

ANA LÚCIA FERMINO DE OLIVEIRA ARINE

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE SEDIMENTOS FORMULADOS PARA A
APLICAÇÃO EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS E QUÍMICOS:
ÊNFASE PARA OS INTERFERENTES ENDÓCRINOS
17 α -ETINILESTRADIOL E 17 β -ESTRADIOL**

Sorocaba
2015

ANA LÚCIA FERMINO DE OLIVEIRA ARINE

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE SEDIMENTOS FORMULADOS PARA
A APLICAÇÃO EM ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS E QUÍMICOS:
ÊNFASE PARA OS INTERFERENTES ENDÓCRINOS
17 α -ETINILESTRADIOL E 17 β -ESTRADIOL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientador: Profa. Dra. Renata Fracácio

Sorocaba
2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp - Campus Experimental de Sorocaba

Arine, Ana Lúcia Fermino de Oliveira.

Estudo da viabilidade de sedimentos formulados para a aplicação em estudos ecotoxicológicos e químicos: ênfase para os interferentes endócrinos 17alfa-etinilestradiol e 17beta-estradiol / Ana Lúcia Fermino de Oliveira Arine, 2015.

194 f. : il.

Orientador: Renata Fracácio

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista. Campus Experimental de Sorocaba, Sorocaba, 2015.

1. Toxicologia ambiental. 2. Hormônios. 3. Toxicidade - Testes. I. Universidade Estadual Paulista. Campus Experimental de Sorocaba. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Fracácio (Orientador)

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Campus de Sorocaba

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Campus de Sorocaba

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho

Departamento de Biologia

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

Campus de Sorocaba

Sorocaba, 30 de janeiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas
que lutam e lutaram pelo bem mais precioso:
pela vida, pela defesa da biodiversidade,
pelo presente e pelo futuro das gerações,
por ideais de uma vida saudável no Planeta
para todos os seres que aqui habitam.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", onde também concluí minha graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, representado pelo Prof. Dr. Leonardo Fraceto.

À Profa. Dra. Renata Fracácio pela orientação, amizade, simplicidade e pela busca incessante do conhecimento, servindo de exemplo na conduta acadêmica e na superação de obstáculos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa, possibilitando a aquisição dos materiais e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Ao Bruno pela imensurável paciência, compreensão, companheirismo, ajuda em diversas etapas desse trabalho e pelo amor incondicional.

Aos meus pais, Ruth e Júnior, cuja educação, amor e incentivo foram sempre a força propulsora para continuar seguindo em frente.

Ao meu irmão, Jorge, aos meus primos, cunhado, tios e amigos pelo incentivo e pelos importantes momentos de descontração.

Aos sogros Ude e Djair pela força, incentivo e pelos maravilhosos almoços de domingo.

À Tania Pizzolato e Alex (UFRGS) pelo auxílio na etapa da cromatografia.

Aos colegas da Pós: Claudia, Vivian, Leda, Merides, Parini, Juliana, Erik, Carol, pela amizade, trabalho em conjunto e pela convivência.

Às técnicas Sandra, Suzan e Letícia e ao técnico Rafael pelo apoio em diversos momentos durante a realização do trabalho em laboratório.

Muito obrigada!

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.” Charles Darwin

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 20 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 23 |
| 2.1 Atuação dos Interferentes Endócrinos nos Organismos | 23 |
| 2.2 Características dos Interferentes Endócrinos em Estudo..... | 26 |
| 2.3 Dinâmica dos IE nos Ambientes Aquáticos..... | 28 |
| 2.4 Dinâmica dos IE nos Sedimentos | 30 |
| 2.5 Ecotoxicologia aquática..... | 32 |
| 2.5.1 Atuação dos IE sobre os organismos-teste: estudos ecotoxicológicos.. | 34 |
| 2.6 Aplicação de sedimentos formulados em estudos ecotoxicológicos | 37 |
| 2.7 Características que influenciam na qualidade do sedimento formulado..... | 40 |
| 2.7.1 Matéria orgânica | 40 |
| 2.7.2 Constituintes inorgânicos e granulometria..... | 44 |
| 2.7.3 Pré tratamento para os componentes orgânicos e inorgânicos: remoção de possíveis interferentes toxicológicos..... | 46 |
| 2.7.4 Condicionamento e melhoramento dos sedimentos formulados | 47 |
| 2.8 Sedimentos formulados como controle para testes de toxicidade | 48 |
| 2.9 Sedimentos formulados e representatividade de ambientes naturais | 50 |
| 2.9.1 Recomendações para uso de sedimentos formulados | 53 |
| 3. OBJETIVO | 57 |
| 3.1 Objetivo geral | 57 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 57 |
| 4. METODOLOGIA | 59 |
| 4.1 Formulação de sedimentos para uso em testes ecotoxicológicos | 59 |
| 4.1.1 Análises físicas e químicas das formulações para uso em ensaios ecotoxicológicos | 59 |
| 4.1.2 Aplicação das formulações em testes de toxicidade com o organismo bentônico <i>Hyalella azteca</i> : análise de sobrevivência, crescimento e reprodução | |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.2 | Viabilidade química e ecotoxicológica de diferentes minerais de argilas esmectitas para a composição de sedimento formulado como alternativa ao mineral de argila caulinita | 64 |
| 4.3 | Análise de parâmetros físico-químicos de variedades de matéria orgânica e sedimento formulado utilizado para experimento toxicológico | 68 |
| 4.3.1 | Avaliação de diferentes tipos de matéria orgânica | 68 |
| 4.3.2 | Determinação de metais totais e biodisponíveis no sedimento formulado e na argila caulinita por meio de análise em ICP-OES | 69 |
| 4.3.3 | Determinação de teores de nitrogênio, fósforo total e carbono orgânico e total (TOC) em dois tipos de matéria orgânica (USEPA 600/R-99/064, 2000) ... | 70 |
| 4.4 | Estudo da viabilidade metodológica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> para testes de toxicidade crônica com sedimentos formulados: ênfase para a toxicidade da água intersticial contaminada com os IE através de bottom up e top down..... | 75 |
| 4.4.1 | Testes de toxicidade com água intersticial | 79 |
| 4.4.2 | Teste de toxicidade crônica com IE: sistema <i>top down</i> | 83 |
| 4.4.3 | Teste de toxicidade crônica com IE: sistema <i>bottom up</i> | 84 |
| 4.4.4 | Teste de verificação para comparação de matéria orgânica | 86 |
| 4.4.5 | Teste com todo o sedimento usando húmus | 87 |
| 4.5 | Análises cromatográficas: Tempo de degradação dos IE e capacidade de retenção ao sedimento formulado..... | 87 |
| 4.5.1 | Tempo de degradação dos IE..... | 88 |
| 4.5.2 | Capacidade de retenção dos IE ao sedimento formulado | 89 |
| 4.5.3 | Preparo da amostra: SPE e Reação de derivatização (Método Dallegrave, 2012) | 90 |
| 4.5.4 | Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas..... | 95 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 96 |
| 5.1 | Formulação de sedimentos representativos do Estado de São Paulo para uso em testes ecotoxicológicos | 96 |
| 5.1.1 | Formulações: análises dos parâmetros químicos da água..... | 96 |
| 5.1.2 | Ensaio de sobrevivência, crescimento e reprodução com <i>Hyalella azteca</i> em sedimentos formulados | 103 |
| 5.2 | Análise de diferentes minerais de argilas esmectitas para a composição de sedimento formulado como alternativa ao uso da caulinita..... | 105 |
| 5.2.1 | Análise dos parâmetros oxigênio dissolvido e pH | 105 |
| 5.2.2 | Quantificação de metais | 107 |
| 5.3 | Parâmetros físico-químicos de diferentes tipos de matéria orgânica e sedimento formulado utilizado para experimento toxicológico | 110 |
| 5.3.1 | Avaliação do aspecto de diferentes tipos de matéria orgânica..... | 110 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 5.3.2 | Quantificação de metais totais e biodisponíveis do sedimento formulado e da argila caulinita..... | 111 |
| 5.3.3 | Análise de nitrogênio, fósforo total e carbono orgânico e total (TOC) das soluções com ração de peixe e húmus (USEPA 600/R-99/064, 2000)..... | 114 |
| 5.4 | Ensaio de toxicidade crônica com <i>Ceriodaphnia dubia</i> utilizando água intersticial de sedimento formulado..... | 117 |
| 5.4.1 | Ensaio com água intersticial | 117 |
| 5.4.2 | Ensaio de toxicidade com IE: sistema <i>top down</i> | 124 |
| 5.4.3 | Ensaio de toxicidade com IE: sistema <i>bottom up</i> | 126 |
| 5.4.4 | Teste de verificação para comparação de matéria orgânica | 129 |
| 5.4.5 | Teste com todo o sedimento e húmus..... | 131 |
| 5.4.6 | Análise estatística..... | 132 |
| 5.5 | Determinação do tempo de degradação e capacidade de retenção dos IE ao sedimento formulado por cromatografia gasosa | 137 |
| 5.5.1 | Tempo de degradação dos IE..... | 138 |
| 5.5.2 | Capacidade de retenção dos IE ao sedimento formulado | 141 |
| 6. | CONCLUSÃO | 145 |
| 7. | RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 147 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 148 |
| Apêndice A | | 164 |
| Apêndice B | | 168 |
| Apêndice C | | 171 |
| Apêndice D | | 174 |
| Apêndice E | | 177 |
| Apêndice F | | 179 |
| Apêndice G | | 185 |
| Apêndice H | | 189 |
| Anexo A | | 191 |
| Anexo B | | 193 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Componentes do sedimento formulado: areias grossa, média e fina e mineral de argila caulinita, da esquerda para a direita | 60 |
| Figura 2: Organismo-teste <i>Hyaella azteza</i> (anfípoda) | 62 |
| Figura 3: Esquema ilustrativo do experimento para análise de crescimento e reprodução de <i>H. azteca</i> em meio às formulações de sedimento 4 e 5..... | 64 |
| Figura 4: Montagem do experimento com argilas esmectitas | 66 |
| Figura 5: Esquema ilustrativo da preparação do experimento com argila, <i>Elódea</i> sp e água de cultivo, com monitoramento dos parâmetros por 15 dias | 67 |
| Figura 6: Esquema ilustrativo da preparação de amostras para determinação de metais em ICP-OES: água superficial e intersticial através de centrifugação, e determinação de metais biodisponíveis pelo método de Silvério (1999)..... | 68 |
| Figura 7: Materiais utilizados como matéria orgânica para avaliação de aplicação em sedimento formulado (à esquerda) e montagem do teste (à direita) | 69 |
| Figura 8: Preparação das amostras de matéria orgânica para análise de N, P e TOC | 71 |
| Figura 9: Etapas do processo de preparo das amostras para determinação de fósforo total..... | 72 |
| Figura 10: Kit Hach utilizado para determinação de nitrogênio total em amostra líquida..... | 73 |
| Figura 11: Etapas do processo de preparo das amostras para determinação de nitrogênio total..... | 74 |
| Figura 12: Amostras para análise de TOC e equipamento de medição de TOC..... | 75 |
| Figura 13: Organismo-teste <i>Ceriodaphnia dubia</i> (microcrustáceo da ordem Cladóccera)..... | 76 |
| Figura 14: Condicionamento do sedimento formulado: etapa de agitação por 2h a 175 rpm | 81 |
| Figura 15: Troca de solução-teste e contagem de neonatos sobre caixa de luz..... | 83 |
| Figura 16: Microfiltro de fibra de vidro utilizado no preparo de amostras previamente à etapa de SPE | 86 |
| Figura 17: Etapas envolvidas na SPE – Condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito | 91 |
| Figura 18: Etapas concluídas até a fase de SPE no laboratório de Biologia (UNESP) | 91 |
| Figura 19: Derivatização do 17 β -estradiol por sililação com MSTFA ou BSTFA..... | 93 |
| Figura 20: Etapas de eluição, secagem com fluxo de nitrogênio e quantificação dos IE por GC-MS..... | 94 |
| Figura 21: Etapas de condicionamento, percolação e eluição da SPE e reação de derivatização | 94 |

| | |
|---|-----|
| Figura 22: Valores de pH obtidos a cada três dias, no decorrer de 15 dias de experimento, com relação ao conteúdo de matéria orgânica proveniente de ração e Elódea sp.: a) Formulação 1 contendo 20% de matéria orgânica; b) Formulação 2 contendo 15% de matéria orgânica; c) Formulação 3 contendo 5% de matéria orgânica..... | 99 |
| Figura 23: Valores médios de pH obtidos a cada três dias nas formulações 4 (a) e 5 (b), contendo 1 e 3% de matéria orgânica procedente de ração e Elódea sp, em 15 dias de experimento | 101 |
| Figura 24: Conteúdo de metais em água superficial e intersticial em relação a diferentes argilas esmectitas coloridas e CL50 para <i>Hyalella azteca</i> encontradas na literatura | 108 |
| Figura 25: Aspecto da água em contato com ração TetraMin®, Spirulina®, húmus e Elódea sp. (da esquerda para a direita) | 110 |
| Figura 26: Imagens de microscópio óptico com amostras de adultos da espécie <i>Ceriodaphnia dubia</i> a cada tratamento fornecido: a) Controle CA; b) Controle CAM; c) Controle CS; d) Tratamento com EE2; e) Tratamento com E2 | 123 |
| Figura 27: Gráficos representativos das médias de neonatos gerados por fêmeas de cada tratamento do experimento a) Teste 1; b) Teste 2; c) Top down; d) Bottom up; e) MO | 135 |
| Figura 28: Gráfico de decaimento da concentração de E2 em sedimento formulado em função do tempo de exposição..... | 139 |
| Figura 29: Gráfico de decaimento da concentração de EE2 em sedimento formulado em função do tempo de exposição..... | 139 |
| Figura 30: Gráfico de disponibilidade do conteúdo de E2 e EE2 na água superficial e na água intersticial com sedimento formulado após 2 horas de agitação: a) escala decimal; b) escala logarítmica na base 10 | 142 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Compostos considerados interferentes endócrinos e seus efeitos sobre organismos aquáticos em concentrações detectadas em corpos de água naturais.. | 24 |
| Tabela 2: Excreção diária de estrona, 17 β -estradiol e estriol (μ g) em homens e mulheres (Johnson <i>et al.</i> , 2000) | 27 |
| Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos estrógenos 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol | 27 |
| Tabela 4: Conteúdo de carbono, nitrogênio e fósforo para diversas fontes de matéria orgânica (USEPA, 2000) | 41 |
| Tabela 5: Máximas concentrações de E2 e EE2 encontrados em sedimento (μ g/kg) observados na literatura | 55 |
| Tabela 6: Frações orgânicas e inorgânicas utilizadas para a formulação dos sedimentos (baseadas nos reservatórios do médio e baixo e Tietê e Rio Piracicaba) à proporção de sedimento formulado:água reconstituída 1:4 (g:mL) | 61 |
| Tabela 7: Condições para a realização dos testes de toxicidade com <i>Ceriodaphnia dubia</i> | 79 |
| Tabela 8: Descrição das condições dos controles e das soluções contaminadas para o experimento e suas siglas | 81 |
| Tabela 9: Condições de análise dos estrógenos por GC-MS..... | 95 |
| Tabela 10: Valores mínimos e máximos dos parâmetros pH, OD e dureza das formulações de sedimento no decorrer de 15 dias..... | 98 |
| Tabela 11: Resultados das análises químicas das formulações 4 com duas procedências de matéria orgânica em proporções de 1% e 3%, com predomínio de areia grossa e média, com base no sistema Tietê (Estado de São Paulo) | 100 |
| Tabela 12: Resultados das análises químicas das formulações 5 com duas procedências de matéria orgânica em proporções de 1% e 3%, com predomínio de areia fina, com base no sistema Tietê (Estado de São Paulo) | 101 |
| Tabela 13: Parâmetros fisiológicos dos organismos em contato com sedimentos formulados após 10 dias | 104 |
| Tabela 14: Parâmetros fisiológicos dos organismos em contato com sedimentos formulados após 10 dias | 104 |
| Tabela 15: Valores de oxigênio dissolvido (mg/L) referentes aos recipientes contendo diferentes cores de argilas esmectitas..... | 106 |
| Tabela 16: Valores de pH referentes aos recipientes contendo diferentes cores de argilas esmectitas..... | 106 |
| Tabela 17: CL50 para <i>Hyalella azteca</i> e condições dos testes encontrados na literatura | 108 |
| Tabela 18: ISQG*, PEL** e metais biodisponíveis para sete argilas coloridas (mg/kg) | 109 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 19: Metais livres na fase aquosa de sedimento formulado, argila caulinita e controle (µg/L) | 111 |
| Tabela 20: Metais biodisponíveis em amostras de sedimento formulado, caulinita e controle (mg/kg) | 113 |
| Tabela 21: ISQG, PEL e metais biodisponíveis para sedimento formulado, caulinita e controle (mg/kg) | 113 |
| Tabela 22: Valores de nitrogênio, fósforo e carbono orgânico total para amostras líquidas contendo húmus e ração de peixe | 114 |
| Tabela 23: Condições da água de cultivo para o Teste 1 | 118 |
| Tabela 24: Condições das soluções descartadas do Teste 1 | 119 |
| Tabela 25: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do Teste 1 | 120 |
| Tabela 26: Condições da água de cultivo para o Teste 2 | 121 |
| Tabela 27: Condições das soluções descartadas do Teste 2 | 121 |
| Tabela 28: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do Teste 2 (réplica) | 122 |
| Tabela 29: Condições da água de cultivo para o teste sistema <i>top down</i> | 124 |
| Tabela 30: Condições das soluções descartadas do teste sistema <i>top down</i> | 125 |
| Tabela 31: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do teste sistema <i>top down</i> | 125 |
| Tabela 32: Condições da água de cultivo para o teste sistema <i>bottom up</i> | 126 |
| Tabela 33: Condições das soluções descartadas do teste sistema <i>bottom up</i> | 127 |
| Tabela 34: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do teste sistema <i>bottom up</i> | 128 |
| Tabela 35: Condições da água de cultivo para montagem e trocas do ensaio com ração de peixe e húmus | 129 |
| Tabela 36: Condições das soluções descartadas do ensaio com ração de peixe e húmus | 130 |
| Tabela 37: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do ensaio com ração de peixe e húmus..... | 130 |
| Tabela 38: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do ensaio com todo o sedimento e parâmetros da água..... | 132 |
| Tabela 39: Diferenças significativas detectadas pelo método estatístico de Kruskal-Wallis para os testes 1 e 2, <i>bottom up</i> e <i>top down</i> | 133 |
| Tabela 40: Diferenças significativas detectadas pelo método estatístico de Kruskal-Wallis para o experimento com diferentes MO..... | 133 |
| Tabela 41: Comparação entre os métodos estatísticos empregados: Kruskal-Wallis (análise de variância não paramétrico), teste t e teste t com bioequivalência..... | 134 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| ABNT | = Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| Al | = Alumínio |
| ASTM | = <i>American Society for Testing and Materials</i> : Sociedade Americana de Testes e Materiais |
| ° C | = Graus Celcius |
| CA | = Controle de água |
| CaCO ₃ | = Carbonato de cálcio |
| Cd | = Cádmiio |
| CAM | = Controle de água com metanol |
| CCME | = <i>Canadian Council of Ministers of the Environment</i> : Conselho Canadense dos Ministérios do Meio Ambiente |
| CEC | = <i>Contaminants of emerging concern</i> : Contaminantes emergentes |
| CL50 | = Concentração letal para 50% dos organismos |
| Co | = Cobalto |
| CONAMA | = Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| Cr | = Cromo |
| CS | = Controle com sedimento |
| CTC | = Capacidade de troca de cátions |
| Cu | = Cobre |
| DOC | = <i>Dissolved organic carbon</i> : Carbono orgânico dissolvido |
| E2 | = 17β-estradiol |
| EE2 | = 17α-etinilestradiol |
| Fe | = Ferro |
| g | = grama |
| GC-MS | = <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> : Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas |
| h | = hora |

| | |
|------------------|--|
| HCl | = Ácido clorídrico |
| HNO ₃ | = Ácido nítrico |
| HPLC | = <i>High-performance liquid chromatography</i> : Cromatografia líquida de alta performance |
| ICP-OES | = <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> : Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivo |
| IE | = Interferente endócrino |
| ISQG | = <i>Interim freshwater sediment quality guidelines</i> : Guia provisório de qualidade de sedimentos de água doce |
| K _{ow} | = Coeficiente de partição octanol/água |
| LMACA | = Laboratório Multiusuário de Análise e Caracterização de Amostras |
| LOD | = <i>Limit of detection</i> : limite de detecção |
| LOQ | = <i>Limit of quantification</i> : limite de quantificação |
| mm | = milímetro |
| Mn | = Manganês |
| MO | = Matéria orgânica |
| N | = Nitrogênio |
| ng/L | = Nanograma por litro |
| Ni | = Níquel |
| OD | = Oxigênio dissolvido |
| OECD | = <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> : Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômicos |
| P | = Fósforo |
| Pb | = Chumbo |
| PEL | = <i>Probable effect levels</i> : Níveis de efeitos prováveis |
| POC | = <i>Particulate organic carbon</i> : Carbono orgânico particulado |
| ppb | = Parte por bilhão |
| rpm | = Rotação por minuto |
| SH | = Sedimento com húmus |
| SOC | = <i>Suspended organic carbon</i> : Carbono orgânico suspenso |
| SPE | = <i>Solid phase extraction</i> : Extração em fase sólida |
| SR | = Sedimento com ração de peixe |

| | |
|---------------|--|
| S_w | = Solubilidade em água |
| TOC | = <i>Total organic carbon</i> : Carbono orgânico total |
| UNESP | = Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" |
| U.S.EPA | = <i>United States Environmental Protection Agency</i> : Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos |
| UFRGS | = Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| VTG | = Vitelogenina |
| Zn | = Zinco |
| μm | = Micrograma |
| μL | = Microlitro |

Arine A. L. F. de O. Estudo da viabilidade de sedimentos formulados para a aplicação em estudos ecotoxicológicos e químicos: ênfase para os interferentes endócrinos 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol [dissertação]. Sorocaba (SP): Laboratório de Biologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

O uso de sedimentos formulados em laboratório vem sendo largamente adotado e recomendado por organizações de proteção ambiental e outras entidades internacionais de importância, como U.S.EPA, OECD e ASTM, devido, principalmente, à sua fácil reprodutibilidade por diferentes laboratórios e por ser livre de organismos e contaminantes indesejados no estudo. Visando a representatividade de ambientes lóticos tropicais, este estudo propôs analisar diferentes formulações de sedimento para a aplicação em estudo toxicológico de interferentes endócrinos (IE), sendo eles o 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2). Foram avaliados os parâmetros oxigênio dissolvido, dureza e pH de 5 formulações de sedimento durante um período de 15 dias e a adaptação da espécie bentônica *Hyalella azteca* com relação aos parâmetros sobrevivência, crescimento e reprodução. A toxicidade do E2 e EE2, ambos à concentração de 30 ng/L, foi verificada sobre o organismo nectônico *Ceriodaphnia dubia*, exposto por 8 dias em solução extraída da formulação de sedimento que continha menor quantidade de matéria orgânica, contaminada em laboratório. Os parâmetros avaliados foram sobrevivência e reprodução, sendo utilizados os métodos estatísticos de Kruskal-Wallis, teste t e teste t por bioequivalência. O comportamento químico dos compostos foi analisado quanto ao tempo de degradação em ambiente com sedimento formulado (após 2, 24 e 48 horas de contato) e à capacidade de retenção ao sedimento após 2 horas de contato através de quantificação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados mostraram que os sedimentos formulados contendo menores proporções de matéria orgânica (1 e 3% em massa) tiveram melhor estabilização em relação ao pH e também boa aceitação pela espécie *H. azteca*. Porém, o ambiente composto pelo mesmo sedimento não foi ideal para testes com *C. dubia*, tampouco quando readaptado o ambiente, utilizando água intersticial filtrada para teste com E2 e EE2. Os organismos apresentaram queda no número de neonatos quando expostos ao controle com sedimento e aos contaminantes, havendo diferenças significativas verificadas pelos métodos estatísticos utilizados ($p < 0,05$) em relação aos controles contendo apenas água de cultivo e contendo o solvente metanol. Ensaio posteriores revelaram que o sedimento formulado com húmus na composição, no lugar da ração de peixe como matéria orgânica, apresentou resultados satisfatórios para sobrevivência e reprodução de *C. dubia*, com média de 25,7 neonatos na presença do sedimento.

