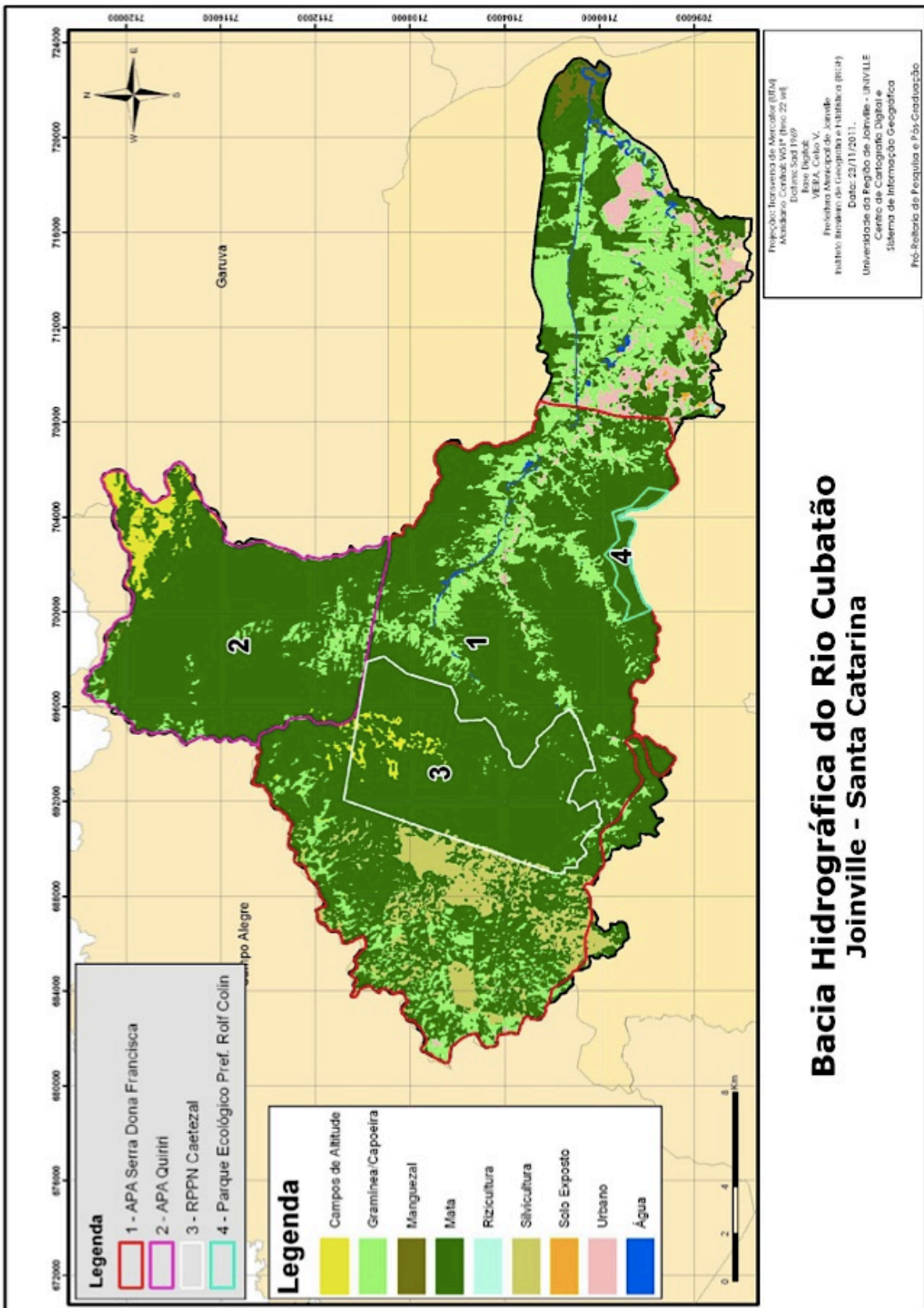
Fonte: CCJ, 2015.

## Anexo C – Soluções adicionadas ao meio de cultivo

Substância	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Volume de solução por litro de meio (mL)
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O)	73.5	3.2
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	123.3	0.8
Cloreto de potássio (KCl)	5.8	0.8
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	64.8	0.8

Fonte: ABNT, 2009.

Anexo D – Mapa do uso e ocupação do solo da BHRC



Fonte: Laboratório de cartografia digital da UNIVILLE, 2011.