Palavras-chave: Sedimento formulado. Ecotoxicologia aquática. Interferentes endócrinos. Hormônios.

ABSTRACT

The use of laboratory-formulated sediments have been widely adopted, and recommended by environmental protection organizations and other international agencies as USEPA, OECD, and ASTM, mainly for easy reproducibility by different laboratories, and for being free of unwanted contaminants and indigenous organisms. Aiming at the representation of tropical lotic environments, different sediment formulations were analyzed for use in toxicology studies of endocrine disruptors (EI), namely 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinyl estradiol (EE2). Five different formulations were evaluated regarding dissolved oxygen, water hardness and pH over a period of 15 days, and on the adaptation of the benthic species *Hyalella azteca* regarding survival, growth, and reproduction parameters. The toxicity of E2 and EE2, both at the concentration of 30 ng/L, was observed in the nektonic organism *Ceriodaphnia dubia*, exposed to a solution extracted from spiked formulated sediment containing a minor amount of organic matter in a 8-days test. Survivability and reproduction parameters were evaluated using Kruskal-Wallis, t-test and bioequivalence t-test statistical methods. Chemical behavior of the compounds was analyzed regarding environmental degradation time in formulated sediment (after 2, 24, and 48 hours of contact), and sediment retention capacity after 2 hours of contact by quantification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results showed that the formulated sediments which contained smaller fractions of organic matter (1% and 3% dry weight) had better stabilization in relation to pH, and good acceptance by the species *H. azteca*. However, the formulated sediment environment was not ideal for *C. dubia*, which was therefore replaced by filtered interstitial water for E2 and EE2 tests. There was a statistically significant reduction in the number of newborns when exposed to control sediment and contaminants (Kruskal-Wallis, t-test, and bioequivalence methods; $p < 0.05$) compared to control with only pond water and the solvent used. Subsequent tests with the formulated sediment with humus in its composition in place of fish feed as organic matter, showed satisfactory results for *C. dubia* survival and reproduction, reaching average of 25.7 newborns using the whole sediment.

Key words: Formulated sediments. Aquatic ecotoxicology. Endocrine disruptors. Hormones.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias químicas diversas com potencial para atuarem como interferentes endócrinos são frequentemente lançadas no ambiente aquático, prejudicando a biota e o equilíbrio ambiental. Dentre elas, destacam-se os hormônios naturais e sintéticos, excretados por humanos, que atingem os referidos ambientes por meio do lançamento doméstico *in natura* ou com tratamentos inadequados. Uma vez lançados nos corpos de água, podem permanecer temporariamente na água, sofrer transformações químicas, interagir com material particulado e precipitar, se integrando ao sedimento de fundo, podendo também interagir diretamente com a biota aquática. Os interferentes endócrinos (IE) permanecem no meio natural em concentrações ínfimas, na ordem de parte por milhão e parte por bilhão e, ainda assim, podem propiciar condições crônicas, uma vez que tais moléculas são introduzidas nos corpos receptores diariamente.

Em contato com os organismos aquáticos, uma série de alterações biológicas podem ocorrer, inviabilizando a reprodução, crescimento e causando uma série de danos à espécie a longo prazo. Dado que os meios aquáticos apresentam uma grande diversidade biológica, incluindo-se espécies com potencial para abastecimento humano, a qualidade da água deve contemplar parâmetros compatíveis com a necessidade fisiológica das espécies, assegurando sua manutenção e viabilidade. A necessidade da criação de limites de concentração máxima dessas substâncias precisa ser compreendida, de modo a garantir a proteção da vida aquática e, por consequência, preservar a saúde ambiental e humana.

A quantificação de substâncias químicas consideradas interferentes endócrinos apresenta-se em evidência na literatura nacional e internacional. Os efeitos destes compostos sobre a reprodução da biota aquática também têm sido intensivamente descritos em trabalhos científicos. No entanto, os meios para reduzir a atuação desses poluentes sobre a biota precisam de maior atenção, assim como testes que comprovem a capacidade de recuperação fisiológica dos organismos

expostos cronicamente aos agentes IE, após tratamento. A dinâmica desses compostos nos compartimentos ambientais também deve ser compreendida para melhor esclarecimento da atuação ecotoxicológica.

Apesar de os efeitos serem compreendidos para alguns grupos de organismos, em função da exposição de organismos-teste a concentrações conhecidas de IE, pouco se conhece a respeito da dinâmica desses compostos nos sedimentos. Esse fator torna relevante o desenvolvimento metodológico adequado dos ensaios ecotoxicológicos, como por exemplo, o tempo de degradação das substâncias químicas e a consequente necessidade de trocas de soluções testes durante os ensaios. Portanto, a compreensão do comportamento dessas substâncias reflete também nos ajustes metodológicos para melhor condução de um ensaio e obtenção de respostas ecotoxicológicas mais próximas das condições reais.

Diante dessas questões, este projeto propôs estudar a dinâmica de dois estrogênios encontrados com frequência em ambientes aquáticos naturais, por meio de análises químicas e ecotoxicológicas, utilizando-se testes de toxicidade crônica com sedimentos artificiais associados. Tais avaliações, em associação com a compreensão da eficácia de possíveis tratamentos de IE, por meio de testes de recuperação fisiológica, irão contribuir com a ciência da ecotoxicologia aquática e, consequentemente, com a determinação de concentrações permissíveis em ambientes aquáticos, visando a proteção da vida aquática.

Com isso, as questões relevantes que estão contempladas no presente projeto são: 1) Os hormônios presentes nos sedimentos com baixa porcentagem de matéria orgânica apresentam elevada capacidade de disponibilização desencadeando efeitos crônicos para os organismos teste? 2) Os interferentes endócrinos presentes na coluna de água têm elevada capacidade de retenção nos sedimentos? 3) Em função do comportamento químico dos IE nos sedimentos formulados (tempo de degradação, disponibilidade, transformação química), é viável a geração de protocolos metodológicos para avaliar os efeitos ecotoxicológicos? 4) Os aspectos reprodutivos de invertebrados são *endpoints* importantes para a avaliação da atuação dos IE? Algumas destas questões puderam ser respondidas ao longo dos experimentos.

Tal situação precisa ser compreendida para que seja possível gerar bases de dados que propiciem a detecção de concentrações seguras à proteção da vida aquática, em legislações, bem como a indicação de tratamentos adequados para que se atinja a concentração máxima permissível dos poluentes IE.

Essa questão apresenta-se bastante recente e evidente na resolução CONAMA 430/2011, na qual recomenda-se que um efluente somente poderá ser lançado em um corpo receptor se não houver toxicidade ou potencial para causar toxicidade à biota aquática nele presente. Com isso, apesar de não estar especificamente descrito na legislação, fica implícito que os tratamentos de efluentes não apenas devem reduzir as concentrações dos compostos químicos a serem lançados em corpos de água, mas que essa redução seja efetiva considerando-se a ausência de toxicidade para a fauna do sistema aquático receptor.

A avaliação dos IE nos sedimentos pretende proporcionar protocolos para estabelecer uma ou mais formulações, com a sua composição física e química compatível às condições de ambientes lóticos naturais e, dessa maneira, proporcionar uma elevada aplicabilidade em estudos ecotoxicológicos. A utilização de protocolos experimentais padrões, entre laboratórios, permitirá uma maior confiabilidade na comparação de dados em estudo concentração-resposta, possibilitando a seleção de critérios para, no futuro, servir como embasamento aos padrões de qualidade de sedimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Atuação dos Interferentes Endócrinos nos Organismos

O sistema endócrino é o principal responsável pela comunicação química entre os órgãos e tecidos, o que ocorre por meio de mensageiros químicos denominados hormônios. Estes são transportados via circulação e atingem o tecido-alvo estimulando ou inibindo sua atividade biológica. Desta maneira, os processos fisiológicos são regulados e coordenados pelo sistema hormonal (Kraak *et al.* 1998; Gross *et al.* 2003). Cada célula do tecido-alvo possui receptores hormonais em suas membranas ou em seus núcleos, os quais são proteínas que se ligam aos hormônios com elevada afinidade. Sua função é dupla, tendo que reconhecer o hormônio e também transformar o sinal hormonal em resposta biológica (Hanson *et al.*, 2005). No entanto, diversos compostos químicos naturais e sintéticos podem afetar o funcionamento normal do sistema endócrino em diferentes grupos animais. Estes compostos químicos são conhecidos como desreguladores, disruptores ou interferentes endócrinos (Kraak *et al.*, 1998; Dickerson *et al.*, 1998).

A ação dos IE ocorre pelo bloqueio, mimetização e estimulação ou inibição dos hormônios naturais. Geralmente eles alteram o estado homeostático dos hormônios e prejudicam sua interação com os receptores, interferindo no tipo de ligação ou alterando a sua síntese, estocagem, liberação, transporte, metabolismo e eliminação natural (Hanson *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006). Desta maneira, as funções reprodutivas, o desenvolvimento, o comportamento, a imunidade e a sobrevivência, nos diferentes organismos, podem ser comprometidos por essas substâncias (Jobling e Tyler, 2006).

Diversas substâncias químicas com potencial desregulador do sistema endócrino de vertebrados e invertebrados têm sido detectadas em ambientes aquáticos do mundo todo (OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup, 2008), inclusive no Brasil, onde têm sido encontradas em águas superficiais em diferentes

concentrações (Reis *et al.*, 2006; Sodré *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009). A tabela 1 mostra algumas dessas substâncias e suas concentra es encontradas em países diversos, assim como seus efeitos sobre diferentes espécies relacionados a estas concentra es.

Tabela 1: Compostos considerados interferentes endócrinos e seus efeitos sobre organismos aquáticos em concentra es detectadas em corpos de água naturais

| Composto | Concentra o máxima (ng/L) | Local/País | Método analítico de quantifica o | Autor | Efeitos toxicológicos relacionados |
|------------------|---------------------------|--|---|--------------------------------------|--|
| Bisfenol-A (BPA) | 295,0 | Rio Llobregat, Espanha | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas | Rodríguez-Mozaz <i>et al.</i> (2004) | 1 a 1.280 µg/L: redu o na fertilidade em peixes agravada com o passar das gera es (Lintelmann <i>et al.</i> , 2003); 23 µg/L: indu o de síntese de VTG em peixes (Pawlowski <i>et al.</i> , 2000). |
| | 410,0 | Alemanha | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem | Fromme <i>et al.</i> (2002) | |
| | 44.650,0 | Taiwan | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem-ioniza o com eletrospray | Lee <i>et al.</i> (2013) | |
| | 84,0 | Bacia do Rio Atibaia, SP, Brasil | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem | Sodré <i>et al.</i> (2010) | |
| | 1.760,0 | Ribeirão Anhumas, Campinas, SP, Brasil | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois detectores: um de ultravioleta com arranjo de fotodiodos e um de fluorescência molecular | Sodré <i>et al.</i> (2007) | |
| Estrona (E1) | 21,7 | Rio Llobregat, Espanha | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas | Rodríguez-Mozaz <i>et al.</i> (2004) | 9,9, 31,8, 99,3, 318 e 993 ng/L: inibi o do desenvolvimento do testículo em peixe (Panter <i>et al.</i> , 1998); 27-56 ng/L: indu o de síntese de VTG em peixe (Rodgers-Gray <i>et al.</i> , 2000). |
| | 39,0 | Bacia do Rio Atibaia, SP, Brasil | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem | Sodré <i>et al.</i> (2010) | |
| | 541,4 | Arroio Dilúvio, Porto Alegre, RS, Brasil | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa | Dallegrove (2012) | |

| | | | | | |
|------------------------------------|-------|--|---|----------------------------------|---|
| 17 β -estradiol (E2) | 3,8 | Rio Vltava, República Tcheca | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa | <i>Morteani et al.</i> (2006) | 100 ng/L: feminização em machos de peixe (Knörr e Braunbeck, 2002); |
| | 7,3 | Bacia do Rio Atibaia, SP, Brasil | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem | <i>Sodré et al.</i> (2010) | 1, 10 e 100 ng/L: indução de síntese de VTG em peixe (Desbrow <i>et al.</i> , 1998); |
| | 46,2 | Arroio Dilúvio, Porto Alegre, RS, Brasil | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa | Dallegrave (2012) | 30, 60 e 120 ng/L: Alteração de gônadas em peixe (Panter <i>et al.</i> , 2000). |
| | 36,8 | Rio das Velhas, Belo Horizonte, MG, Brasil | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa | Moreira (2009) | |
| Estríol (E3) | 8,8 | Rio Jordão, Israel/Palestina | Kits comerciais Elisa | Barel-Cohen <i>et al.</i> (2006) | 100 e 300 ng/L (<i>Danio rerio</i>) e 10 μ g/L (<i>Oryzias latipes</i>): ocorrência de oócitos no tecido testicular dos machos (Holbech <i>et al.</i> , 2006; Metcalfe <i>et al.</i> , 2001); |
| | 716,8 | Arroio Dilúvio, Porto Alegre, RS, Brasil | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa | Dallegrave (2012) | |
| | 2,3 | Bacia do Rio Atibaia, SP, Brasil | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem | <i>Sodré et al.</i> (2010) | 100 e 1000 ng/L: fibrose testicular em machos da espécie <i>Cyprinus carpio</i> (Gimeno <i>et al.</i> , 1998). |
| 17 α -etinilestradiol (EE2) | 6,1 | Rio Jordão, Israel/Palestina | Kits comerciais Elisa | Barel-Cohen <i>et al.</i> (2006) | 0,32 a 0,96 ng/L: Diminuição de produção de ovos fertilizados e feminização de machos em peixe (Parrott e Blunt, 2005); |
| | 4,6 | Rio Berounka, República Tcheca | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa | <i>Morteani et al.</i> (2006) | 200, 500 e 1.000 ng/L: indução de síntese de VTG em peixe (Folmar <i>et al.</i> , 2000); |
| | 25,0 | Bacia do Rio Atibaia, SP, Brasil | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem | <i>Sodré et al.</i> (2010) | 50 ng/L: indução de síntese de VTG e alta taxa de mortalidade da progenitora em peixes (Schmid <i>et al.</i> , 2002). |
| | 300,0 | Ribeirão Anhumas, Campinas, SP, Brasil | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois detectores: um de ultravioleta com arranjo de fotodiodos e um de fluorescência molecular | <i>Sodré et al.</i> (2007) | |
| | 54,0 | Vargem das Flores, Belo | Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de | Moreira (2009) | |

| | |
|--------------------------|-------|
| Horizonte, MG, Brasil | massa |
|--------------------------|-------|

2.2 Características dos Interferentes Endócrinos em Estudo

O hormônio 17β -estradiol (E2) é o estrogênio mais potente produzido pelo organismo humano, seguido do estrona e do estírol (Sodré *et al.*, 2007). Já o 17α -etinilestradiol (EE2) é um estrogênio sintético e o principal componente das pílulas contraceptivas mais comuns, presente a uma concentração de 30 a 50 μg por pílula, também utilizado em terapias de reposição hormonal (Cicek *et al.*, 2007).

Os estrogênios são hormônios produzidos naturalmente pelo corpo humano ou sintetizados e comercializados como fármacos. São responsáveis pelo desenvolvimento, crescimento e metabolismo das características secundárias femininas, utilizados como contraceptivos, agentes terapêuticos e para a reposição hormonal (Lopes *et al.*, 2010), inclusive para tratamentos dos sintomas de menopausa. O seu uso foi difundido por volta da década de 1950/1960 e, desde então, estes estrogênios vêm sendo lançados nos corpos de água do mundo todo (Johnson *et al.*, 2000). Como os estrogênios são compostos orgânicos hidrofóbicos e pouco voláteis, é possível que a adsorção aos sedimentos seja um fator importante para a redução da concentração desses compostos na coluna de água (Jurgens *et al.*, 1999).

Segundo Lopes *et al.* (2010), a presença desses IE no ambiente advém principalmente da excreção diária de estrogênios de mulheres, podendo também ser dispostos no ambiente pelo escoamento superficial de solo, provenientes de resíduos de animais presentes. A tabela 2 mostra uma estimativa da excreção diária dos principais estrógenos naturais por seres humanos.

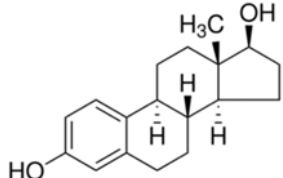
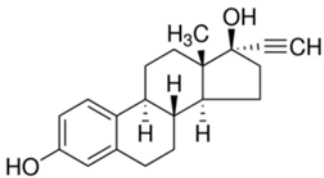
Tabela 2: Excreção diária de estrona, 17 β -estradiol e estriol (μg) em homens e mulheres (Johnson *et al.*, 2000)

| Categoria | Estrona | 17 β -estradiol | Estriol |
|-------------------------|---------|-----------------------|---------|
| Homens | 3,9 | 1,6 | 1,5 |
| Mulheres em menstruação | 8,0 | 3,5 | 4,8 |
| Mulheres em menopausa | 4,0 | 2,3 | 1,0 |
| Gestantes | 600,0 | 259,0 | 6000,0 |

Segundo Johnson *et al.* (2000), estima-se que a taxa de excreção diária de 17 α -etinilestradiol em mulheres que consomem pílulas contraceptivas ou que fazem reposição hormonal é de 35 μg .

Tais compostos são lançados nos corpos de água pelo despejo de esgoto *in natura* ou com tratamento convencional, o qual não tem se mostrado adequado ao tratamento e eliminação de interferentes endócrinos da água. A tabela 3 mostra as principais características e fórmula molecular dos compostos 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol, os quais apresentam boa solubilidade em metanol.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos estrógenos 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol

| Característica | 17 β -estradiol | 17 α -etinilestradiol |
|---|--|---|
| Sigla | E2 | EE2 |
| Fórmula molecular ^a | C ₁₈ H ₂₄ O ₂ | C ₂₀ H ₂₄ O ₂ |
| Peso molecular (g/mol) ^a | 272,4 | 296,4 |
| Solubilidade em água (mg/L a 20°C) ^a | 13 | 4,8 |
| Pressão de vapor (mm Hg) ^a | 2,3 x 10 ⁻¹⁰ | 4,5 x 10 ⁻¹¹ |
| Constante de sorção ^a | 3300 | 4770 |
| Constante Lei de Henry (atm m ³ /mol) ^b | 3,64 x 10 ⁻¹¹ | 7,94 x 10 ⁻¹² |
| Pka ^{*a} | 10,23 | 10,05 |
| Log ko/a ^{**a} | 3,94 | 4,15 |
| Estrutura molecular ^a |  |  |

*Pka: cologaritmo da constante de dissociação ácida

**Log ko/a: coeficiente de partição octanol-água

^a Ying *et al.* (2002)

^b Petrovic e Barceló (2007)

Segundo Thorpe *et al.* (2003), o EE2 foi encontrado em diversos ambientes aquáticos pelo mundo que recebem efluentes domésticos em concentrações suficientes para induzir efeitos de exposição crônica em animais aquáticos, como efeitos de feminização de peixes utilizados em testes de laboratório. Existe uma vasta quantidade de estudos relacionados aos efeitos de IE em vertebrados, principalmente peixes e anfíbios. Porém, em decorrência da escassez de conhecimentos fisiológicos de outros grupos de animais, ainda não existe total consenso sobre quais são os efeitos provocados pelos interferentes endócrinos nesses organismos. Desta forma, são necessários estudos que relacionem concentração, efeitos cumulativos e atividade intrínseca de interferência para a descoberta do potencial de danos causados por estas substâncias em invertebrados, os quais representam a maior parte da biodiversidade animal. Nesse contexto, em revisão sobre a atuação dos IE em invertebrados de água doce pela revista *Ecotoxicology*, foi destacada a necessidade da compreensão da atuação destas substâncias no referido grupo (Weltje e Schulte-Oehlmann, 2007), conforme apresentado no item 2.5.1.

2.3 Dinâmica dos IE nos Ambientes Aquáticos

Aproximadamente 87.000 substâncias antropogênicas podem agir como IE sobre organismos aquáticos (Thacker, 2005). Algumas dessas substâncias normalmente são persistentes no ambiente, acumulando-se nos solos e sedimentos, podendo atingir grandes áreas por transporte, como por exemplo, pela lixiviação, podendo também se acumular ao longo da cadeia trófica.

Consequências severas dos IE sobre a biota não ocorrem apenas pelo contato direto, mas também pela transferência desses poluentes da mãe para o feto, efeito conhecido como teratogênico, desencadeando anomalias reprodutivas, desenvolvimento desordenado de células, dentre outros (Choi *et al.*, 2004). Os efeitos dessas substâncias sobre os organismos dependem da concentração de exposição (sendo alguns ativos em concentrações ppb – parte por bilhão), do tempo de contato com o organismo, da frequência a que este organismo é exposto, da

biologia, da fase de vida e da etapa do ciclo reprodutivo da espécie (Kendall *et al.*, 1998). As características dos fatores abióticos, as propriedades físico-químicas dos IE, bem como as condições ambientais em que eles se encontram determinam o seu modo de ação, refletindo no funcionamento endócrino (Tillitti *et al.*, 1998).

Sodré *et al.* (2007) destacam que, atualmente, os principais grupos potenciais de substâncias consideradas IE no meio aquático são: a) os Plastificantes (ftalatos e bisfenol-A); b) os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA); c) as Bifenilas Policloradas; d) os Pesticidas; e) os Estrogênios Naturais e Artificiais e d) os Retardantes de Chamas Bromados. Segundo os autores, tais substâncias atingem os corpos de água por meio de fontes pontuais e difusas de poluição, tornando os IE um problema crônico nestes ambientes.

Diamond *et al.* (2011) realizaram um estudo para detectar quais os grupos químicos de IE deveriam ter prioridade em avaliações de riscos ecológicos, por levantamento literário, e definiram os critérios: 1) capacidade de detecção de compostos orgânicos, na ordem de ppb, por métodos químicos; 2) a disponibilidade de trabalhos com dados sobre esses grupos químicos detectados em diferentes ambientes e 3) dados sobre a toxicidade na fauna aquática em determinadas concentrações. Os autores concluíram que os hormônios naturais e sintéticos, bem como os agrotóxicos, devem ser priorizados em estudos ambientais para que se obtenham concentrações seguras, em função do seu maior conhecimento e presença nos ambientes aquáticos (Diamond *et al.* 2011; López-Jiménez *et al.* 2013).

Sonnenschein e Soto (1998) discutem que os efeitos sobre os sistemas endócrino e reprodutivo desencadeados por estrogênios naturais e sintéticos encontrados no ambiente ocorrem devido à sua habilidade de: 1) simular o efeito de hormônios endógenos; 2) anular o efeito dos hormônios endógenos; 3) interromper a síntese e o metabolismo de hormônios endógenos e de receptores de hormônios.

Em grande parte dos ambientes aquáticos, os hormônios sexuais são encontrados em nível de ultratraço (ng/L) (Dallegrave, 2012). Desta forma, faz-se necessária a utilização de metodologias analíticas de grande precisão, com baixos limites de detecção e quantificação, sensíveis e confiáveis. Apesar disso, diversos estudos confirmam que os hormônios sexuais são persistentes no ambiente e não

sofrem degradação completa nas estações de tratamento de efluentes convencionais (Dallegrave, 2012).

2.4 Dinâmica dos IE nos Sedimentos

Diversos países, a exemplo do Brasil, tomaram como referência critérios citados em legislações de países do hemisfério norte, em especial Estados Unidos e Canadá, os quais são geralmente expressos por limites de concentrações (de agentes físicos ou químicos), provenientes de estudos de toxicidade nas condições ambientais destes lugares (Bertoletti e Zagatto, 2008).

No Brasil, a Resolução CONAMA 344/04 (Brasil, 2004) é o único documento existente que mais se aproxima sobre a qualidade de sedimentos. Na ausência de um documento específico que estabeleça a qualidade aceitável de sedimentos para espécies químicas diversas, esta resolução trata de estabelecer diretrizes gerais e procedimentos para a avaliação do material a ser dragado, visando ao gerenciamento de sua disposição em águas jurisdicionais brasileiras. Segundo Bertoletti e Zagatto (2008), os critérios de qualidade constantes na referida resolução estão adequados com valores orientadores descritos em publicações internacionais sobre qualidade de sedimentos, de onde os critérios possuem origem.

Aragão e Araújo (2008) descrevem o compartimento sedimento como uma das matrizes mais complexas presentes no ambiente aquático, constituído tipicamente de uma mistura de argila, areia, sais minerais e matéria orgânica. De acordo com Mozeto e Zagatto (2008), os materiais dissolvidos e particulados que adentram um ambiente aquático, de natureza orgânica e inorgânica, invariavelmente se associam por meio de processos de superfície aos particulados suspensos pré-existentes (adsorção, complexação e reprecipitação) e tendem a se decantar, passando a fazer parte dos sedimentos.

Os interferentes endócrinos, uma vez no sistema aquático, podem sofrer uma série de processos, tais como diluição, fotólise, biodegradação e adsorção ao sedimento, os quais podem contribuir com a diminuição de sua concentração ou sua eliminação no ambiente aquático (Petrovic *et al.*, 2001). É esperado que muitos dos

IE não sofram fotodegradação no sedimento e que ocorra pouca biodegradação. Portanto, o sedimento age como uma segunda e potencial fonte de poluentes em sistemas aquáticos e a implicação da adsorção em sedimentos de água doce pode ser significativa em termos de impacto ecotoxicológico (Petrovic *et al.*, *op. cit.*). Segundo Mozeto (2006), os xenobióticos orgânicos encontrados em sedimentos de ecossistemas aquáticos são de baixa solubilidade na água, pouco reativos e de elevada hidrofobicidade. Os organismos bentônicos ou nectônicos que se alimentam de detritos orgânicos presentes nesse compartimento estão mais propensos à ação dos poluentes nele presentes. Dependendo da biodisponibilidade, organismos bentônicos podem ser expostos a maiores concentrações de IE do que animais que vivem na coluna de água se os compostos ali forem preservados, em zonas de atividade anaeróbica (Holthaus *et al.*, 2002).

Os IE podem persistir no sedimento por longos períodos de tempo, assim como ser transportados a outras áreas e eventualmente ser liberados por difusão através da interface sedimento-água ou através da re-suspensão do sedimento em fluxos fortes de água. Experimentos de laboratório que estudaram o comportamento de estrogênios no ambiente aquático indicaram que o sedimento age como um reservatório, de onde os IE podem se tornar eventualmente biodisponíveis (Petrovic *et al.*, 2001).

Em estudo, Holthaus *et al.* (2002) investigaram o potencial de adsorção dos hormônios E2 e EE2 em sedimento suspenso e de fundo de cinco rios britânicos, variando entre áreas urbanas, industrializadas e áreas rurais. Os autores concluíram que 80 a 90% da ligação dos hormônios com o sedimento de fundo se completou dentro de 1 dia. Além disso, as análises indicaram que a sorção ao sedimento está bem relacionada com o tamanho da partícula.

O 17 β -estradiol possui meia vida curta sob condições aeróbicas em rios e pode-se considerar que este hormônio é suscetível à biodegradação sob condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas em sedimento de fundo. Portanto, pode ser baixa a probabilidade para que se acumule nesse compartimento. Por outro lado, o 17 α -etinilestradiol, que é mais resistente à biodegradação, pode permanecer bem preservado nos compartimentos aquáticos, e sua biodisponibilidade ainda deve ser estabelecida (Holthaus *et al.*, 2002). Dessa forma, o potencial do EE2 em se ligar e persistir no sedimento deve receber maior atenção.

2.5 Ecotoxicologia aquática

A ecotoxicologia aquática pode ser definida como o estudo dos efeitos dos agentes tóxicos nos organismos aquáticos a nível celular, individual, populacional e nas comunidades (Adams e Rowland, 2003). Considerando-se a avaliação e o monitoramento dos poluentes aquáticos, as análises químicas e físicas detectam e quantificam as substâncias nos ambientes. Contudo, para uma melhor compreensão destes resultados, é recomendável a utilização dos ensaios ecotoxicológicos que permitam prever os efeitos das mesmas substâncias sobre a biota. Este fato torna a interpretação dos estudos mais relevante e aplicável (Zagatto, 2008).

Os ensaios de toxicidade permitem determinar: a) a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos; b) estabelecer critérios e padrões de qualidade de água e sedimento; c) avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; d) avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; e) subsidiar programas de monitoramento ambiental, dentre outras aplicações (Aragão e Araújo, 2008).

A escolha de um organismo-teste para avaliação da toxicidade deve ser realizada com base em alguns critérios, destacando-se: ampla faixa de sensibilidade a substâncias tóxicas; abundância e disponibilidade de aquisição; importância comercial ou ecológica; facilidade de cultivo em laboratório; informações literárias sobre a biologia da espécie; ciclo de vida curto; representatividade dos compartimentos ambientais, e ser nativa do sistema de estudo (Hoffman, 2003).

O conhecimento dos efeitos biológicos resultantes da exposição às concentrações reais de poluentes é essencial para predizer uma análise de risco ambiental confiável. No entanto, concentrações relativamente altas de IE têm sido aplicadas em ensaios de toxicidade laboratoriais para obtenção da curva concentração-resposta, em curtos períodos de exposição, não condizendo com a realidade ambiental (Fuchsman e Barber, 2000). Por este motivo, os ensaios de toxicidade realizados para IE devem basear-se nas concentrações mínimas capazes de provocar algum efeito biológico (crescimento, mobilidade, reprodução, quantidade de filhotes por fêmea, histopatologia, atividades enzimáticas, alterações na expressão gênica, dentre outros) por períodos de tempo prolongados, não tomando-

se como base o efeito letal.

Diversos ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos e alguns métodos já foram padronizadas, nacionalmente e internacionalmente, por associações ou organizações de normalização como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); Environmental Protection Agency (EPA); Organization for Economic Co-operation and Development (OECD); International Organization for Standardization (ISO); American Society for Testing and Materials (ASTM), dentre outras (Aragão & Araújo, 2008). No entanto, segundo Leeuwen *et al.* (2007), uma das maiores dificuldades é estabelecer uma metodologia padrão para testes de toxicidade com substâncias puras em sedimentos, para avaliar a curva concentração-resposta, considerando-se a biodisponibilidade de poluentes, pelo fato de ser uma matriz muito complexa e variável.

Apesar desse fato, os sedimentos formulados e controladamente contaminados (*spiked sediments*), com base em condições reais de sedimentos norte-americanos, são recomendados pela OECD desde 1994, buscando-se obter baixas concentrações de efeitos observados (CEO), concentrações de efeitos não observados (CENO) e concentrações letais (CL), para servirem como base ao estabelecimento de padrões de qualidade de sedimentos (Suter, 2008).

Este tipo de ensaio apresenta como maior vantagem o reflexo da biodisponibilidade da substância testada e a sua atuação biológica. A maior limitação é que o sedimento, se não for preparado com cautela, pode não representar as condições detectadas *in natura*, resultando em previsões inadequadas (Burton *et al.* 2003). Segundo Suedel e Rodgers (1994a), o conteúdo de matéria orgânica em sedimentos formulados deve ser enfatizado por dois motivos: por representar uma fonte de alimento e por conter as substâncias quelantes de poluentes, interferindo na biodisponibilidade e toxicidade do contaminante.

A biodisponibilidade de contaminantes dos sedimentos depende de vários fatores bióticos e abióticos. Os resultados de ensaios de toxicidade são trabalhados por estimativas, pois mesmo as amostras coletadas em campo e que serão avaliadas em laboratório sofrem alterações ao serem manipuladas, e, por consequência, não representam uma verdade absoluta da realidade (Burton *et al.*, *op. cit.*). As avaliações ecotoxicológicas mais próximas às condições reais são os

ensaios de toxicidade “*in situ*”, que consistem na introdução dos organismos-teste cultivados em laboratório nos ambientes naturais, porém são limitados quanto à interpretação. É extremamente difícil avaliar os fatores que causaram a toxicidade, uma vez que a dinâmica do ambiente aquático natural é muito complexa e, por vezes, imprevisível. Este fato torna inviável estabelecer critérios legais para substâncias tóxicas (Fracácio *et al.*, 2011).

Com isso, os ensaios de toxicidade com substâncias puras, por contaminação de água e de sedimento em concentrações conhecidas, apesar das limitações metodológicas, permitem prever e estimar os principais riscos sofridos pela biota aquática em determinadas concentrações, sob condições controladas em laboratório, além de selecionar os critérios que devem ser considerados para estabelecer os padrões aceitáveis de substâncias químicas, nos sistemas hídricos, considerando não só a proteção da vida aquática, mas permitindo os diferentes usos destes ambientes de modo seguro.

2.5.1 Atuação dos IE sobre os organismos-teste: estudos ecotoxicológicos

Os efeitos de interferentes endócrinos são mais difíceis de serem avaliados em demais grupos de organismos que não sejam os peixes, para os quais existe grande quantidade de estudos, em decorrência da escassez de conhecimentos fisiológicos de outros animais. No entanto, Segner *et al.* (2003) e Weltje e Oehlmann (2007) destacam a necessidade de compreensão da atuação dos IE em invertebrados de água doce diante dos fatos: os invertebrados aquáticos constituem a maior parte da biodiversidade animal e foram ignorados na avaliação de IE nos últimos 20 anos; este grupo é de extrema relevância ecológica, considerando o equilíbrio trófico dos ambientes aquáticos; são de elevada aplicabilidade comercial, destacando-se como fontes protéicas em piscicultura. Esse assunto foi foco de edição especial pela revista *Ecotoxicology* de 2007 (volume 16).

O organismo epibentônico *Hyalella azteca*, um anfípoda de água doce, tem sido recomendado em norma internacional (USEPA, 2000) e nacional (ABNT, 2007) para avaliação da toxicidade de sedimentos, em função do ciclo de vida curto, fácil

manutenção em laboratório a baixo custo, por apresentarem dimorfismo sexual e reprodução sexuada e pelas fêmeas produzirem ovos, sendo dotadas de gene para vitelogenina. Estas características permitem avaliar a sobrevivência, reprodução, e as mesmas avaliações por diferentes gerações, que são critérios recomendados para avaliação ecotoxicológica de IE. Os anfípodas desempenham um papel importante nos ambientes aquáticos devido aos seus hábitos detritívoros e herbívoros, ocorrendo a transferência de energia produzida pelas algas e vegetais para consumidores de níveis tróficos mais elevados (USEPA, 2000).

Os testes de toxicidade podem ser conduzidos utilizando-se qualquer espécie adequada que possa ser testada em pequenos volumes de água (Botta *et al.*, 2006). A USEPA (2000) e ASTM (2010) recomendam que sejam realizados testes de toxicidade com sedimento ou com água intersticial apenas, com espécies bentônicas, porém outras espécies representativas da coluna de água podem ser adotadas, como a *Daphnia* spp e *Ceriodaphnia* spp. Segundo Adams e Rowland (2003), essas espécies podem ser testadas com sedimento em recipientes de ensaio, como também utilizando-se exposição à água intersticial, o que oferece uma boa aproximação da toxicidade da fração livre dissolvida de contaminantes. Normalmente, a água intersticial é extraída dos sedimentos por centrifugação e usada em teste de toxicidade com uma vasta gama de organismos em diferentes estágios de vida. O uso de água intersticial permite a realização de testes toxicológicos com filhote de peixe e com invertebrados (Adams e Rowland, 2003).

A espécie *Ceriodaphnia dubia* tem sido utilizada em testes de toxicidade e de qualidade de sedimento e água intersticial nos trabalhos de Sasson-Brickson e Burton Jr. (1991), Schubauer-Berigan *et al.* (1993), Viganò (2000), Panko *et al.* (2013), Black *et al.* (2013), dentre outros autores, para avaliação de toxicidade utilizando tanto todo o sedimento natural, como água intersticial filtrada ou elutriado filtrado e não filtrado. Trata-se de uma espécie sensível a uma grande diversidade de contaminantes, sendo frequentemente utilizada em ensaios crônicos para o monitoramento da qualidade de efluentes industriais e municipais (Jukosky *et al.*, 2008). Suas vantagens estão no fato de ser uma espécie sensível, filtradora para alimentação, possui ciclo de vida curto, é de fácil manutenção em laboratório, é pequena e, portanto, necessita de poucos volumes para teste, e mantém uma posição chave na cadeia alimentar aquática (USEPA, 2002). Em estudos brasileiros,

a espécie foi utilizada por Alegre (2009) em ensaios toxicológicos crônicos com elutriato e água intersticial de sedimento de amostras sedimentares do Tietê. Rodgher *et al.* (2005) utilizaram os organismos *C. dubia*, *Daphnia similis* e *Danio rerio* para análise toxicológica crônica de água e sedimentos coletados nos reservatórios em cascata do Rio Tietê.

Após a descoberta de que os sedimentos são um banco de depósito de contaminantes, a água intersticial dos sedimentos foi logo identificada como a maior rota de exposição de contaminantes para a fauna interior do sedimento e organismos epibentônicos (Di Toro *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 2001), tendo sido apontada como a fração mais representativa para avaliar a toxicidade do sedimento, pois é o meio principal onde a toxicidade de um contaminante se manifesta a organismos aquáticos (Botta *et al.*, 2006). Segundo Adams *et al.* (2001), o uso de organismos da coluna d'água em ensaios de toxicidade de água intersticial é considerado cientificamente apropriado.

O levantamento de uma concentração ambientalmente segura tem como base a exposição de organismos-teste sob condições controladas, a diferentes concentrações do agente químico que se pretende avaliar, seguindo-se um determinado período de tempo. A partir da relação concentração, efeito e tempo de exposição, é estabelecida uma faixa de concentração acima da qual a maioria das espécies passa a sofrer injúrias e, portanto, são limites que não devem ser ultrapassados (Zagatto, 2008).

No Brasil, a Resolução CONAMA 357/05 estabelece os padrões de qualidade de água em função do uso pretendido, considerando-se, dentre eles, a proteção da vida aquática em corpos de água de classe 1 e 2. No entanto, não há uma legislação nacional que estipule os padrões de qualidade de sedimentos ou potencial toxicológico desse compartimento, com o mesmo objetivo existente para a água. Esses limites são baseados na legislação canadense (CCME, 2002) e esse fato pode ser explicado em função da dificuldade e limitação de estudos com sedimentos, considerando as complicações na interpretação de resultados em experimentos com sedimentos naturais. Esses são uma matriz muito complexa, podendo apresentar várias influências na biodisponibilidade e reações em geral, que podem mascarar os reais efeitos tóxicos de um poluente (Mozeto & Zagatto, 2008).

Diante dessa problemática, surgiu o conceito de se trabalhar com sedimentos formulados artificialmente e contaminados em laboratório (*spiked sediments*), o que permite determinar os efeitos tóxicos de contaminantes de forma isolada da mistura (Murdoch *et al.*, 1997). Essa condição permite uma melhor compreensão do comportamento de classes de poluentes em estudo, como a mobilidade entre compartimentos água e sedimentos (“*top down*” e “*bottom up*”), tempo de degradação e formação de subcompostos, variáveis dependentes que propiciam biodisponibilidade e toxicidade à biota.

2.6 Aplicação de sedimentos formulados em estudos ecotoxicológicos

Os sedimentos propiciam habitat para muitos organismos aquáticos e é o maior repositório para muitos produtos químicos persistentes que são introduzidos nas superfícies das águas. As pesquisas envolvendo sedimento e efeitos de seus contaminantes sobre a biota aquática tiveram início na década de 1970, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos agudos de materiais dragados sobre organismos bentônicos no local de disposição final (Gannon e Beeton, 1971). Contudo, os sedimentos de corpos de água passaram a ser mais amplamente estudados em termos ecotoxicológicos a partir da década de 1980, a fim de prover informações químicas, físicas e biológicas importantes ao entendimento deste sistema complexo.

Os estudos envolvendo sedimentos podem ser empregados com as seguintes finalidades, segundo a American Society for Testing and Materials (ASTM, 2010): (1) Determinar a relação entre efeitos tóxicos e biodisponibilidade de poluentes; (2) Investigar as interações entre diferentes produtos químicos; (3) Comparar a sensibilidade de diferentes organismos; (4) Determinar a distribuição espacial e temporal de contaminação; (5) Avaliar os riscos de material dragado; (6) Medir a toxicidade de compostos químicos; (7) Listar por criticidade áreas a serem remediadas e (8) Estimar a eficácia das práticas de remediação ou de gestão.

Para estudos com o objetivo de avaliação ecotoxicológica, torna-se difícil a tarefa de se trabalhar com sedimentos devido à sua complexa composição e interação com o ambiente ao redor, além da presença de diversos organismos

indesejados. Normalmente, ocorre a presença de inúmeras substâncias que podem influenciar o estado de saúde e sobrevivência dos organismos aquáticos. Para esse tipo de estudo toxicológico, existem dois modos de utilização de sedimentos, dependendo dos objetivos da pesquisa: sedimento natural e sedimento formulado (Matthiessen *et al.*, 1998).

Os sedimentos formulados, também denominados de sedimentos sintéticos ou artificiais, vêm sendo utilizados mais amplamente a partir da década de 1990, com base em estudos de entidades ambientais dos Estados Unidos e Canadá para a criação de um sedimento aquático substituto (Gonzalez, 2012). Sua aplicação possui diversas vantagens, tais como a ausência de contaminação por compostos que não são de interesse, possuem composição conhecida e são de fácil reprodução em diferentes laboratórios, entre outras (Suedel e Rodgers, 1994a; Verrhiest *et al.*, 2002). Porém, suas limitações estão no fato de não possuírem atividade biológica intensa, o que torna o sedimento formulado relativamente distante da realidade dos ambientes naturais (Fleming *et al.*, 1998). Além disso, existe o desafio de simular com maior fidelidade possível o complexo conjunto de matéria orgânica e as condições naturais de oxido-redução (Suedel e Rodgers, 1994a). Tais dificuldades em representar um ambiente natural podem interferir diretamente na especiação química em estudos de comportamento de contaminantes.

Entretanto, podem-se apontar também algumas desvantagens do uso de sedimento natural. Sedimentos livres de impurezas indesejáveis e com características físico-químicas desejadas são difíceis de encontrar (Naylor e Rodrigues, 1995) e, além disso, sua composição e propriedades variam entre sítios e com o passar do tempo, o que inviabiliza uma possível padronização (Fleming *et al.*, 1998).

A *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2010) recomenda fortemente o uso de sedimentos formulados e lista as suas principais vantagens em relação a sedimentos naturais, sendo elas: 1) Tornar possível a utilização de uma matriz padronizada e reprodutível, diminuindo a variabilidade em experimentos; 2) Não há a necessidade de coletar sedimento de uma fonte não contaminada; 3) Não há a necessidade de pré-tratamento para a remoção de organismos indesejados; 4) Os testes podem ser conduzidos a qualquer momento

sem que ocorra variação sazonal como ocorre em ambientes naturais; 5) Os custos são reduzidos se comparados a uma coleta de sedimento em quantidades requeridas para os testes de rotina; 6) Permitem comparações de toxicidade entre laboratórios, com a determinação de substâncias tóxicas.

Uma vez que parâmetros como redox, matéria orgânica e atividade biológica, inerentes dos sedimentos naturais, são envolvidos nas propriedades de ligação e de biodisponibilidade de contaminantes, a extrapolação dos resultados obtidos com sedimentos formulados continua sendo uma tarefa difícil. Como consequência, Verrhiest *et al.* (2002) afirmam que os sedimentos formulados são mais utilizados para estabelecer dados referentes a efeitos químicos de determinado composto ou elemento e com a finalidade de comparações de resultados entre laboratórios.

Muitos dos sedimentos formulados estudados até os dias atuais foram baseados em três simples componentes, que são areia, silte/ argila e matéria orgânica, os quais têm se mostrado aceitáveis quanto à sobrevivência e crescimento de organismos-teste em tempos de exposição típicos de testes toxicológicos. Porém, Fleming *et al.* (1998) demonstraram a importância em se comparar resultados de toxicidade obtidos com sedimentos naturais e artificiais. Nesse caso, os autores investigaram os efeitos de um contaminante em sedimentos artificiais, comparando-os com os efeitos em meio de sedimento natural com características físico-químicas similares. Foi notado que a biodisponibilidade do contaminante é diferente para cada tipo de matéria orgânica utilizada, mesmo sendo usada na mesma proporção.

Gonzalez (2012) relatou que, a partir do ano de 1990, foi observado o início do uso de sedimentos formulados em estudos ambientais, devido principalmente ao grande desenvolvimento de políticas ambientais nos países industrializados nesse período. Assim, a conformidade com diversas novas legislações criou a necessidade de avaliação ambiental, incluindo os sedimentos aquáticos, e o número de estudos abordando sedimentos formulados disparou nesta década.

2.7 Características que influenciam na qualidade do sedimento formulado

Tipicamente, os sedimentos são constituídos por uma mistura de argila, areia, sais minerais e matéria orgânica (Araújo *et al.*, 2006), sendo que cada um desses componentes abrange uma subclasse de maior ou menor complexidade, como é o caso da matéria orgânica, que pode apresentar-se de diferentes maneiras e composições. No corpo de água, quanto menor for o tamanho da partícula, seja particulado suspenso ou de fundo, maior é a sua reatividade, sendo este processo muito ativo em ambientes ricos em silte e argila. Dessa forma, os sedimentos constituem um importante sumidouro de diversos contaminantes, oferecendo toxicidade a espécies que vivem nesse local e se alimentam dessas partículas (Mozeto e Zagatto, 2008).

Para a formulação de sedimentos, é importante observar uma série de fatores para que sua utilização em ensaios laboratoriais apresente estas características esperadas para um sedimento natural. Ressalta-se a influência que os componentes, a granulometria e a fonte de matéria orgânica, assim como o condicionamento do sedimento formulado, podem causar em estudos de adsorção e toxicidade de organismos. A seguir, serão discutidos os considerados principais fatores que influenciam na qualidade de sedimentos formulados.

2.7.1 Matéria orgânica

A matéria orgânica é um componente crítico para o sedimento formulado e deve ser cuidadosamente escolhido para este fim. Dentre os fatores abióticos, o conteúdo de matéria orgânica no sedimento tem sido citado como o fator principal que controla a biodisponibilidade de poluentes orgânicos em estudos toxicológicos (Di Toro *et al.*, 1991). Um maior conteúdo de matéria orgânica em sedimentos aumenta a sorção de compostos orgânicos às partículas orgânicas, tornando-os menos disponíveis à coluna de água. Este componente foi apontado por Naylor e Rodrigues (1995) como uma das maiores limitações de sedimentos formulados

realísticos, havendo a necessidade da padronização de uma fonte de matéria orgânica, pois diversos trabalhos utilizam fontes variadas e isso torna difícil a comparação entre eles.

São diversas as fontes de matéria orgânica escolhidas para a utilização em composição de sedimentos formulados, tais como turfa, esterco, húmus, plantas, celulose e ração de peixe. A α -celulose, turfa e ração de peixe Tetramin® são encontradas com maior frequência nos trabalhos com essa finalidade.

As vantagens em se usar ração de peixe em análises padronizadas de toxicidade estão no fato de que esse produto possui uma composição padrão de componentes e nutrientes essenciais, além da possibilidade de redução da frequência de alimentação durante o teste, o que pode afetar na sorção e biodisponibilidade do contaminante de estudo, como foi verificado por Wästlund (1999).

A USEPA (2000) listou diversas fontes de matéria orgânica com suas correspondentes porcentagens dos principais nutrientes (nitrogênio e fósforo) e carbono (tabela 4). De acordo com os diferentes valores observados de nitrogênio, fósforo e carbono para fontes de matéria orgânica, presume-se que a escolha deste material causa um forte impacto na relação com o sedimento, o que influencia inclusive na produção primária quando há a presença de vegetais.

Tabela 4: Conteúdo de carbono, nitrogênio e fósforo para diversas fontes de matéria orgânica (USEPA, 2000)

| Fonte de matéria orgânica | Carbono (%) | Nitrogênio (mg/g) | Fósforo ($\mu\text{g/g}$) |
|---------------------------|-------------|-------------------|-----------------------------|
| Turfa | 47 | 4 | 0,4 |
| Folhas de <i>maple</i> 1 | 42 | 6 | 1,3 |
| Folhas de <i>maple</i> 2 | 47 | 3 | 1,7 |
| Esterco bovino | 30 | 11 | 8,2 |
| Ração para coelho | 40 | 18 | 0,2 |
| Ácido húmico | 40 | 3 | ND |
| Folhas de cereais | 47 | 4 | 0,4 |
| <i>Chlorella</i> | 40 | 41 | 5,7 |
| Ração para truta | 43 | 36 | 11,0 |
| TetraMin® | 37 | 45 | 9,6 |
| TetraFin® | 36 | 29 | 8,6 |
| α -celulose | 30 | 0.7 | ND |

ND: Não detectado.

Das fontes apresentadas na tabela 4, o percentual de carbono variou de 30 a 47%, a concentração de nitrogênio apresentou variação de 0,7 a 45 mg/g e o fósforo, de 0,2 a 11 µg/g. De modo geral, a ração TetraMin® apresentou altos valores para os três parâmetros avaliados.

Das possíveis fontes de matéria orgânica, apenas turfa, ácido húmico, compostagem de esterco e α -celulose foram utilizadas em testes de sedimento com sucesso sem que degradassem a qualidade da água, segundo Kemble *et al.* (1999), e as demais fontes listadas na tabela causaram queda nas concentrações de oxigênio dissolvido. Ainda assim, em diversos estudos pode-se observar o uso destas fontes de matéria orgânica sem que o teste e os organismos fossem prejudicados.

Alguns destes materiais são uma fonte de matéria orgânica complexa e não caracterizada, principalmente as de fonte natural, como é o caso do húmus e do adubo, fator que pode apresentar diferenças em estudos de resposta de contaminação interlaboratoriais. O esterco produzido por um animal pode variar em composição de acordo com sua alimentação, e variar de um animal para outro. Por outro lado, Gonzalez (2012) discute que o emprego de materiais mais simples como a α -celulose proporciona um melhor rigor de padronização, porém, não interpreta a matéria orgânica natural com grande realismo em termos de complexidade e composição.

Em estudo comparativo de sedimento natural e sedimentos formulados utilizando dois tipos de matéria orgânica (turfa e α -celulose), Fleming *et al.* (1998) variaram a concentração de carbono orgânico e da fração argila, verificando que a toxicidade do poluente estudado diminuía com o aumento da fração argila e da fração de matéria orgânica. Isso implica no aumento da sorção do poluente às partículas orgânicas do sedimento, conforme anteriormente citado.

Besser *et al.* (2003) utilizaram celulose e húmus como matéria orgânica de sedimento formulado, em diferentes proporções de carbono orgânico total (TOC), para a avaliação de toxicidade de metais sobre *Hyalella azteca*, concluindo que o tipo de matéria orgânica e a porção de TOC influenciam significativamente na sorção e complexação dos contaminantes em estudo. Apesar de diversos autores usarem e recomendarem a celulose em testes de toxicidade com sedimentos formulados (Kemble *et al.* 1999; Ribeiro *et al.* 1994; Sawyer e Burton 1994), os autores (Besser

et al. 2003, op. cit.) indicaram que a celulose não foi um material apropriado de matéria orgânica no estudo de diferenças na biodisponibilidade de metais.

Em estudo com invertebrados, Wästlund (1999) mostrou que diferentes tipos e quantidades de matéria orgânica incorporando sedimentos formulados influenciaram na capacidade dos organismos em suprir suas necessidades nutricionais e até em sua sobrevivência. Este autor relatou que o valor nutricional do sedimento artificial se mostrou menor do que do sedimento natural, apesar de utilizar a mesma quantidade da fração de matéria orgânica em ambos os sedimentos. Esse fato, como já esperado, ocorre devido a fatores como a complexidade e composição da matéria orgânica do sedimento natural, além da presença de uma cadeia microbológica, fatores que são de difícil reprodução em sedimento formulado para ensaios padronizados.

Alguns autores (Ribeiro *et al.*, 1994; Stewart e Thompson, 1995) incluíram ácido húmico em suas formulações, o que aumenta a capacidade de sorção dos sedimentos usados com a finalidade de mais se aproximarem de sedimentos naturais. Porém, considerando-se a padronização de sedimento formulado e facilidade de reprodução por diferentes laboratórios, a inclusão de diversas fontes de matéria orgânica pode dificultar ainda mais esse processo, gerando margens de erro se as fontes de matéria orgânica apresentarem composições diferenciadas em diferentes épocas e localidades.

Estes estudos mostraram a importância da escolha da matéria orgânica para a formulação de sedimentos, visto que ela influencia fortemente na sorção de contaminantes e na sua biodisponibilidade a espécies de micro e macroinvertebrados, assim como no grau de realismo para a representação de ambientes naturais.

A USEPA (2000) não apresenta um padrão de matéria orgânica para sedimento, mas considera importante serem observadas suas proporções de carbono, nitrogênio e fósforo, pois a fonte do material escolhido pode variar consideravelmente nestes parâmetros, conforme apresentado na tabela 1.

Na formulação para teste de toxicidade apresentada pela OECD (2010), a recomendação se refere ao uso de turfa em pó, apresentando tamanho de partícula ≤ 1 mm, contanto que possua pH mais próximo de 5,5 a 6,0 e apenas seca ao ar, nas proporções de 4 a 5% do peso seco do sedimento.

2.7.2 Constituintes inorgânicos e granulometria

Em relação à fração inorgânica, muitos trabalhos apresentam procedimentos que utilizam os mesmos materiais. Entretanto, alguns autores incluem um novo constituinte à formulação que, por vezes, pode resultar em variações de teste para teste.

A maioria dos sedimentos formulados são constituídos por areia (em até três tamanhos de partícula), argila (caulim, na maioria dos casos) e alguns apresentam silte na composição. Alguns autores utilizam o silte como ASP® 400 ou ASP® 400P, por exemplo (Besser *et al.* 2003; Suedel e Rodgers, 1994a), contudo, estas variações de produtos ASP® apresentam maior porcentagem de argila do que de silte em sua composição (USEPA, 2000), o que significa que sua adição à formulação está, na verdade, aumentando a proporção de argila.

A argila é um componente que deve ser escolhido com atenção para compor sedimentos formulados, pois diferentes argilas possuem capacidade de adsorção de poluentes diferenciada. Isso é devido, principalmente, à grande área específica e à capacidade de troca de cátions (CTC) que as argilas apresentam, dentre outros fatores, sendo que possuem carga negativa, na maioria das vezes, atraindo moléculas positivas (Eba *et al.*, 2010). Geralmente, sedimentos com pouca quantidade de argila apresentam baixa CTC, o que significa uma menor retenção de poluentes. A área de superfície também influencia na questão da capacidade de troca de cátions, algumas podem apresentar baixa área de superfície e também um baixo CTC. As argilas montmorilonitas e vermiculitas, por exemplo, são conhecidas por sua grande área superficial devido ao seu pequeno tamanho de grão, apresentando de 2,5 a 4,0 μm (Haderlein *et al.* 1996). A exemplo disso, muitos estudos têm reportado o uso de argilas para a remoção de metais na forma iônica em soluções aquosas.

Haderlein *et al.* (1996) discutem que a capacidade de adsorção de compostos aromáticos por argilas cresce na ordem de caulinita < illita < montmorilonita e, dependendo da abundância, as argilas podem controlar a distribuição e biodisponibilidade deste tipo de composto ao compartimento aquático.

Mesmo na ausência de compostos tóxicos, após avaliação de 18 sedimentos formulados para o cultivo de *Caenorhabditis elegans*, Gratzler e Ahlf (2001) mostraram que os minerais de argila, especialmente a caulinita, inibiram o crescimento e a reprodução destes organismos, mostrando que as argilas caulinitas podem exercer grande influência no resultado de estudos de toxicidade em sedimentos. Apesar disso, a argila caulinita está naturalmente presente em diversas bases sedimentares de ambientes aquáticos.

Tendo em vista a representatividade, Suedel e Rodgers (1994a) utilizaram argila montmorilonita devido à sua abundância no território dos Estados Unidos, ocorrendo em grande escala em solos de zonas temperadas. Os autores citam que a argila illita também é comumente encontrada em sedimentos, e recomendam seu uso quando a amostra de sedimento natural apresentar predominância deste mineral de argila.

A variação das porções inorgânicas também pode exercer influência na qualidade do sedimento. Em estudo sobre a resposta de organismos invertebrados à variação do tamanho da partícula de sedimento e conteúdo de matéria orgânica em sedimentos formulados, baseados em sedimentos naturais encontrados nos Estados Unidos, Suedel and Rodgers (1994b) verificaram que, mesmo variando-se a quantidade em 0 a 100% de areia, 0 a 100% de silte e 0 a 60% de argila, a taxa de sobrevivência dos organismos expostos foi maior que 80%, mesmo resultado apresentado para a exposição a sedimentos naturais e não contaminados como controle do teste. Desta forma, os organismos utilizados neste estudo, *Hyalella azteca* e *Chironomus tentans*, se mostraram favoráveis ao uso em experimentos com uma grande gama de variação das quantidades de areia, silte e argila como componentes de sedimento formulado. É importante conhecer a aceitação do organismo-teste a diferenças relacionadas a características físicas e químicas do sedimento, com diferentes tipos de argila, diferentes CTC e fontes de matéria orgânica, pois, como os próprios autores citados afirmaram, pode ocorrer uma resposta não esperada para uma substância utilizada quando, na verdade, o sedimento não é bem aceito pelo organismo, mesmo se utilizado sem contaminante.

A OECD (2010) recomenda o uso de argila caulitina em sedimento formulado, ou preferencialmente argila com conteúdo de caulim acima de 30%. Para a fração

areia, a organização indica areia de quartzo com predominância de mais de 50% de areia fina (entre 50 e 200 μm).

2.7.3 Pré tratamento para os componentes orgânicos e inorgânicos: remoção de possíveis interferentes toxicológicos

Antes que o sedimento propriamente dito seja montado, seus componentes devem ser adequadamente preparados.

Um importante passo no preparo da matéria orgânica é o seu peneiramento. Segundo a OECD (2010), é necessário que a partícula de matéria orgânica possua tamanho ≤ 1 mm para compor o sedimento formulado. Porém, alguns autores (Besser *et al.*, 2003) utilizaram tamanho de partículas de MO de até 2 mm, pois em ambientes naturais pode-se encontrar diversas dimensões para este componente. O tamanho é importante para interação destas partículas com o restante do sedimento, sendo que quanto menor for o tamanho da partícula de matéria orgânica, maior será a interação com o sedimento e com possíveis compostos adicionados.

Os constituintes inorgânicos são usados com o cuidado de não apresentarem material orgânico aderido e, para isso, passam por diferentes tratamentos.

Alguns trabalhos (Fleming *et al.*, 1998; Naylor e Rodrigues, 1995) utilizam areia lavada com ácido para o preparo da formulação. Esse tipo de areia tratada pode ser obtida comercialmente ou também pode ser preparada em laboratório, geralmente utilizando-se HNO_3 (Nia *et al.*, 2011) para a remoção de matéria orgânica. Outros autores (Suedel e Rodgers, 1994a; Fleming *et al.*, 1998) realizam a calcinação da areia, silte e argila, ou apenas da argila, antes do preparo da formulação, a 550 °C por 1 hora em mufla, devido aos altos teores de matéria orgânica nestes componentes in natura. Há ainda trabalhos que descrevem a autoclavagem da areia e argila após a mistura dos componentes, podendo manter estocada indefinidamente se for mantida em local adequado. Oviedo-Gómez *et al.* (2010) descrevem 3 ciclos de autoclavagem para a esterilização do sedimento.

Apesar de alguns autores recomendarem a calcinação da areia e argila, este tratamento em argilas caulinitas a temperaturas entre 450 a 950°C produz um

composto de sílica amorfo denominado metacaulinita, que é um aluminossilicato muito reativo (Liu *et al.* 2001; Kakali *et al.* 2001). Desta forma, argilas que possuem elevado teor de caulim, quando calcinadas para a remoção da matéria orgânica, por exemplo, podem apresentar uma distribuição do tamanho dos poros diferentes e grande superfície específica, influenciando em sua interação com diversos compostos presentes na água e no sedimento.

2.7.4 Condicionamento e melhoramento dos sedimentos formulados

Para que sejam alcançadas condições de equilíbrio em sedimento formulado e melhoramento em representatividade, algumas etapas de preparação são necessárias.

A etapa de homogeneização dos componentes de sedimento formulado consiste em mantê-lo sob agitação, geralmente por 4 horas (Nia *et al.*, 2011), na presença da água nas condições para o trabalho. Este é um passo importante para uma melhor interação dos componentes da formulação.

Antes do uso do sedimento formulado em um teste de comportamento de poluentes ou de toxicidade, é necessário que alguns parâmetros como pH, condutividade, OD e redox, sejam estabilizados. Para isso, leva-se em conta o tempo de condicionamento, período necessário para que se inicie o processo de degradação da matéria orgânica e estabilização dos parâmetros citados. Em geral, o sedimento fica estocado no escuro, após adição de água e agitação, durante 7 dias (Fleming *et al.*, 1998) ou mais.

Verrhiest *et al.* (2002), relataram que os parâmetros físico-químicos e biológicos dos sedimentos formulados por eles apresentaram importantes mudanças nos primeiros 10 a 15 dias de condicionamento, o que demonstra relevância em iniciar um teste de toxicidade em sedimento após um período de condicionamento de ao menos 10 dias, período em que ocorrem processos fundamentais para a simulação de ecossistemas naturais. Porém, esse processo pode dificultar grandemente a montagem e manutenção de um experimento com troca de soluções regulares.

Um passo diferente é recomendado pela OECD (2010), em que apenas a matéria orgânica (húmus) com água deionizada deve ser condicionada por pelo menos dois dias, sob leve agitação, para que se estabeleça e se estabilize a presença microbiológica. Apenas após este passo os outros constituintes (areia e argila) são acrescentados e espera-se o tempo de condicionamento de 7 dias para que o sedimento possa ser utilizado para teste com organismos.

Nos estudos apresentados, foi observado que iniciar um teste de toxicidade com sedimento formulado é recomendável quando for antes condicionado por um período de, ao menos, 7 dias. No geral, não foi observada uma grande atividade microbiológica nas condições do sedimento formulado, mas a matéria orgânica começa a se degradar neste período, o que é um processo de fundamental importância em um ecossistema natural.

Nem todos os autores descrevem com detalhe as etapas de preparo da formulação, sendo que alguns apenas citam o material utilizado. Mas a razão mais frequente pela qual autores modificam o sedimento original se baseia em avaliar a influência das características alteradas por alguma razão, seja para avaliação de toxicidade, capacidade de particionamento do sedimento, bioacumulação, etc. É mais ou menos comum, por exemplo, a adição de outros materiais a sedimentos já padronizados, como fontes de matéria orgânica diferentes, nutrientes ou minerais, como forma de representar melhor um dado sedimento natural coletado, ou para testar suas propriedades com as novas características e propor novas formulações como padrão (Harrahy e Clements, 1997; Kemble *et al.*, 1999; Verrhiest *et al.*, 2002; Besser *et al.*, 2003).

2.8 Sedimentos formulados como controle para testes de toxicidade

Em grande parte dos estudos revisados, os sedimentos formulados são utilizados como sedimentos-controle para a avaliação do comportamento de determinadas substâncias, ou para comparação de características e respostas com sedimentos naturais (por exemplo, Holmes *et al.* 2008; Phillips *et al.* 2006; Zielke *et al.* 2011). Sedimentos controle são úteis em estudos de comparação

interlaboratoriais, como o realizado por Norberg-King *et al.* (2006), em que utilizaram controle e sedimento contaminado para avaliar toxicidade em 2 invertebrados aquáticos. O Apêndice A apresenta uma relação de trabalhos realizados a partir da década de 1990, em que se utilizaram sedimentos formulados como controle e também como teste de representatividade de ambiente natural em experimentos.

Alguns autores como Wang *et al.* (2011) utilizaram sedimento formulado como um produto simples e efetivo no estudo do comportamento de poluentes aquáticos, já que os sedimentos artificiais permitem mais elevado controle e caracterização de seus componentes. Já os autores Kemble *et al.* (1999) descreveram uma formulação para ser usada como controle em testes de toxicidade de sedimento, considerando a adaptação pelos organismos-teste, a composição dos materiais disponíveis comercialmente e o fato de apresentarem concentração de contaminantes insignificante. Neste caso, a representatividade em termos de composição do sedimento não foi o foco de estudo, porém os autores (Kemble *et al.* 1999, op. cit.) concluíram que os organismos toleraram positivamente o sedimento formulado no período de exposição, assim como no controle de sedimento natural coletado. Os organismos testados foram mais tolerantes ao sedimento formulado em 10 dias de teste do que os organismos expostos ao sedimento natural coletado ($\geq 90\%$ de sobrevivência e crescimento dos organismos similar para ambos os tratamentos).

Cantwell *et al.* (2008) utilizaram sedimento formulado com uma finalidade diferente, sendo de propriedades físicas e químicas já conhecidas, para estudar a ocorrência de diversos metais durante a ressuspensão do sedimento de forma controlada. Foi utilizado o sedimento variando-se as quantidades de TOC e distribuição do tamanho dos grãos.

A formulação recomendada pela OECD (2010) segue as formulações usadas por Suedel e Rodgers (1994a) e Naylor e Rodrigues (1995), sendo composta por (porcentagens em peso seco): 4-5% de turfa em pó (partículas ≤ 1 mm); 20% de argila caulinita; 75-76% de areia quartzo (com predomínio de mais de 50% de areia fina). Esta organização descreve que, após a agitação desta mistura, adiciona-se água deionizada e o pH é ajustado para $7,0 \pm 0,5$ com a adição de carbonato de cálcio (CaCO_3). O objetivo é a utilização como sedimento-controle no estudo de toxicidade sobre organismo aquático, já que esta formulação foi testada por diversos autores e é bem conhecida.

A formulação recomendada pelo guia 218 da OECD foi utilizada por Zielke *et al.* (2011) com algumas alterações, com a redução do conteúdo de caulim de 20 para 5%, repostado por conteúdo de areia. Neste trabalho, os autores utilizaram o sedimento formulado como controle do teste com sedimento natural contaminado com uma mistura de seis poluentes orgânicos, para a eliminação de quaisquer efeitos *background*. Porém, os autores não justificam a modificação realizada na formulação, sendo que o sedimento natural continha 23,4% de argila, e desta forma seu controle apresentou quantidade reduzida deste componente.

Naylor e Rodrigues (1995) afirmaram que o sedimento formulado utilizado em seu estudo não teve como objetivo simular um determinado ambiente natural, e sim desenvolver uma formulação simples para avaliar a adaptação dos organismos em relação ao tamanho e sobrevivência. Entretanto, Suedel e Rodgers (1994a) demonstraram que é possível incrementar a complexidade das formulações e simular sedimentos naturais de acordo com parâmetros químicos e físicos.

As principais características que devem ser consideradas ao se formular um sedimento, segundo a USEPA (2000), são as porcentagens de areia, de argila, de silte, conteúdo de matéria orgânica, CEC, potencial de redução e oxidação (redox), pH, e as taxas de carbono:nitrogênio:fósforo.

2.9 Sedimentos formulados e representatividade de ambientes naturais

Das diversas pesquisas realizadas com a utilização de sedimentos formulados, são poucas as que pretenderam simular o sedimento de determinada região, em termos de composição e proporção de materiais. Na maioria dos casos, seguem-se os protocolos de sedimento já padronizados, a exemplo da OECD e USEPA.

Gonzalez (2012) relatou em seu estudo que, anteriormente à década de 1990, alguns artigos reportaram o uso de material substituto de substrato sedimentar, mas nenhum teve o objetivo de criar um sedimento artificial realístico neste período.

Fleming *et al.* (1998) afirmaram que uma única formulação de sedimento seria incapaz de atingir todos os requerimentos possíveis para ser aplicada a uma gama

de tipos de sedimento. O sedimento nativo pode ser melhor representado quando os componentes do sedimento são ajustados e, dessa forma, é inviável a utilização de apenas uma formulação que seja aplicável a todos objetivos de quaisquer estudos. Assim, deve-se dar especial atenção para melhorar o realismo de formulações simples artificiais quando a intenção é representar efeitos medidos em sedimentos naturais. Os autores acima citados sugerem, como forma de melhorar o realismo da representação de sedimento formulado, incluir diversas variedades de matéria orgânica ao sedimento.

Para isso, existem trabalhos publicados que examinam as condições dos sedimentos formulados utilizando frações diferentes dos componentes inorgânicos e orgânicos, tipos diferentes de matéria orgânica, entre outras otimizações (Suedel e Rodgers, 1994b; Fleming *et al.*, 1998; Wästlund, 1999; Ribeiro *et al.*, 1994; Stewart e Thompson, 1995; Kemble *et al.*, 1999; Gratzer e Ahlf, 2001; Naylor e Rodrigues, 1995; Franzen *et al.*, 2012). Isso é importante no momento de se criar uma nova formulação, levando-se em conta características e respostas já estudadas para as variações impostas aos sedimentos.

Suedel e Rodgers (1994a) estudaram a formulação de sedimento como referência para uso em testes que simulam ambientes de água doce e estuários, representativos de uma gama de ambientes dos Estados Unidos, levando-se em conta a representatividade química e física de sedimento natural (distribuição por tamanho de partícula, matéria orgânica, carbono orgânico, pH, sólidos e capacidade de troca de cátion), sua adequação como um habitat (sobrevivência e reprodução de organismos) e como substrato para os invertebrados mais comumente utilizados em testes toxicológicos. Como pode ser observado, a formulação recomendada pelos autores acima citados foi bem aceita no meio acadêmico e é bastante utilizada e recomendada por órgãos de proteção ambiental, tendo sido formada através de estudos consistentes envolvendo organismos e diversos parâmetros visando a maior aproximação possível de um ambiente natural. Contudo, esta formulação foi baseada em ambientes lóticos e lênticos da América do Norte, e vem sendo aplicada em estudos de toxicidade do mundo todo.

Neste caso, quando o objetivo de estudo é simular os efeitos de um contaminante em um ambiente diferente, cuja composição e condições físico-químicas se distanciem muito deste padrão, é importante considerar um ajuste nos

constituintes do sedimento formulado, com a intenção de aproximar mais fielmente a resposta para o ambiente a que se refere o estudo, em termos de matéria orgânica, distribuição de diferentes partículas inorgânicas, etc. Assim, é importante conhecer as respostas diferentes que a variação destes parâmetros podem causar sobre a sobrevivência e crescimento de organismos-teste (Naylor e Rodrigues, 1995).

Gonzalez (2012) afirma que a maioria das formulações de sedimentos descritas na literatura não têm base em ambientes reais, ou seja, há falta de formulações representativas de ambientes naturais. O estudo publicado por Walsh *et al.* (1991) é um dos trabalhos mais antigos encontrados em que foi utilizado sedimento formulado simulando ambiente natural para uso em teste ecotoxicológico, com o objetivo de simular as mesmas características de sedimento coletado em rio na Flórida para teste de toxicidade de efluentes em um pântano de água doce, levando-se em conta a proximidade dos parâmetros granulometria, conteúdo de matéria orgânica, potencial redox, CTC e pH. O Apêndice A mostra uma revisão de trabalhos científicos que utilizaram sedimento formulado, assim como seus respectivos propósitos.

Observa-se que, mesmo para os trabalhos que utilizam o sedimento como controle, ocorrem variações de um trabalho para outro, tanto em termos de material utilizado quanto de quantidades, não havendo um padrão para a utilização dos componentes do sedimento formulado. Alguns autores não chegam a mencionar as proporções para a montagem do sedimento, apenas os componentes ou remetem a uma formulação feita por outros autores.

Os organismos utilizados em testes de toxicidade ou de adaptação a novos sedimentos formulados são tipicamente os mesmos (*Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, *Chironomus riparius*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Lumbriculus variegatus*, *Caenorhabditis elegans* e até mesmo *Danio rerio* (embriões), em testes de disponibilização de contaminantes à coluna d'água. Desta forma, não se utilizam necessariamente organismos representantes deste compartimento aquático, podendo-se variar as espécies de acordo com o objetivo do estudo, sendo elas bentônicas ou nectônicas.

Harrahy e Clements (1997) recomendam que sejam feitos estudos que comparem a toxicidade e bioacumulação de contaminantes em sedimentos naturais e sintéticos, antes que o uso do sedimento formulado seja amplamente adotado.

Isso permite uma melhor aproximação da formulação ao ambiente natural de referência e garante que a resposta dada pelo teste utilizando sedimento formulado seja mais confiável. Esta é uma importante observação, sendo que após confirmado o grau de representatividade, o sedimento formulado pode ser facilmente reproduzido por diferentes laboratórios.

2.9.1 Recomendações para uso de sedimentos formulados

Conforme observado por Golzalez (2012), o desenvolvimento de sedimentos formulados está lento e deficiente em precisão e realismo, pois praticamente a metade dos estudos revisados pelo autor relacionados a sedimento sintético relataram a falta de formulações existentes e representativas de determinados locais, e poucos estudos propuseram uma nova formulação. Pode ser observado que a década de 1990 foi a mais produtiva em termos de criação de sedimentos formulados, suas características e respostas a diferentes tratamentos. Dessa maneira, os trabalhos mais recentes tenderam a utilizar as formulações já existentes ou apenas propor pequenas modificações, aplicando um padrão de formulação a testes mais avançados sem muita preocupação acerca da representatividade.

Além disso, observando-se os dados disponíveis no Apêndice A, nota-se que a maioria dos trabalhos encontrados que realizaram “*spiking sediment*” utilizam principalmente metais (Cd e Cu na maioria dos casos). Compostos metálicos são poluentes típicos e que compõem diversos guias padronizados, com limites que asseguram a proteção da vida aquática e o consumo humano. Contudo, nota-se que são escassos os estudos que utilizam sedimentos formulados para o estudo de comportamento de contaminantes emergentes, ou o famoso termo *contaminants of emerging concern* (CECs), os quais são encontrados com grande frequência em corpos de água continentais e para os quais há falta de limites em legislação do mundo todo (OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup, 2008). Estes compostos incluem produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, e estão sendo cada vez mais detectados em águas superficiais a baixas concentrações, gerando uma preocupação sobre o impacto que podem causar à vida aquática. Com isso, torna-se

de grande importância a avaliação dos potenciais impactos causados pelos CECs sobre organismos aquáticos para que seja possível determinar níveis aceitáveis à proteção da vida aquática.

A maioria dos CECs não possuem normas de regulamentação e são compostos recentemente detectados em corpos d'água, muitas vezes devido ao melhoramento dos métodos de detecção da química analítica (Bell *et al.*, 2011), e podem causar efeitos deletérios à vida aquática mesmo a baixas concentrações. Os CECs que agem como IE podem ser lançados diretamente ao ambiente após passarem por processo de tratamento de esgoto, os quais tipicamente não foram projetados para a remoção destes poluentes do efluente (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Grund *et al.*, 2011), o que torna mais grave esta problemática.

Uma grande variedade de IE existe hoje e a alteração que eles causam à biota aquática ainda é uma larga área de estudo (Rogers *et al.* 2013). Até o momento, poucos estudos investigaram os efeitos de fármacos em invertebrados bentônicos, e sua interação com sedimentos contaminados com estas substâncias não vem sendo muito consideradas (Gilroy *et al.*, 2012). Apesar disso, os CECs que atuam como IE foram colocados entre os tópicos que mais crescerão em importância até o ano de 2025 em trabalho realizado sobre as ameaças ao ambientes aquáticos por Brönmark e Hansson (2002). A presença de pequenas concentrações de CECs vem sendo associada a toxicidade crônica, disrupção endócrina e desenvolvimento de resistência patogênica (Rosal *et al.*, 2010), sendo encontrados a concentrações de nanograma por litro (ng/L) a micrograma por litro ($\mu\text{g/L}$) (Bell *et al.*, 2011). Como exemplo, concentrações muito baixas na ordem de 0,1 a 10 ng/L dos estrogênios 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol podem induzir alterações no sistema endócrino de organismos aquáticos (Petrovic *et al.* 2001).

O problema mostra-se mais grave nos países em desenvolvimento, onde muitas vezes a legislação ambiental é deficiente e não se contemplam substâncias com potencial de alteração endócrina. Além disso, a falta de infra-estrutura de saneamento básico existente nesses países agrava esse cenário (Machado, 2010). Como consequência de seu potencial desregulador endócrino, foram selecionados os estrógenos E2 e EE2 para uma rápida busca de dados na literatura acerca de suas máximas concentrações encontradas em sedimentos de rios em alguns países (tabela 5).

Tabela 5: Máximas concentrações de E2 e EE2 encontrados em sedimento ($\mu\text{g}/\text{kg}$) observados na literatura

| País | E2 | EE2 | Fonte |
|-------------|--------|-------|---|
| Brasil | 137,91 | 35,60 | Machado, 2010 |
| Espanha | ND | 22,82 | de Alda e Barceló, 2001; Petrovic <i>et al.</i> , 2001 |
| Austrália | 2,48 | 0,50 | Braga <i>et al.</i> , 2005 |
| Reino Unido | 1,2 | ND | Labadie e Hill, 2007 |
| China | 2,6 | ND | Gong <i>et al.</i> , 2011 |

ND: Não detectado

Apesar de os autores usarem métodos analíticos de quantificação diferentes, aparentemente, maiores concentrações destes IE estrógenos são encontradas em países industrialmente menos desenvolvidos, provavelmente devido à presença de poucas estações de tratamento de esgoto (segundo dados do IBGE (2008), apenas 44% dos domicílios do País tinham acesso à rede de esgoto em 2008, e somente 55,2% dos municípios brasileiros possuíam serviço de rede de esgoto, sendo que a coleta não implica que o esgoto sofrerá algum tipo de tratamento, visto que apenas 28,5% dos municípios brasileiros realizaram seu tratamento), como também devido à falta de limites em legislação ambiental vigente, além da presença de indústrias que se aproveitam da ausência de normas regulamentadoras para estes compostos, realizando o despejo de efluentes de forma indiscriminada.

Diversos trabalhos reportaram o potencial de toxicidade de sedimentos de ambientes naturais contaminados com IE, em especial, na Ásia e Europa (Kim *et al.*, 2014; Creusot *et al.*, 2013; Higley *et al.*, 2012), o que demonstra a atenção que deve ser tomada para a estudos que tratem sobre o comportamento destas substâncias neste compartimento aquático, as quais, além de apresentarem risco à saúde aquática, implicam em uma questão de saúde pública.

De acordo com OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup (2008), muitos destes poluentes ainda não foram incluídos até o presente na rotina de monitoramento das principais agências ambientais, mas vêm sendo estudados para uma futura regulamentação dependendo do grau de toxicidade, potenciais efeitos na saúde, percepção pública e frequência que ocorre no meio ambiente. Poucas diretrizes foram encontradas acerca destes contaminantes, a exemplo da *European Water Framework Directive* (WFD), um tratado de legislação internacional sobre gerenciamento, prevenção e proteção da água, a qual inclui em sua lista muitos

poluentes orgânicos como contaminantes emergentes, inclusive interferentes endócrinos como hormônios, devido à sua presença em ambientes aquáticos, sua ameaça sobre fontes de água potável e devido à preocupação que causam em relação aos efeitos estrogênicos (Iparraguirre et al., 2011).

Alguns comportamentos destas substâncias em meio aquático foram reportadas por Lai *et al.* (2000), sugerindo que estrógenos dissolvidos podem rapidamente se tornar adsorvidos aos sólidos em suspensão, o que indica que a competição pelos sítios de ligação com outros compostos mais hidrofóbicos e a respectiva saturação destes sítios são os responsáveis pela proporção de estrógenos que permanecem na fase aquosa. Além disso, muitos IE podem persistir no sedimento por longos períodos de tempo, podendo ser transportados para outras regiões e, eventualmente, ser liberados através da ressuspensão do sedimento em cursos de água agitados (Petrovic *et al.*, 2001). Holthaus *et al.* (2002) atentam para o fato de que os organismos bentônicos podem estar expostos a concentrações maiores do que organismos da coluna de água, dependendo da biodisponibilidade e também das características do sedimento e do ambiente. Isso também é devido à sua natureza hidrofóbica e baixa volatilidade, então o processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator significativo na redução dos estrógenos na fase aquosa (Filho, 2008; Gong *et al.*, 2011). Por esse motivo, o sedimento age como uma potencial fonte secundária de contaminação de IE em sistemas aquáticos através, principalmente, da ressuspensão de partículas (Petrovic *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2011).

Entretanto, são necessárias investigações mais detalhadas para se entender a dinâmica de distribuição de IE, em especial de hormônios estrógenos, nos diversos ambientes em que são inseridos. Poucos estudos até agora foram realizados em relação ao potencial de sorção e biodegradação e outros comportamentos destes IE (Holthaus *et al.*, 2002) e há urgência de mais informações sobre os impactos causados para serem estabelecidos padrões de qualidade ambiental (Petrovic *et al.*, 2001).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Desenvolver formulações de sedimento com composição compatível às condições detectadas em corpos de água brasileiros, de modo que sejam aplicáveis a estudos ecotoxicológicos, enfatizando-se o comportamento químico e biológico dos poluentes estrógenos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em concentrações representativas do Estado de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Formular sedimentos representativos do Sistema Tietê, um importante sistema hídrico brasileiro que se inicia no Estado de São Paulo e termina no Paraná, considerando-se sua constituição orgânica e inorgânica e viabilidade para aplicação em estudos ecotoxicológicos (espécies *Hyalella azteca* e *Ceriodaphnia dubia*);
- 2) Avaliar parâmetros físico-químicos do sedimento formulado (água intersticial): pH, OD, dureza, taxas de N:P, carbono orgânico total e conteúdo de metais;
- 3) Avaliar o comportamento químico dos hormônios E2 e EE2 nos sedimentos formulados, determinando-se o tempo de degradação desses contaminantes nas condições utilizadas para os testes toxicológicos, assim como sua capacidade de retenção, através de análises por cromatografia gasosa (GC-MS);
- 4) Avaliar a toxicidade causada pelos contaminantes em água intersticial à *Ceriodaphnia dubia* para as gerações parental (P) e filhotes (F1);

- 5) Diagnosticar a contribuição toxicológica dos referidos hormônios presentes no sedimento para a coluna de água (*botton up*) e na coluna de água para o sedimento (*top down*), utilizando-se o organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*.

4. METODOLOGIA

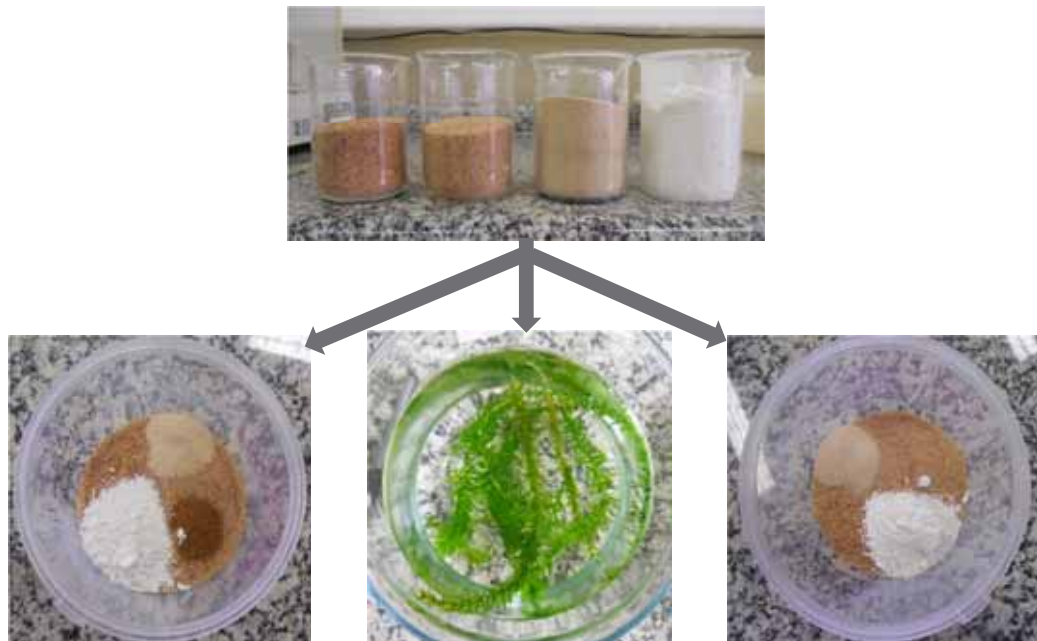
4.1 Formulação de sedimentos para uso em testes ecotoxicológicos

4.1.1 Análises físicas e químicas das formulações para uso em ensaios ecotoxicológicos

As formulações testadas basearam-se nos resultados obtidos por Fracácio (2001), que analisaram a constituição granulométrica, porcentagem de matéria orgânica e toxicidade de sedimentos coletados em 14 pontos do sistema Tietê em 4 períodos de amostragem. O Rio Tietê é um importante sistema aquático que sofre diferentes influências antrópicas e destina-se a múltiplos usos. Considerando-se a sua extensa área, desde o Estado de São Paulo até desaguar no Sistema Paraná, e por apresentar uma geologia diversificada, foi escolhido para embasar as formulações do presente estudo.

Foram testadas cinco diferentes composições de sedimentos contendo proporções variadas de areias grossa, média e fina (doadas pela empresa mineração Jundu, Analândia-SP) e argila caulinita esterilizada (obtida comercialmente da marca Synth®), ilustradas pela figura 1, representando as frações inorgânicas, que totalizaram 100 g considerando-se cada formulação. As frações granulométricas seguiram a classificação da ABNT NBR 6502 (1995), a mesma utilizada por Fracácio (2001). Esses materiais foram previamente calcinados em forno mufla a 550°C por 1 hora.

Figura 1: Componentes do sedimento formulado: areias grossa, média e fina e mineral de argila caulinita (da esquerda para a direita) e formulações utilizando ração, *Elodea sp.* e controle sem MO (abaixo)



Fonte: arquivo pessoal

Nas mesmas formulações acima descritas foram acrescentadas diferentes porcentagens de dois tipos de matéria orgânica: macrófita aquática *Elódea sp.*, cultivada no Laboratório de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Sorocaba-SP, mantida em estufa a 40°C por 24h, triturada em aparelho mixer e peneirada para obtenção de partículas de 1mm ou menores para maior interatividade com os sedimentos (OECD, 2010), e ração de peixe (TetraMin®, com 47% de proteína bruta) macerada em cadinho com pistão de porcelana e peneirada em telas com abertura de malha de 1 mm. A matéria orgânica variou entre 1% a 20%, considerando-se as cinco formulações (Tabela 6). O Anexo A apresenta a composição da ração comercial TetraMin®.

Tabela 6: Frações orgânicas e inorgânicas utilizadas para a formulação dos sedimentos (baseadas nos reservatórios do médio e baixo e Tietê e Rio Piracicaba) à proporção de sedimento formulado:água reconstituída 1:4 (g:mL)

| Ambiente de referência (Fracácio, 2001) | Formulação | Fração inorgânica (%) | | | | Conteúdo de matéria orgânica | |
|--|------------|-----------------------|----|----|----|------------------------------|----------------------|
| | | AG | AM | AF | A | | |
| Rio Piracicaba | 1 | Controle | - | - | 25 | 75 | NA |
| | | A | - | - | 25 | 75 | 20% <i>Elódea sp</i> |
| | | B | - | - | 25 | 75 | 20% Ração |
| Reservatório Barra Bonita | 2 | Controle | - | 40 | 50 | 10 | NA |
| | | A | - | 40 | 50 | 10 | 15% <i>Elódea sp</i> |
| | | B | - | 40 | 50 | 10 | 15% Ração |
| Reservatório Nova Avanhandava | 3 | Controle | 90 | - | - | 10 | NA |
| | | A | 90 | - | - | 10 | 5% <i>Elódea sp</i> |
| | | B | 90 | - | - | 10 | 5% Ração |
| Reservatório Três Irmãos | 4 | Controle | 40 | 40 | 10 | 10 | NA |
| | | A | 40 | 40 | 10 | 10 | 1% Ração |
| | | B | 40 | 40 | 10 | 10 | 3% Ração |
| | | C | 40 | 40 | 10 | 10 | 1% <i>Elódea sp</i> |
| | | D | 40 | 40 | 10 | 10 | 3% <i>Elódea sp</i> |
| Reservatório Três Irmãos | 5 | Controle | 10 | 10 | 70 | 10 | NA |
| | | A | 10 | 10 | 70 | 10 | 1% Ração |
| | | B | 10 | 10 | 70 | 10 | 3% Ração |
| | | C | 10 | 10 | 70 | 10 | 1% <i>Elódea sp</i> |
| | | D | 10 | 10 | 70 | 10 | 3% <i>Elódea sp</i> |

AG: Areia grossa; AM: Areia média; AF: Areia fina; A: Argila.

NA: Não aplicável.

Após as misturas das proporções secas (constituintes orgânicos e inorgânicos), adicionou-se água reconstituída na proporção de 1:4 (g:mL). A água reconstituída utilizada foi a recomendada para o cultivo de *Hyalella azteza* (organismo-teste representativo de sedimentos, ilustrado pela figura 2), preparada a partir de água de torneira filtrada e desclorada, ajustando-se os parâmetros pH, dureza e oxigênio dissolvido (OD) para as faixas de valores entre 7,2 e 7,6; 40 e 48 mg CaCO₃/L e acima de 4 mg/L, respectivamente (EPA, 2000; ABNT NBR 15470, 2007). Essas variáveis foram monitorados diariamente durante 15 dias sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo, utilizando-se dos aparelhos da marca Digimed, pHmetro modelo DM-22 e oxímetro DM-4P, e o método de titulação com EDTA utilizado para a determinação da dureza (disponível no Apêndice G). Uma aeração branda superficial foi mantida no experimento, sendo três réplicas de cada formulação.

Figura 2: Organismo-teste *Hyalella azteca* (anfípoda)



Fonte: ABRAPOA, 2005

Os parâmetros químicos das formulações foram comparados aos mesmos parâmetros obtidos nos controles por meio de análise estatística de variância Kruskal-Wallis através do *software* BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007).

4.1.2 Aplicação das formulações em testes de toxicidade com o organismo bentônico *Hyalella azteca*: análise de sobrevivência, crescimento e reprodução

A determinação da granulometria do sedimento se faz necessária uma vez que esse fator apresenta influência na partição de nutrientes e de contaminantes (USEPA, 2000). Dentre as cinco formulações testadas, as de número 4 e 5 (tabela 5) foram as escolhidas para a avaliação da aplicabilidade dos protocolos em ensaios ecotoxicológicos. Essas formulações apresentaram as condições físicas e químicas adequadas às condições fisiológicas dos organismos-teste, exigidas por normas nacionais e internacionais. Os estudos ecotoxicológicos foram realizados com o organismo-teste *Hyalella azteca*, cultivado no Laboratório de Biologia da UNESP Sorocaba-SP, em incubadoras com controle de temperatura e fotoperíodo (marca Tecnal modelo EX80), seguindo-se as recomendações da ABNT NBR 15470 (2007) e USEPA (2000) para averiguação dos parâmetros crescimento e reprodução, respectivamente.

Crescimento

Para cada formulação-teste e controle experimental (tabela 3), foram montadas 10 réplicas com 1 organismo em cada, com idade entre 7 e 14 dias, colocados após um período de estabilização de 5 dias. O controle foi constituído apenas de fração inorgânica. Os experimentos mantiveram a proporção de 10g de sedimento e 40 mL de água reconstituída de cultivo, montados em recipientes de vidro com capacidade para 50 mL. A duração do experimento foi de dez dias, em regime semi-estático, com troca de água a cada 3 dias, datas em que os parâmetros pH, dureza e oxigênio dissolvido foram avaliados. O ambiente de desenvolvimento experimental foram incubadoras com controle de temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12h claro :12h escuro) e intensidade luminosa (500 a 600 lux).

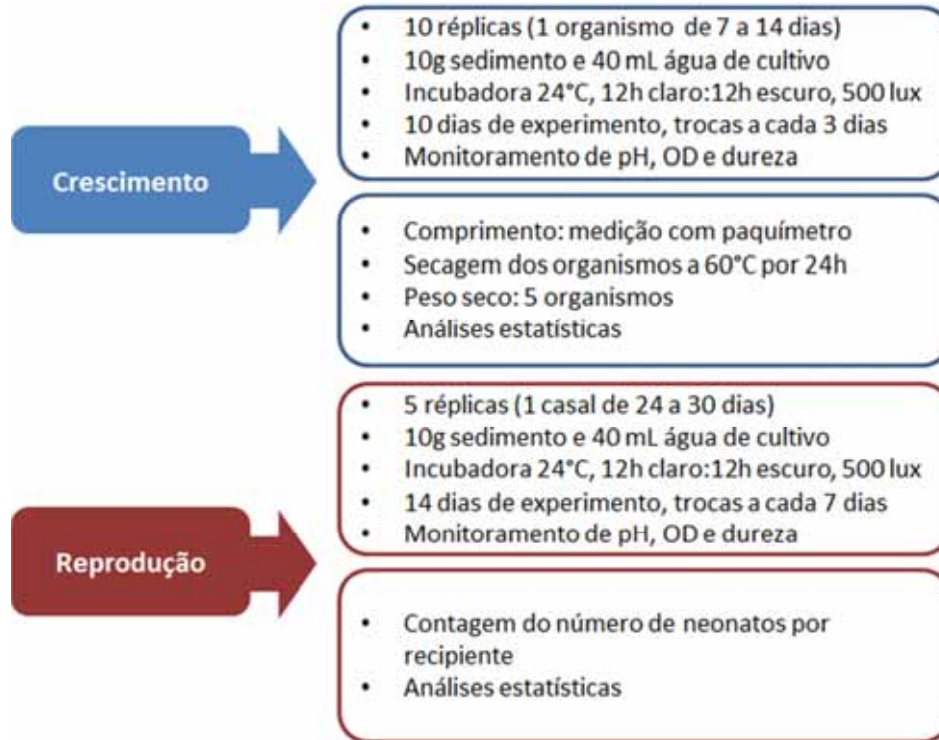
Após o período experimental, os organismos-teste foram avaliados biometricamente para obtenção do peso seco e comprimento, utilizando-se balança analítica Shimadzu® AY220 (após permanência de 24 horas dos organismos em estufa a 60°C), e paquímetro de metal (marca Mitutoyo), respectivamente. Foi aplicada a análise de variância Kruskal-Wallis por meio do programa estatístico BioEstat 5.3 para atestar se houve diferença significativa entre as medidas obtidas nos diferentes tratamentos experimentais e controles. Para o peso foi aplicado o teste Exato de Fisher, uma vez que os dados foram obtidos em função de uma média de 5 organismos de cada tratamento, e não individualmente (Ayres *et al.* 2007).

Reprodução

Organismos adultos (entre 24 e 30 dias de idade) foram selecionados para a montagem de casais onde permaneceram por 14 dias em recipientes-teste contendo as mesmas formulações, controles e condições ambientais acima descritas. O número de réplicas foi de 5 para cada experimento. A cada sete dias os adultos foram removidos para novos sistemas-teste com as condições correspondentes e os números de filhotes foram contados. Posteriormente, esses dados foram comparados estatisticamente aos obtidos nos controles, por meio de análise de variância Kruskal-Wallis, utilizando-se o software BioEstat 5.3 (Ayres *et al.* 2000).

A figura 3 ilustra o desenho experimental da análise de crescimento e reprodução de *H. azteca*.

Figura 3: Esquema ilustrativo do experimento para análise de crescimento e reprodução de *H. azteca* em meio às formulações de sedimento 4 e 5



Fonte: autoria própria

4.2 Viabilidade química e ecotoxicológica de diferentes minerais de argilas esmectitas para a composição de sedimento formulado como alternativa ao mineral de argila caulinita

Optou-se pela avaliação de outros tipos de argila que não fosse o caulim, devido à sua grande facilidade de ressuspensão na água, o que atrapalhou na identificação e contagem de organismos em estudos prévios com sedimentos contaminados. Foi, então, verificada a possibilidade de aplicação de outro tipo de argila em sedimentos formulados, sem que interferissem nos resultados relativos à toxicidade para os organismos-teste.

Os minerais de argila esmectitas podem ser encontrados em diferentes regiões, representando um mineral filossilicato típico encontrado em sedimentos como em todas as regiões dos Estados Unidos (Weaver, 1989; Suedel *et al.*, 1996). Devido à maior facilidade de obtenção comercial deste tipo de mineral de argila nas formas seca e em pó (requeridas para a utilização em sedimentos formulados), foi proposta a sua aplicação para compor sedimento formulado.

Para isso, foram verificados sete tipos de argila seca e em pó obtidos comercialmente para fins estéticos como esmectitas coloridas (BiCosméticos Ltda., Sorocaba-SP), sem adição de produtos químicos, em relação ao tempo para estabilização do pH, oxigênio dissolvido e análise de metais presentes na água intersticial e metais biodisponíveis, para comparação com dados de toxicidade destes metais à espécie *Hyalella azteca*. Este estudo se fez necessário devido à possível presença de impurezas nestes minerais que pudessem ser responsáveis pela sua forte coloração, causando toxicidade aos organismos expostos. As origens dos minerais de argila, segundo o fornecedor, são: Araucária-PR (branca) e Rio do Rastro-SC (rosa, preta, verde, cinza, amarela e vermelha).

Foram utilizados em réplica 10 g de cada tipo de argila, 1g de material orgânica (*Elódea* sp. Seca, triturada e peneirada em abertura ≤ 1 mm) e 400 mL de água reconstituída nas condições de 44 mg CaCO_3/L de dureza, pH a 7,89 e oxigênio dissolvido (OD) 9,40 mg/L, todos em recipientes de plástico. O controle foi montado apenas com 1 g de matéria orgânica e água, sem adição de argila.

Os recipientes foram mantidos em incubadora com regulagem de fotoperíodo para 16h luz:8h escuro a aproximadamente 800 lux, $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ e leve aeração, conforme ilustrado na figura 4. Os parâmetros OD e pH foram medidos a cada 2 dias por 15 dias. Após este período, foi coletada água superficial com uma pipeta, com cuidado para não haver ressuspensão do material ao fundo e o material foi acidificado para preservação dos metais (à concentração de 0,1 mL de HNO_3 10% para cada mL de amostra). A água intersticial foi coletada através de centrifugação do material ao fundo do recipiente, tendo sido filtrada e igualmente acidificada.

Figura 4: Montagem do experimento com argilas esmectitas



Fonte: arquivo pessoal

A determinação de metais biodisponíveis foi feita através de uma leve digestão ácida das argilas, utilizando-se o método descrito em Silvério (1999), a qual consistiu em pesar 1 g de sedimento, transferi-lo a um erlenmeyer e adicionar 25 mL de ácido clorídrico à concentração 0,1 N. Esta mistura foi levada à mesa agitadora a 200 rpm, onde permaneceu por 2 horas. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com abertura de poros de 0,45 μm e a amostra foi diluída em balão volumétrico de 100 mL, onde foi preenchida com água Milli-Q para este volume.

Além disso, cada tipo de argila seca e *in natura* utilizada no teste foi submetida à digestão ácida forte, descrita em USEPA (1996), para a determinação do conteúdo dos metais. A metodologia consistiu em pesar 1 g de cada argila seca e *in natura*, disponibilizando cada uma em um béquer. Foram adicionados a cada amostra 10 mL de solução de HNO_3 1:1 (v/v). Os recipientes foram cobertos com vidro relógio e levados à mesa aquecedora a $95^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ por 10 minutos e, assim que resfriaram, foram adicionados mais 5 mL de HNO_3 concentrado. O sistema se manteve em refluxo por 30 minutos. Após isso, o sistema coberto com os vidros relógio voltou ao aquecimento a $95^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ por 2 horas ou até que atingisse um volume de 5 mL, sem a formação de fervura. Após resfriamento das amostras, foram adicionados 2 mL de água pura e 3 mL de H_2O_2 (30%). As amostras foram cobertas e novamente levadas ao aquecimento até que cessasse a efervescência e, assim,

foram resfriadas. Novamente foi adicionado H_2O_2 (30%) em alíquotas de 1 mL até que a efervescência não fosse aparente. As amostras foram cobertas e aquecidas a $95\text{ }^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ até a redução do volume a cerca de 5 mL, levando-se em torno de 2 horas. Foram adicionados 10 mL de HCl concentrado a cada amostra, as quais foram cobertas e levadas ao aquecimento por 15 minutos a $95^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$. Ao final, após resfriadas, as amostras digeridas foram filtradas em filtros Whatman n° 41 e avolumadas em balão volumétrico para 100 mL com água deionizada pura (marca Synergy® UV, resistividade máxima de 18,2 M Ω .cm a 25° C). Todo o procedimento descrito foi também realizado em réplica para o controle, sem o conteúdo de argila.

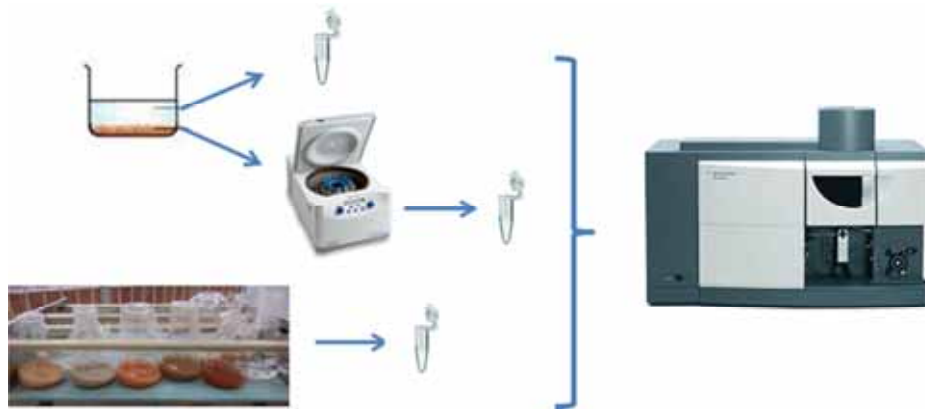
A determinação do conteúdo dos metais Al, Fe, Cd, Co, Cr, Cu, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn foi realizada em aparelho ICP-OES (modelo ICP-OES 720 Series da Agilent) do Laboratório de Química Ambiental da Unesp/Sorocaba. As figuras 5 e 6 ilustram o desenho experimental do monitoramento dos parâmetros pH e OD e da extração das alíquotas para análise de metais em ICP-OES.

Figura 5: Esquema ilustrativo da preparação do experimento com argila, *Elódea* sp e água de cultivo, com experimento montado em réplica e mantido em incubadora, e monitoramento dos parâmetros por 15 dias



Fonte: autoria própria

Figura 6: Esquema ilustrativo da preparação de amostras para determinação de metais em ICP-OES: coleta de água superficial e intersticial através de centrifugação, e determinação de metais biodisponíveis pelo método de Silvério (1999)



Fonte: autoria própria

4.3 Análise de parâmetros físico-químicos de variedades de matéria orgânica e sedimento formulado utilizado para experimento toxicológico

4.3.1 Avaliação de diferentes tipos de matéria orgânica

Cinco tipos de matéria orgânica foram utilizadas para avaliação visual e odorífica em contato com água reconstituída. A figura 7 ilustra os materiais utilizados, sendo eles a ração Sera® para ciclídeos, Spirulina (Tetra®) e TetraMin®, a macrófita *Elódea* sp. seca e triturada, e húmus de minhoca obtido comercialmente (Agro Best®, características: alto índice de matéria orgânica e carga bacteriana, macro e micronutrientes, pH neutro, considerado um rico e completo adubo orgânico). Em béqueres de 50 mL foram adicionados 0,1 g de cada um dos materiais, em réplica, assim como água reconstituída (40 mL).

Figura 7: Materiais utilizados como matéria orgânica para avaliação de aplicação em sedimento formulado (à esquerda) e montagem do teste (à direita)



Fonte: arquivo pessoal

O aspecto da água (odor, cor, pegajosidade) foi analisado diariamente por 5 dias para possíveis mudanças no protocolo de formulação com outros tipos de matéria orgânica.

4.3.2 Determinação de metais totais e biodisponíveis no sedimento formulado e na argila caulinita por meio de análise em ICP-OES

Após a verificação dos constituintes mais adequados à formulação de sedimento, levando-se em conta o tipo de argila e de matéria orgânica, foram conduzidos experimentos para a extração de amostras destinadas à quantificação de metais (mesmas condições descritas no item 5.2).

Com isso, foram montados em erlenmeyers de 125 mL um total de 50,5 g de sedimento formulado (35 g de areia fina, 5 g de areia média, 5 g de areia grossa e 5 g de argila, e 0,5 g de húmus). Foram também montados sistemas com 5 g de argila caulinita apenas. Ao sedimento e à argila foram adicionados 70 mL de água reconstituída, e os sistemas foram levados à agitação (175 rpm) por 2h. Após 30 minutos de repouso, as amostras foram centrifugadas (2000 rpm) e filtradas em filtro para corantes histológicos. O mesmo procedimento foi feito com o controle, composto apenas de água reconstituída. Todo o experimento foi feito em triplicata e toda a vidraria utilizada foi previamente higienizada em banho ácido (HCl 10%) por 30h e enxaguada com água deionizada. As amostras filtradas foram avolumadas

para 100 mL e colocadas em tubos falcon, onde foram acidificadas e destinadas à leitura em ICP-OES (5 mL de amostra e 500 µL de HNO₃ a 20%). Esta análise foi feita apenas para uma simulação de água intersticial, e não superficial.

Para metais biodisponíveis, foi novamente empregado o método de Silvério (1999), utilizando-se 1 g de sedimento formulado (0,7 g de areia fina, 0,1 g de areia média, 0,1 g de areia grossa, 0,1 g de argila e 0,01 g de matéria orgânica) e 1 g de argila caulinita apenas. Da mesma forma, o controle foi representado por água reconstituída e as amostras foram feitas em triplicata.

4.3.3 Determinação de teores de nitrogênio, fósforo total e carbono orgânico e total (TOC) em dois tipos de matéria orgânica (USEPA 600/R-99/064, 2000)

Os teores de nitrogênio, fósforo e carbono orgânico foram determinados de acordo com recomendações da USEPA (2000), apenas na fração líquida em contato com o material orgânico (de acordo com metodologias e materiais disponíveis nos laboratórios da UNESP Sorocaba), visando-se comparar dois tipos de matéria orgânica: ração para ciclídeos mascerada e húmus, ambos peneirados ($\leq 1,0$ mm).

Toda a vidraria utilizada foi previamente higienizada em banho ácido (HCl 10%) por 30h e enxaguada com água deionizada. Foram pesados 6,03 g de cada material e adicionados 300 mL de água reconstituída com dureza a 40 mg CaCO₃/L. As elevadas quantidades de matéria orgânica foram adotadas para garantir a quantificação de nitrogênio e fósforo pelo método utilizado. O controle foi utilizado com água reconstituída. A figura 8 ilustra os béqueres contendo o material que foi levado à agitação por 2h.

Figura 8: Preparação das amostras de matéria orgânica para análise de N, P e TOC



Fonte: arquivo pessoal

Após agitação e repouso de 30 minutos, as amostras foram filtradas em papel de filtro Melitta®. A fração líquida foi então utilizada para as análises de N, P e TOC.

Fósforo total – Para a determinação colorimétrica de fósforo em amostra líquida, foi utilizado o método de adição do reagente molibdanovanadato.

Foram recolhidos 100 mL de cada amostra, em réplica, totalizando 6 amostras em novos béqueres. Para cada 100 mL de amostra foram adicionadas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e 1 g de $K_2S_2O_8$ (persulfato de potássio). Foram adicionadas pérolas de vidro aos béqueres contendo as soluções, os quais foram tampados com vidro relógio e levados para aquecimento em mesa aquecedora, com o cuidado para que não houvesse perda do material com a fervura. A temperatura ficou em torno de $100^\circ C$ e as amostras foram evaporadas até que atingissem volume inferior a 50 mL. Depois que cada amostra atingiu esse volume, elas foram retiradas para resfriamento natural.

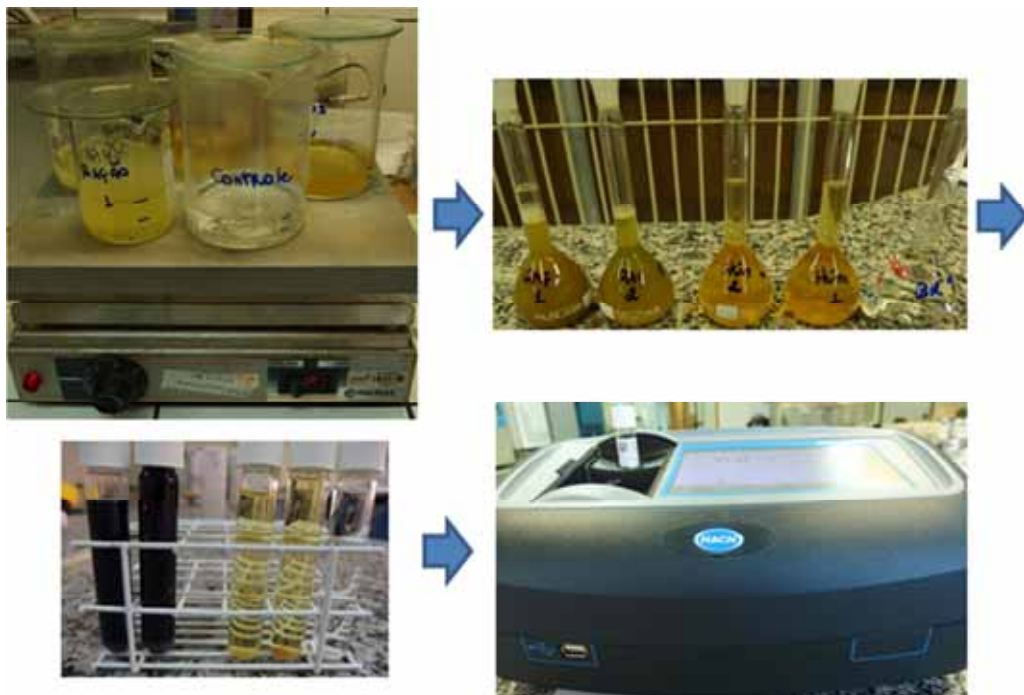
As amostras foram transferidas dos béqueres para balões volumétricos com capacidade de 50 mL e avolumadas para este volume, com a lavagem cuidadosa das paredes dos béqueres. Neste caso, as amostras foram concentradas 2 vezes, pois partiu-se do volume inicial de 100 mL e no final foi avolumada para 50 mL.

Foram transferidos 35 mL da amostra digerida para um novo balão de 50 mL, ao qual foram adicionados 10 mL do reagente molibdanovanadato (Anexo B). O volume do balão foi completado com água destilada até o menisco. O branco foi

preparado com água deionizada, contendo a mesma quantidade do reagente molibdanovanadato.

As amostras foram transferidas para tubos Hach® específicos para uso no aparelho analisador. Após 10 minutos, os tubos puderam ser inseridos no aparelho Hach® para determinação do fósforo total das amostras. A figura 9 ilustra as etapas de preparação das amostras para determinação de fósforo das amostras.

Figura 9: Etapas do processo de preparo das amostras para determinação de fósforo total: amostras em mesa aquecedora, amostras sendo avolumadas para 50 mL, transferência para tubos Hach® e leitura no aparelho Hach®



Fonte: arquivo pessoal

Nitrogênio total – Para análise de nitrogênio total, foi utilizado o “kit Hach®” (figura 10) e a metodologia descrita a seguir.

Figura 10: Kit Hach utilizado para determinação de nitrogênio total em amostra líquida



Fonte: arquivo pessoal

Foi ligado o aparelho biodigestor Dry Block American Lab® para que atingisse a temperatura de 105° C. No primeiro tubo do kit (frasco de reagente por digestão com hidróxido de nitrogênio total), foi adicionado o conteúdo do pacote de reagente em pó de persulfato de nitrogênio total, um para cada amostra. O mesmo foi feito para o branco (água deionizada incluída no kit). Foram adicionados 2 mL da amostra ou branco neste primeiro tubo, os quais foram tampados e agitados vigorosamente por 30 segundos para misturar. Os tubos foram levados ao aquecedor Dry Block, onde permaneceram por 30 minutos.

Após retirar os tubos, que foram resfriados naturalmente, foi adicionado o conteúdo do reagente A de nitrogênio total em cada um, sendo agitados por 15 segundos. Após período de reação de 3 minutos, os tubos foram novamente abertos e foi adicionado o reagente B do kit em cada tubo. Os tubos foram agitados por 15 segundos e, depois de um período de reação de 2 minutos, foram transferidos 2 mL da amostra digerida deste primeiro tubo para um segundo tubo, fazendo-se o mesmo com o branco. O segundo tubo foi tampado e invertido por dez vezes para misturar as soluções. Esperou-se um período de 5 minutos para que ocorresse a reação, observando-se que a cor amarela se intensificava nesse momento. As paredes dos tubos foram limpas com papel macio. O branco (água deionizada) foi

inserido primeiro no aparelho Hach®, programado para leitura de nitrogênio total. O ZERO foi pressionado, apresentando o resultado 0,0 mg/L N. Em seguida, as amostras foram inseridas uma por vez no aparelho, sendo o valor determinado em mg/L N.

A figura 11 ilustra o passo a passo desse experimento.

Figura 11: Etapas do processo de preparo das amostras para determinação de nitrogênio total: adição do conteúdo do pacote de reagente persulfato de nitrogênio em pó, adição da amostra no primeiro tubo, aquecimento em Dry Block, adição do reagente A de nitrogênio total em cada tubo, adição do reagente B após reação com A, transferência do conteúdo para o segundo tubo e leitura de nitrogênio total em aparelho Hach®



Fonte: arquivo pessoal

Carbono orgânico total – Para a análise de TOC foram recolhidos 60 mL de cada solução inicial filtrada em frascos âmbar, adicionando-se 3 gotas de ácido fosfórico concentrado em cada frasco. As amostras foram encaminhadas para o analisador de carbono orgânico multi N/C® 3100 da Analytik Jena, com apoio do LMACA, ilustrados pela figura 12.

Figura 12: Amostras para análise de TOC e equipamento de medição de TOC



Fonte: arquivo pessoal

O TOC é classificado como a soma do carbono orgânico dissolvido (DOC), do carbono orgânico particulado (POC) ou suspenso (SOC) e carbono coloidal (Quinágua, 2006). Segundo Di Toro *et al.* (1991), este é um importante parâmetro pois é o principal determinante da biodisponibilidade de orgânicos não iônicos. Assim, a biodisponibilidade de compostos orgânicos é diretamente afetada pela quantidade de TOC presente em sedimentos. A USEPA (2001) estima que a biodisponibilidade de um composto químico em sedimentos pode ser feita em função do contaminante adsorvido ao carbono orgânico e sua concentração presente na água intersticial, sob condições de equilíbrio.

4.4 Estudo da viabilidade metodológica com *Ceriodaphnia dubia* para testes de toxicidade crônica com sedimentos formulados: ênfase para a toxicidade da água intersticial contaminada com os IE através de bottom up e top down

A espécie *Ceriodaphnia dubia* (figura 13) foi utilizada para dar continuidade aos experimentos. Segundo Araújo *et al.* (2006), o cultivo e manutenção de culturas vivas sempre necessitam de adaptações, e não necessariamente o que funciona corretamente em um laboratório será funcional para outros, sendo uma atividade que requer constantes cuidados e adaptação. As flutuações na saúde dos organismos cultivados em laboratórios são comuns e podem ter a causa em inúmeros fatores, como a operação de manutenção da cultura, a qualidade da água

de cultivo, as condições do laboratório (presença de vapores/ odor, ruído, luminosidade), a qualidade do alimento, dentre muitos outros.

Figura 13: Organismo-teste *Ceriodaphnia dubia* (microcrustáceo da ordem Cladóceras)



Fonte: arquivo pessoal

Os ensaios de toxicidade crônica permitem avaliar os efeitos adversos mais sutis aos organismos expostos, sendo estes efeitos subletais, podendo causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a um prazo mais longo do que nos testes de efeito agudo. Neste caso, os ensaios foram conduzidos com parte do ciclo de vida da citada espécie, sendo o estágio de vida mais sensível e crítico, que normalmente é a fase inicial do seu desenvolvimento. Isso permite avaliar efeitos sobre a sobrevivência e reprodução de *C. dubia* (Aragão e Araújo, 2008).

Segundo Aragão e Araújo (op. cit.), uma vez que as metodologias para testes com espécies de coluna d'água se encontram bem estabelecidas, como para larvas de peixe *Phimephales promelas* e o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, esses organismos têm sido utilizados em testes crônicos de curta duração com sedimentos.

Com a finalidade de verificar a adaptação destes organismos ao ambiente com sedimento e criar ajustes metodológicos, foram feitos os seguintes testes preliminares, utilizando-se a formulação 5A descrita em 5.1, com ração para ciclídeos (Sera®, composição no Anexo A) como matéria orgânica, por apresentar composição semelhante à TetraMin® e por não conter corantes em sua composição:

- Teste utilizando todo o sedimento formulado;
- Teste utilizando água intersticial centrifugada;

- Teste utilizando água intersticial centrifugada e filtrada em filtro para corantes histológicos.

A abertura de poro assegura que as moléculas livres não fiquem retidas ao filtro, e sim apenas os materiais particulados que podem obstruir a carapaça dos microcrustáceos em estudo.

Os primeiros testes foram realizados visando obter uma solução que fosse bem aceita pelo organismo-teste *C. dubia*, já que não necessariamente o mesmo sedimento que apresentou boa aceitação pela espécie *Hyaella azteca* também seria aceito pela *Ceriodaphnia dubia*.

Como os organismos não se adaptaram ao teste preliminar utilizando sedimento formulado e água de cultivo na proporção de 1:4 (g/mL), mesmo após período de 1 dia para decantação, foi analisado o teste seguinte utilizando apenas água intersticial centrifugada, verificando que o ambiente também não foi propício à sobrevivência dos organismos. Em última análise, foi verificada a utilização da água centrifugada e filtrada em filtro de histologia para depois expor os organismos. Desta forma, foi percebida uma melhor aceitação em termos de sobrevivência e reprodução dos organismos neste meio, em relação ao controle utilizando-se apenas água de cultivo.

Devido à importância da água intersticial como rota de exposição de contaminantes para a fauna interior do sedimento e organismos epibentônicos, além da melhor aceitação dos organismos-teste nessas condições, os ensaios de toxicidade foram realizados com a água intersticial após condicionamento do sedimento formulado.

A concentração dos estrógenos utilizados nesta etapa do experimento foi baseada em concentrações detectadas em águas superficiais do Estado de São Paulo. Para tanto, foram utilizados como parâmetros os trabalhos de Lopes *et al.* (2010) e Sodr e *et al.* (2010), os quais detectaram valores m aximos de 30,6 ng/L de 17β-estradiol na região de Jaboticabal-SP, e 25,0 ng/L de 17α-etinilestradiol EE2 no Rio Atibaia, Estado de São Paulo, respectivamente. Com isso, foi estabelecida e padronizada a concentra o teórica de 30,0 ng/L de cada componente na condu o dos testes de toxicidade.

Os resultados foram representados por meio de taxa de letalidade e análise estatística para número de neonatos para as condi oes do experimento. Em

análises estatísticas, é comum verificar erros de falso positivo (quando uma amostra é identificada como tóxica quando, na realidade, não possui essa característica), e falso negativo (quando a amostra é identificada como não-tóxica, mas apresenta efeito adverso). A fim de se evitar erros de falso positivo, quando os efeitos são significativos estatisticamente, mas não são relevantes sob o aspecto biológico, foi criado o teste de hipóteses por bioequivalência (Bertoletti e Buratini, 2008), o qual incorpora ao cálculo uma constante de proporcionalidade "b", que varia de acordo com o aspecto toxicológico avaliado e a espécie utilizada.

Sendo assim, os resultados foram submetidos aos seguintes testes estatísticos para identificar diferenças significativas entre os tratamentos:

- Kruskal-Wallis (análise de variância não-paramétrica, quando os dados não seguem uma distribuição normal);
- Teste t (método paramétrico);
- Teste t por bioequivalência (método paramétrico), com $b = 0,79$ (Bertoletti *et al.*, 2007).

O método de Kruskal-Wallis foi realizado através do *software* BioEstat 5.3, e os teste t e de bioequivalência foram feitos por meio do *software* Toxstat 3.5.

Todos os testes com *Ceriodaphnia dubia* seguiram as condições destacadas na tabela 7.

Tabela 7: Condições para a realização dos testes de toxicidade com *Ceriodaphnia dubia*

| Variáveis | Condições do teste |
|--|--|
| Tipo de teste | Semi-estático |
| Duração | 8 dias |
| Temperatura | 25 ± 1°C |
| Qualidade da luz e ambiente | Luz fria (led) em incubadora |
| Intensidade luminosa | 500 a 1000 lux |
| Fotoperíodo | 16h luz: 8h escuro |
| Tamanho e material do recipiente-teste | Béquer de vidro de 50 mL |
| Volume das soluções | 20 mL |
| Renovação das soluções-teste | Sim, a cada 3 dias |
| Número de organismos/replicatas | 1/10 |
| Idade dos organismos | 6 a 24h |
| Alimentação durante o teste | Sim, 20 µL de <i>Raphidocelis subcapitata</i> * concentrada (todos os dias) e 20 µL de alimento composto** (na montagem e nas trocas do teste) |
| Critérios de avaliação | Sobrevivência, reprodução e tamanho |
| Critério de aceitabilidade do teste | 80% de sobrevivência e média de, pelo menos, 15 filhotes no controle |

* Cultivo de *Raphidocelis subcapitata* no Apêndice F

** Preparo de alimento composto no Apêndice E

4.4.1 Testes de toxicidade com água intersticial

Segundo USEPA (2000), os experimentos com sedimento contaminado devem incluir um controle com o sedimento, controle com a solução de cultivo da cultura, controle com solvente, e as concentrações desejadas da substância de interesse para o sedimento contaminado. Assim, o primeiro teste definitivo com *Ceriodaphnia dubia* foi montado sob as condições descritas a seguir, com a réplica realizada dentro do mesmo mês. Os parâmetros pH, OD, condutividade e dureza foram monitorados durante o experimento nas trocas de soluções, com auxílio dos aparelhos da marca Digimed® modelos DM-22, DM-4P e DM-32, respectivamente, e através de titulação, conforme Apêndice G.

Preparo das soluções-teste

Os padrões de 17β -estradiol (E8875, $\geq 98\%$) e 17α -etinilestradiol (46263) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e dissolvidos em solvente (metanol, mesma marca) para obter uma solução estoque de 1 g/L de cada hormônio. Foi feita uma primeira diluição em balão volumétrico de 25 mL e 20 μ L a partir da solução estoque, completando o volume com água de cultivo. A partir desta, foi feita a segunda diluição, coletando-se com micropipeta 19 μ L da diluição contendo cada um dos estrógenos E2 e EE2 e depositando em seus respectivos balões volumétricos de 500 mL, completando o volume com água de cultivo, para a obtenção de uma solução a uma concentração teórica de 30 ng/L.

Preparo do sedimento, condicionamento e extração da água intersticial

Foram utilizados béqueres de 1 L e acrescentadas as porções secas de cada constituinte do sedimento formulado, conforme determinado na etapa anterior: 70% de areia fina, 10% de areia grossa, 10% de areia média, 10% de argila caulinita e 1% do total em massa de matéria orgânica (ração de peixe Sera®). No total, foram utilizados 202 g de sedimento e 300 mL de água reconstituída (tanto para o controle com sedimento quanto para os testes contaminados com E2 e EE2). Devido às modificações estruturais decorrentes da calcinação de caulinitas, causando sua amorfização e formando a metacaulinita (Gámiz et al., 2005), optou-se por não utilizar esse tratamento na fração argila. Assim, apenas as diferentes granulometrias de areia foram previamente calcinadas.

Toda a vidraria utilizada para o experimento foi previamente higienizada em banho de Extran 20%, banho ácido (HCl 10%) e descontaminada com metanol puro. Após o preparo da parte líquida e adição ao sedimento, os béqueres foram levados à agitação em mesa agitadora (Quimis®) por 2 horas a 175 rpm (figura 14). Após repouso de 1 hora, cada extrato foi levado à centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos. Os extratos foram filtrados em filtro para corantes histológicos e recolhidos em novos béqueres até que fosse terminada esta etapa para todos os extratos.

Figura 14: Condicionamento do sedimento formulado: etapa de agitação por 2h a 175 rpm



Fonte: arquivo pessoal

O controle contendo metanol (CAM) foi preparado em balão volumétrico de 500 mL adicionando-se em água reconstituída a mesma quantidade utilizada de metanol para os testes contaminados.

Cada recipiente-teste (béquer de vidro de 50 mL) foi preenchido com 20 mL de solução, totalizando 50 recipientes. Foi ministrado o alimento conforme recomenda a norma ABNT NBR 13373 e inserido um organismo em cada um dos recipientes-teste. Para isso, foram separados previamente 50 organismos jovens (6 a 24 horas de vida), para uso no teste com 10 réplicas para cada condição, conforme descrito na mesma norma e na tabela 7. As descrições utilizadas no teste estão descritas na tabela 8:

Tabela 8: Descrição das condições dos controles e das soluções contaminadas para o experimento e suas siglas

| Condição | Descrição | Sigla |
|-------------|-----------------------------------|-------|
| Controle | Apenas água de cultivo | CA |
| | Água de cultivo e metanol | CAM |
| | Água intersticial não contaminada | CS |
| Contaminado | Água intersticial com E2 | E2 |
| | Água intersticial com EE2 | EE2 |

O andamento do teste e sua réplica seguiu as seguintes etapas de realização:

- Montagem – Geração parental (P)
- 2 dias de repouso
- 1ª troca da solução teste

- 2 dias de repouso
- 2ª troca da solução teste
- 1 dia de repouso
- Desmontagem da geração P e montagem da geração F1
- 2 dias de repouso
- 1ª troca da solução teste – geração F1
- 2 dias de repouso
- 2ª troca da solução teste – geração F1
- 1 dia de repouso
- Desmontagem – geração F1

Alimentação

A alimentação seguiu a seguinte regra: no dia da montagem e das duas trocas de solução teste, foi ministrado o alimento composto (preparado conforme a norma ABNT NBR 13373/2010, apêndice E) à quantidade de 20 µL por organismo. Em todos os dias de teste, desde a montagem, foi ministrada alga (*Raphidocelis subcaptata*), quantidade de 20 µL à concentração recomendada na mesma norma, de $2,0 \times 10^5$ cel/mL (apêndice F).

Manutenção

A manutenção do teste consistiu em alimentar diariamente os organismos e realizar a troca de solução a cada 3 dias até o 8º dia de exposição (conforme ABNT NBR 13373/ 2010 e OECD, 2006), como ilustrado pela figura 15.

Figura 15: Troca de solução-teste e contagem de neonatos sobre caixa de luz



Fonte: arquivo pessoal

A segunda montagem do teste (Teste 2) seguiu o mesmo padrão do anterior (Teste 1), para avaliar sobrevivência e reprodução dos organismos à concentração utilizada. Os mesmos conceitos foram observados na geração F1, expostos às soluções nas mesmas condições da sua geração parental (controle ou contaminado).

4.4.2 Teste de toxicidade crônica com IE: sistema *top down*

O experimento denominado “*top down*” consistiu em preparar o sedimento sem contaminante, condicioná-lo e depois simular uma situação em que um ambiente antes não poluído recebe uma descarga de contaminantes. Assim, as soluções contendo os estrógenos foram despejadas nos recipientes após o sedimento já estar previamente condicionado sem contaminantes.

Preparo do sedimento, condicionamento e contaminação

Foram utilizados 2 béqueres de 1 L cada para cada solução preparada. Foram acrescentadas as porções secas de cada constituinte do sedimento formulado: 70% de areia fina, 10% de areia grossa, 10% de areia média, 10% de argila caulinita e 1% do total em massa de matéria orgânica, totalizando 101 g de sedimento em cada béquer (6 unidades, pois as soluções foram preparadas em

replicata para possibilitar a agitação livre com 400 mL de solução em béquer de 1 L) e 100 mL de água de cultivo para todos (sem contaminação).

Após isso, os recipientes foram levados à agitação em mesa agitadora por 2 horas a 175 rpm. Após repouso de 30 minutos, foram adicionados mais 300 mL de solução em cada recipiente, com auxílio de uma pipeta, pela parede do béquer, com o cuidado para que houvesse o mínimo possível de ressuspensão do sedimento. A proporção ficou, então, com 1:4 (massa:volume) de sedimento formulado (g) para água (mL). As soluções acrescentadas para os testes contaminados foram previamente preparadas conforme item 5.3.1. Para o controle CS, foi utilizada apenas água de cultivo.

Os recipientes ficaram em repouso por mais 1 hora e, após esse tempo, foi extraída a solução a partir da superfície, com uma pipeta, com o cuidado para não haver ressuspensão do sedimento, descartando-se aproximadamente 250 mL da solução superficial para que sobrasse apenas a solução de fundo (sedimento e elutriato). No total foram descartados cerca de 250 mL de solução de cada béquer, para que fosse possível extrair uma quantidade ideal de água intersticial através da centrifugação. Dessa forma, cada extrato foi levado à centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos e filtrado em filtro para corantes histológicos e recolhidos em béqueres. O controle contendo metanol (CAM) foi preparado em balão volumétrico de 500 mL adicionando-se a mesma quantidade utilizada de metanol para os testes contaminados.

Cada recipiente-teste (béquer de vidro de 50 mL) foi preenchido com 20 mL de solução, totalizando 50 recipientes. A manutenção, compreendendo alimentação e troca de soluções, foi realizada conforme o teste anterior descrito em 5.3.1 e tabela 7.

4.4.3 Teste de toxicidade crônica com IE: sistema *bottom up*

O sistema do experimento denominado "*bottom up*" consistiu em preparar um sedimento contaminado, adicionando-se uma quantidade de água enriquecida com os hormônios, suficiente para cobri-los e simular o ambiente sedimentar. Após isso,

o sedimento é condicionado e é adicionada água limpa de cultivo com cuidado para haver o mínimo de ressuspensão. Após determinado tempo em repouso, é retirada a água da superfície apenas, para verificar possível toxicidade de um sistema aquático que não possuía recentemente descarga de poluentes mas que, eventualmente, são liberados pelo sedimento através de perturbação no sistema ou por causas naturais.

Preparo do sedimento, contaminação e condicionamento

Foram utilizados béqueres de 1 L para cada solução preparada e acrescentadas as porções secas de cada constituinte do sedimento formulado (conforme item anterior), totalizando 101g de sedimento em cada béquer (3 unidades). Com isso, o sedimento foi misturado manualmente e foram adicionados 150 mL de água de cultivo contaminada com os hormônios, e sem contaminação para o controle. As soluções contaminadas foram previamente preparadas a partir de uma solução de cada estrógeno (E2 e EE2) conforme item 5.3.1, à concentração teórica de 30 ng/L.

Após isso, os recipientes foram levados à agitação em mesa agitadora por 2 horas a 175 rpm. Após repouso de 30 minutos, foram adicionados mais 250 mL de água de cultivo sem contaminantes, com auxílio de uma pipeta, pela parede do béquer, com o cuidado para que houvesse o mínimo possível de ressuspensão do sedimento. Com isso, a proporção do sistema ficou em 1:4 de sedimento formulado (g) para água (mL).

Os recipientes ficaram em repouso por mais 1 hora e, após esse tempo, foi extraída a solução a partir da superfície, com uma pipeta, com o cuidado para que não houvesse ressuspensão do sedimento, no total de 250 mL de cada béquer. Cada solução foi filtrada em filtro de histologia e recolhidos em béqueres, estando pronta para adicionar nos recipientes-teste.

O controle contendo metanol (CAM) foi preparado igualmente ao item anterior. Cada recipiente-teste (béquer de vidro de 50 mL) foi preenchido com 20 mL de solução, totalizando 50 recipientes. A manutenção, compreendendo alimentação e troca de soluções, foi realizada conforme o teste descrito em 5.3.1 e a tabela 7.

4.4.4 Teste de verificação para comparação de matéria orgânica

Após análise dos resultados dos testes anteriores, foi proposto um teste para verificar novamente possíveis adaptações na formulação do sedimento, a fim de se obter uma média de neonatos por organismo do CS (controle com sedimento) equivalente ao CA (controle com água de cultivo). Isso se fez necessário para possibilitar uma análise mais precisa dos reais efeitos dos contaminantes utilizados, sem a interferência de efeitos causados pelo próprio sedimento aos organismos.

Para isso, foi montado um experimento simples, sem a utilização dos contaminantes. Foi usada a formulação descrita em 4.4.1 (200 g), variando-se apenas a fração orgânica do sedimento, sendo uma representada pela ração de peixe Sera® (a mesma utilizada nos ensaios anteriores) e a outra pelo húmus Agro Best® (1,5 g de cada). Após o condicionamento dos sedimentos com 300 mL de água reconstituída em cada béquer “SR” e “SH” (sedimento com ração e sedimento com húmus), sob as mesmas condições anteriores de agitação, repouso e centrifugação, as amostras foram submetidas à filtração à vácuo em microfiltro de fibra de vidro (Macherey-Nagel®, figura 16), assim como procedido no preparo de amostras para análise em cromatografia gasosa.

Figura 16: Microfiltro de fibra de vidro utilizado no preparo de amostras previamente à etapa de SPE



Fonte: arquivo pessoal

Com isso, foi adicionado cuidadosamente um organismo em cada béquer de 50 mL contendo 20 mL de solução e o teste foi conduzido conforme condições descritas na tabela 7.

4.4.5 Teste com todo o sedimento usando húmus

Devido ao resultado obtido pelo ensaio anterior (4.4.4), novo teste foi proposto com a utilização de todo o sedimento. Anteriormente, verificou-se que o mesmo sedimento formulado utilizado no ensaio com *H. azteca* necessitava de ajustes para aplicação com *C. dubia*. Nesse momento, o novo ensaio utilizou novamente todo o sedimento, com a diferença do tipo de matéria orgânica.

Foram feitas 6 réplicas contendo 10 g de sedimento formulado (formulação descrita em 4.4.1), sendo a proporção de 1% de matéria orgânica representada pelo húmus (Agro Best®). Após homogeneização da porção seca, água reconstituída foi adicionada até a marcação de 30 mL de cada béquer. Foi esperado um período de condicionamento do sedimento de 2 dias, tempo necessário para o material orgânico umedecer e decantar, assim como a argila, deixando a coluna de água límpida e sem sólidos em suspensão, o que poderia prejudicar a espécie com o entupimento da carapaça.

Passados os 2 dias, foram adicionados os alimentos (composto e alga) e inseridos os organismos, um em cada recipiente. Da mesma maneira que o sedimento foi condicionado para a montagem do teste, foi feito para a primeira e segunda trocas. Ao final do ensaio, as soluções foram verificadas quanto à dureza, pH, condutividade e oxigênio dissolvido.

4.5 Análises cromatográficas: Tempo de degradação dos IE e capacidade de retenção ao sedimento formulado

Existe uma variedade de métodos disponíveis para a determinação de estrógenos em amostras líquidas, sendo a análise química a forma mais apropriada para a identificação e quantificação de compostos particulares presentes na matriz aquosa. Dentre as análises químicas, tem-se a cromatografia gasosa e a líquida associadas à espectrometria de massas.

Devido à complexidade das matrizes ambientais e a baixa concentração de hormônios no ambiente (à ordem de ng/L), porém fisiologicamente ativos, sua

determinação torna-se tarefa muito difícil. Os métodos descritos na literatura para a detecção de IE aquáticos na faixa de $\mu\text{g/L}$ ou ng/L são baseados na extração, em alguns casos derivatização do hidrogênio ácido e determinação por GC-MS ou HPLC-MS.

O presente trabalho apresentou a proposta de preparação das amostras e análise por GC-MS. A metodologia descrita por Dallegrove (2012) foi utilizada devido a um método recente e validado pelo autor, o qual utiliza materiais e reagentes apropriados e recomendados pela literatura recente para o preparo das amostras.

Todas as amostras preparadas até a etapa de SPE (extração em fase sólida, ou *solid phase extraction*) foram encaminhadas para o Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foram realizadas as reações de derivatização e a determinação das concentrações por cromatografia gasosa.

4.5.1 Tempo de degradação dos IE

Foram conduzidos experimentos com diferentes tempos de agitação para a análise do tempo de degradação das moléculas de E2 e EE2.

O sedimento foi preparado segundo as proporções descritas em 5.3.1, totalizando 202 g. As soluções contaminadas foram preparadas a uma concentração de 500 ng/L de cada contaminante, sendo consideravelmente mais alta que a utilizada nos testes toxicológicos para garantir que fossem extraídas concentrações superiores ao limite de quantificação do método utilizado, prevendo-se que uma considerável parcela seria adsorvida ao sedimento. Um total de 300 mL de solução foi utilizado para cobrir os sedimentos em seus recipientes, os quais foram levados à agitação em mesa agitadora a 175 rpm durante os tempos: 2h, 24h, e 48h. Após repouso de 30 minutos, a parte líquida foi extraída por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e filtração a vácuo em microfiltro de fibra de vidro (Macherey-Nagel®, GF-1, figura 16), com capacidade de retenção de partículas com tamanho de até 0,7 μm . Segundo Han *et al.* (2010), o microfiltro de fibra de vidro mostrou-se o mais adequado quando comparado a outros materiais, apresentando baixa adsorção de

estrógenos durante o processo de filtração. Após filtradas, 180 mL das soluções coletadas em erlenmeyer foram acidificadas com ácido clorídrico diluído (3 M), atingindo o valor aproximado de pH 3. Os recipientes foram mantidos em geladeira até a fase de extração em fase sólida, não ultrapassando 24 horas para tal.

Seguiu-se com o método de Dallegrave (2012) descrito em 5.4.3. Uma alíquota da solução recém preparada (tempo 0), antes de entrar em contato com os sedimentos, foi preparada para determinação da concentração no início do experimento, determinada pela análise em GC-MS. Todo o procedimento também foi realizado com controle, utilizando apenas água de cultivo e sedimento não contaminado. O experimento foi realizado em réplica.

4.5.2 Capacidade de retenção dos IE ao sedimento formulado

As soluções preparadas para a determinação da capacidade de retenção dos contaminantes ao sedimento foram contaminadas com E2 e EE2 à concentração de 500 ng/L, também para garantir a quantificação pelo método utilizado e possibilitar a análise do comportamento dos estrógenos no sedimento formulado.

O preparo do sedimento formulado foi o mesmo do teste anterior (4.5.1), sendo preenchido com 500 mL das soluções contaminadas e apenas água de cultivo não contaminada para o controle. Os recipientes foram agitados a 175 rpm em mesa agitadora por 2 horas, com 60 minutos de repouso. Após isso, foram extraídos 180 mL da água superficial com uma pipeta para cada situação, para que não houvesse interferência do sedimento. A água superficial foi diretamente levada à filtração, enquanto que o sedimento foi levado à centrifugação (2000 rpm por 10 minutos) para extração de cerca de 200 mL de água intersticial.

Todas as soluções foram filtradas a vácuo em microfiltro de fibra de vidro e acidificadas como descrito em 4.5.1. Desta forma, seguiu-se com a metodologia descrita a seguir, em 4.5.3. Todo o procedimento também foi realizado com controle, utilizando apenas água de cultivo e sedimento não contaminado. O teste foi feito em réplica.

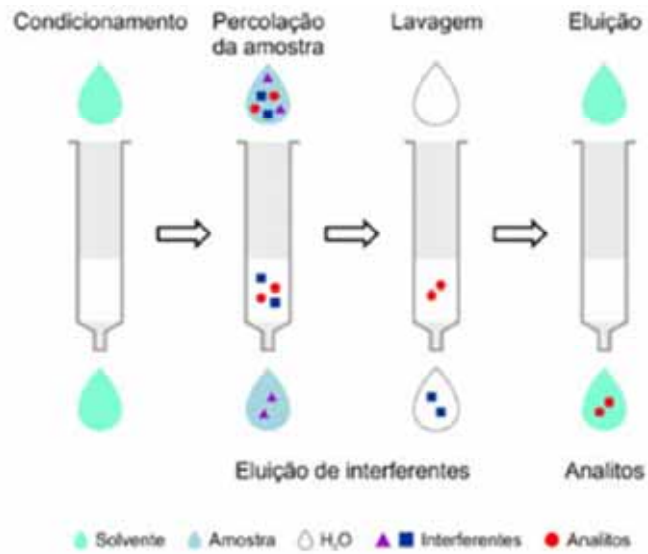
4.5.3 Preparo da amostra: SPE e Reação de derivatização (Método Dallegrave, 2012)

A extração em fase sólida é uma etapa importante da metodologia por duas razões principais: permite pré concentrar o analito de interesse, o qual geralmente é utilizado a baixas concentrações, e elimina substâncias que podem causar interferência na amostra. Como geralmente esses poluentes estão presentes na água ou sedimento em quantidade muito pequena, sua determinação direta é difícil por qualquer método analítico disponível atualmente.

Esta etapa consiste em acoplar uma bomba a vácuo ao equipamento tipo manifold dentro da capela e, dentro dele, colocar um béquer para recolhimento do descarte da amostra. Foram utilizados cartuchos Bond Elut C18 da Agilent®, os quais foram inseridos ao manifold. Primeiramente foi realizado o condicionamento do cartucho, medindo em proveta e despejando, um por vez, os seguintes componentes a uma vazão de 1 mL/min: 5 mL de acetato de etila (Synth®); 5 mL de metanol (Sigma-Aldrich®, $\geq 99,8\%$ (GC)) e 10 mL de água ultra pura (Synergy® UV, resistividade máxima de 18,2 M Ω .cm a 25° C) acidificada a pH 3 com ácido clorídrico diluído (Synth®).

Assim, as amostras previamente acidificadas a pH 3 com ácido clorídrico diluído foram aos poucos inseridas nos cartuchos, com o cuidado para não haver perdas. Em nenhum momento pode-se deixar o cartucho secar, havendo constante adição da amostra aos cartuchos. Dessa forma, foi realizada a extração dos estrógenos, ou seja, sua retenção na resina presente nos cartuchos que retêm as moléculas de hormônio. A solução filtrada nos recipientes inseridos ao manifold (Agilent®) foram descartadas, uma vez que o IE de interesse ficou retido nos cartuchos. A figura 17 ilustra o método utilizado na extração em fase sólida.

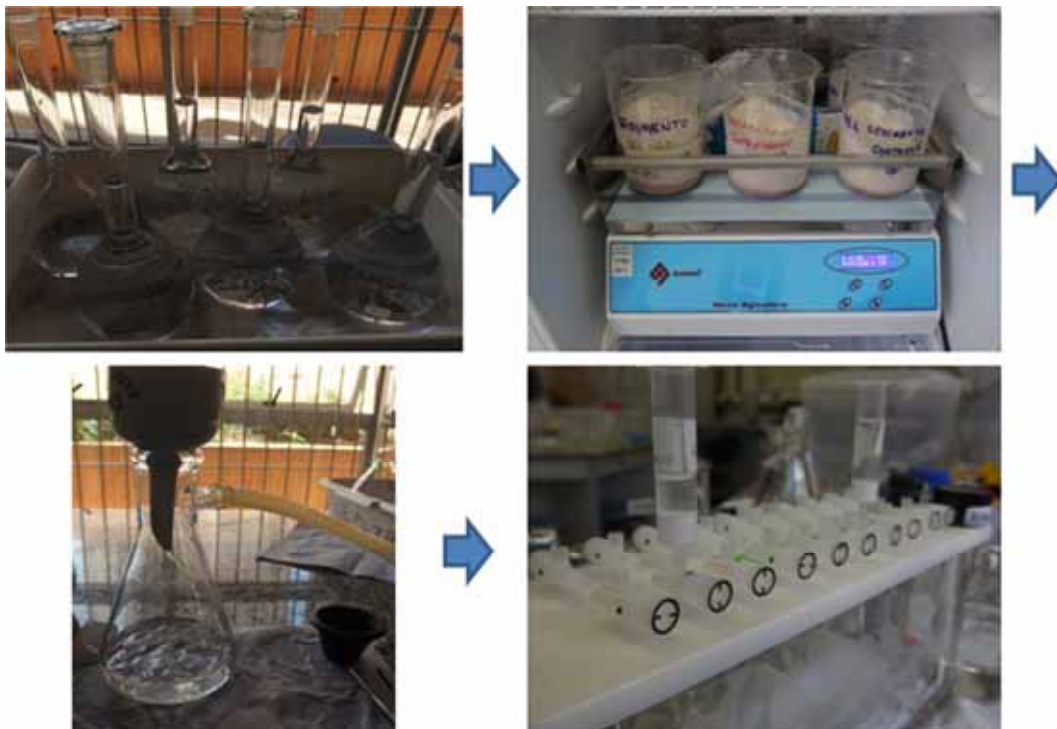
Figura 17: Etapas envolvidas na SPE – Condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito



Fonte: Caldas *et al.* (2011)

A figura 18 destaca as etapas realizadas até a fase de SPE nos laboratórios da UNESP-Sorocaba.

Figura 18: Etapas concluídas no laboratório de Biologia (UNESP-Sorocaba): preparo das soluções em balão volumétrico, agitação e condicionamento dos sedimentos formulados, filtração a vácuo dos sedimentos e etapa de SPE



Fonte: arquivo pessoal

As fases seguintes, compreendendo a eluição e derivatização, além da quantificação, foram realizadas no Instituto de Química/ Departamento de Química Inorgânica da UFRGS. Para isso, os cartuchos secos contendo os analitos foram embrulhados em papel alumínio e mantidos em congelador por até 48 horas, tendo sido transportados em bolsa térmica e mantidos a baixa temperatura até que o experimento fosse continuado.

Para a eluição, foi utilizada uma galeria de tubos de ensaio finos de vidro dentro do manifold, próprios para esta prática, sendo um para cada amostra. Foram conduzidos dois fluxos a 1 mL/min com 2,5 mL de acetato de etila, totalizando 5 mL, sem a utilização da bomba, ligando-a apenas ao final da percolação. Após isso, as amostras foram levadas ao biodigestor tipo *dryblock* à temperatura de 30°C, sob suave fluxo de nitrogênio.

Quando o tubo foi totalmente seco, acrescentou-se 100 µL do agente derivatizante, o MSTFA ativado III (*N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide activated III*), com auxílio de micropipeta de vidro. O tubo foi, então, submetido ao vortex por 30 segundos e foram acrescentados 100 µL de isooctano. A amostra foi devidamente vedada e levada ao *dryblock* novamente a 55°C por 30 minutos. Por fim, as amostras foram encaminhadas para análise em GC-MS. Basicamente, o objetivo da derivatização é de melhor separar os componentes na coluna, aumentando sua volatilidade e diminuindo sua interação com a fase estacionária, melhorando a seletividade e sensibilidade da análise.

A derivatização em análises de GC-MS pode ser definida como um processo pelo qual um composto é quimicamente alterado para produzir um novo composto que tenha propriedades mais propícias para separação cromatográfica e detecção espectrométrica (Zaikin e Halket, 2009; Knapp, 1979). O produto desse processo, o derivado, pode apresentar uma estrutura bem semelhante ou muito relacionada com o composto de origem não modificado. Os principais objetivos da derivatização são: 1) Aumentar a volatilidade/ reduzir a polaridade para análises de compostos relativamente não voláteis; 2) Melhorar as propriedades cromatográficas e estabilidade do composto; 3) Melhorar a sensibilidade e seletividade, e também aumentar a detectabilidade; 4) Aprimorar informações estruturais pela melhor separação e obtenção de espectro de massa mais útil (Knapp, 1979). No caso dos hormônios estrógenos, a derivatização é necessária basicamente para evitar a

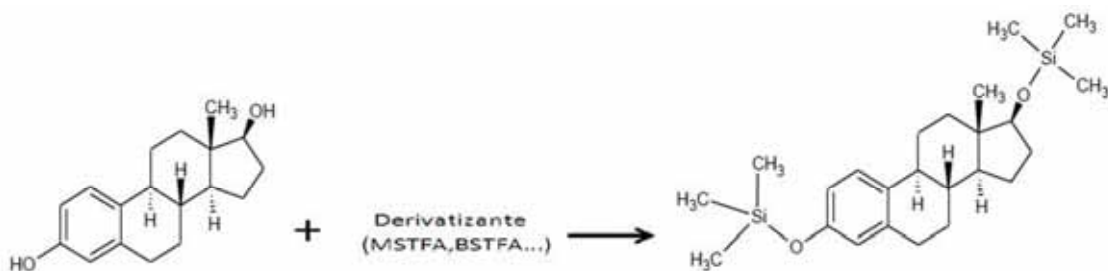
decomposição térmica, aumentar a volatilidade do composto, auxiliar na separação cromatográfica e na sensibilidade (Wu *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2011).

As reações de derivatização usadas para GC-MS classificam-se em três tipos gerais, sendo uma delas a sililação. Esta representa a substituição do hidrogênio ativo nos grupos -OH, -COOH, -NH, -NH₂ e -SH por um grupo silil, como o dimetilsilil [-SiH(CH₃)₂], t-butildimetilsilil [-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃] e clorometildimetilsilil [-SiCH₂Cl(CH₃)₂]. As reações de sililação são o tipo mais comum em cromatografia gasosa (Knapp, 1979) e formam um produto mais volátil e termicamente mais estável (Kumirska *et al.*, 2013).

Alguns especialistas consideram a reação de derivatização um processo que consome demasiado tempo e proporciona intenso trabalho, evitando-a, portando, em procedimentos analíticos (Kumirska *et al.*, 2013). Desta forma, em vez de adotarem GC-MS ou GC-MS/MS, esses pesquisadores preferem fazer uso de LC-MS ou LC-MS/MS. No entanto, é consenso que, em relação à sensibilidade e incerteza da medida, o método de quantificação por GC-MS pode ser superior ao LC-MS para análise de traços de compostos orgânicos em matrizes de grande complexidade (Heath *et al.*, 2010).

Os derivatizantes MSTFA e BSTFA são os mais utilizados para derivatização dos estrogênios E2 e EE2, resultando na formação de derivados trimetilsilil, conforme ilustrado pela figura 19.

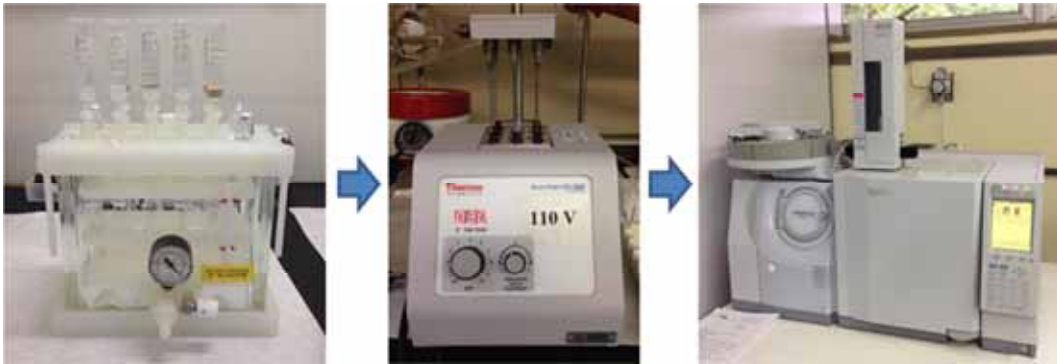
Figura 19: Derivatização do 17β-estradiol por sililação com MSTFA ou BSTFA



Fonte: Dallegrave (2012)

A figura 20 mostra as etapas do processo após a SPE até a amostra final, realizadas na UFRGS (Porto Alegre-RS).

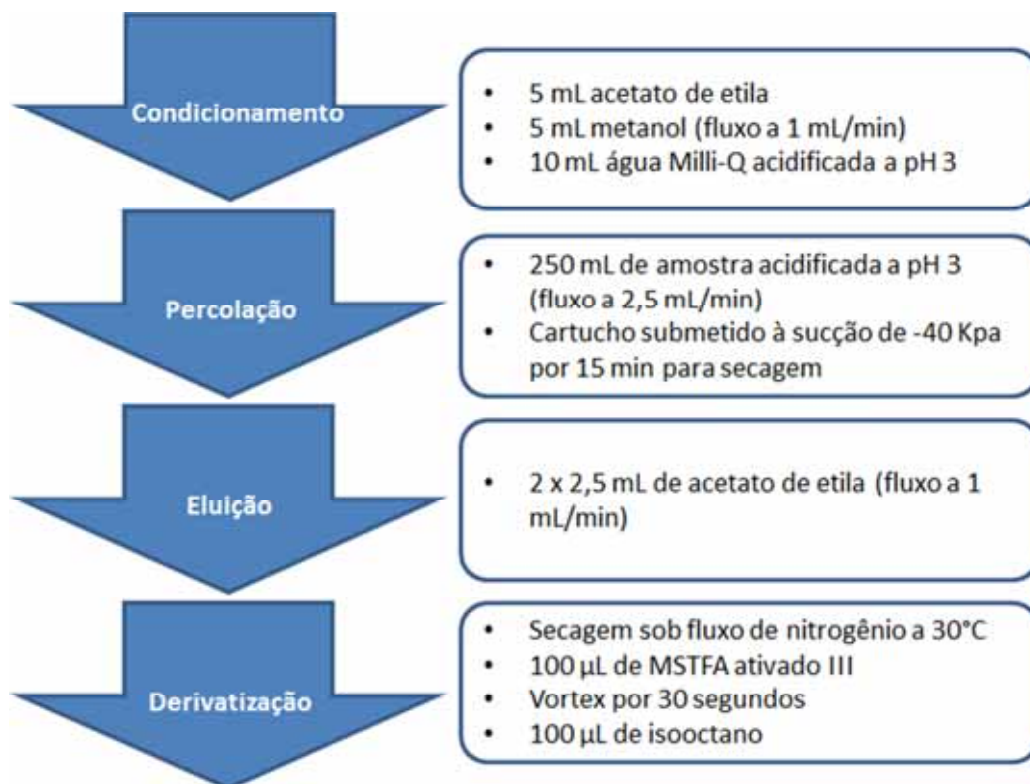
Figura 20: Etapas de eluição, secagem com fluxo de nitrogênio e quantificação dos IE por GC-MS



Fonte: arquivo pessoal

A seguir, o esquema ilustra resumidamente os passos das etapas de SPE até a derivatização (figura 21).

Figura 21: Etapas de condicionamento, percolação e eluição da SPE e reação de derivatização



Fonte: autoria própria

4.5.4 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

O cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas utilizado (Shimadzu®, modelo QP-2010 SE), equipado com uma coluna Restek Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) foi programado com as seguintes condições de análise, apresentadas na tabela 9.

Tabela 9: Condições de análise dos estrógenos por GC-MS

| | | |
|----------------|------------------------------------|--|
| Injetor | Temperatura do injetor | 250°C |
| | Volume de injeção | 1 µL |
| | Modo de injeção | <i>Splitless</i> |
| GC | Coluna | Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) |
| | Gás de arraste | Hélio |
| | Fluxo do gás de arraste | 1 mL/min |
| | Rampa de aquecimento | 150°C (2 min) – 10°C/min – 300°C (3 min) |
| MS | Temperatura linha de transferência | 300°C |
| | Analizador de massas | Quadrupolo |
| | Ionização por impacto eletrônico | 35 eV |
| | Modo de registro dos íons | SCAN e SIM |

Fonte: Dallegrove (2012)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Formulação de sedimentos representativos do Estado de São Paulo para uso em testes ecotoxicológicos

5.1.1 Formulações: análises dos parâmetros químicos da água

A tabela 10 mostra os valores mínimos e máximos de pH, dureza e OD para cada formulação (1 a 5) com os tipos de matéria orgânica utilizados.

Os resultados obtidos para os parâmetros oxigênio dissolvido (OD) e dureza apresentaram-se dentro da faixa aceitável para todos os testes realizados, acima de 4 mg/L e entre 40 e 48 mg CaCO₃/L, respectivamente, conforme recomendado por ABNT (2007). Das formulações 1 a 5, os valores mínimo e máximo registrados para OD foram 6,0 e 7,5, respectivamente, e para dureza foram 40,0 e 46,8 mg CaCO₃/L. Neste requisito, as formulações de 1 a 5 se mostraram adequadas para aplicação em testes ecotoxicológicos. Contudo, em relação ao parâmetro pH, as três primeiras formulações, cujos teores de matéria orgânica foram de 20%, 15% e 5%, apresentaram valores consideravelmente ácidos no decorrer do experimento, tornando um ambiente desfavorável à sobrevivência da *H. azteca* em ensaios ecotoxicológicos, mesmo após a troca de água a cada 3 dias.

Na proporção de 20% de matéria orgânica, com base nos sedimentos do Rio Piracicaba, os valores mínimo e máximo de pH encontrados foram 4,7 e 6,8. Já na formulação 2, contendo 15% de teor de matéria orgânica representado pela *Elodea* sp triturada, os valores mínimo e máximo encontrados foram de 5,5 e 7,1, respectivamente, enquanto para a ração de peixe, os valores permaneceram entre 6,0 e 7,3. Um ligeiro aumento de pH pôde ser observado na Formulação 3, contendo 5% de matéria orgânica. Para a ração de peixe, o intervalo de pH ficou entre 6,8 e 7,4 e para a macrófita, 6,8 e 7,2. Nesta formulação foi observada uma tendência de

equilíbrio de pH do 10° ao 15° dia, com valor médio de 6,8, contudo, a faixa recomendada para ensaios com esse organismo-teste é de 7,2 a 7,6 (ABNT NBR 15470, 2007).

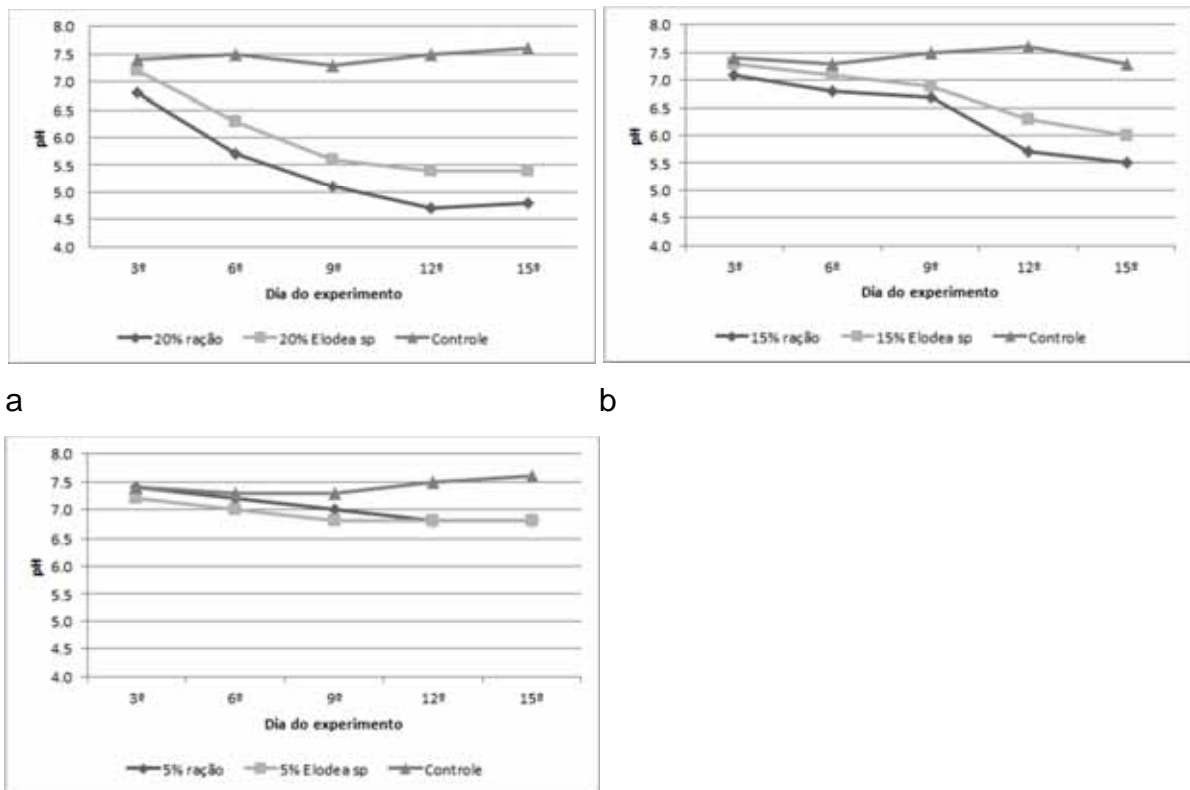
Esses dados corroboram com os encontrados por Verrhiest *et al.* (2002), que relataram que os parâmetros físico-químicos e biológicos dos sedimentos formulados por eles, cujas composições eram formadas por 65% de areia, 30% de argila caulinita, 4,85% de α -celulose, 0,15% de ração de peixe TetraMin® e 0,1% de carbonato de cálcio, apresentaram importantes mudanças nos primeiros 10 a 15 dias de condicionamento, o que demonstra relevância em iniciar um teste de toxicidade em sedimento após um período de condicionamento de alguns dias. Nesse período, segundo os autores, parâmetros como pH são estabilizados e ocorre o início da degradação da matéria orgânica, processo fundamental em ecossistemas naturais.

Tabela 10: Valores mínimos e máximos dos parâmetros pH, OD e dureza das formulações de sedimento no decorrer de 15 dias

| Formulação de sedimento | MO | pH | Dureza (mg CaCO ₃ /L) | OD (mg/L) |
|---|-----------------------|-----------|----------------------------------|-----------|
| 1 - 75% argila + 25% areia fina + 20% MO | Ração de peixe | 4,7 – 6,8 | 40,2 – 45,2 | 6,5 – 7,2 |
| | <i>Elodea sp</i> | 5,4 – 7,2 | 40,3 – 44,3 | 6,5 – 7,0 |
| | Controle | 7,3 – 7,6 | 42,6 – 45,3 | 7,0 – 7,3 |
| 2 - 55% areia fina + 30% areia média + 15% argila + 15% MO | Ração de peixe | 5,5 – 7,1 | 41,4 – 44,1 | 6,7 – 7,2 |
| | <i>Elodea sp</i> | 6,0 – 7,3 | 42,1 – 44,8 | 6,5 – 6,9 |
| | Controle | 7,3 – 7,6 | 40,0 – 44,7 | 6,9 – 7,2 |
| 3 - 90% areia fina + 10% argila + 5% MO | Ração de peixe | 6,8 – 7,4 | 42,6 – 46,0 | 7,0 – 7,4 |
| | <i>Elodea sp</i> | 6,8 – 7,2 | 40,1 – 45,1 | 6,8 – 7,2 |
| | Controle | 7,3 – 7,6 | 43,2 – 44,6 | 7,1 – 7,5 |
| 4 - 40% areia grossa + 40% areia média + 10% areia fina + 10% argila | Ração de peixe - 1% | 6,8 – 7,3 | 41,9 – 44,2 | 7,0 – 7,3 |
| | Ração de peixe - 3% | 6,3 – 7,1 | 41,3 – 44,6 | 6,1 – 7,0 |
| | <i>Elodea sp</i> - 1% | 6,9 – 7,2 | 43,1 – 46,3 | 6,8 – 7,1 |
| | <i>Elodea sp</i> - 3% | 6,2 – 7,1 | 41,3 – 44,6 | 6,1 – 7,0 |
| | Controle | 7,4 – 7,6 | 43,2 – 45,8 | 7,3 – 7,5 |
| 5 - 10% areia grossa + 10% areia média + 70% areia fina + 10% argila | Ração de peixe - 1% | 6,9 – 7,3 | 42,8 – 44,1 | 6,9 – 7,0 |
| | Ração de peixe - 3% | 6,8 – 7,1 | 41,8 – 46,8 | 6,0 – 7,0 |
| | <i>Elodea sp</i> - 1% | 6,9 – 7,2 | 43,2 – 46,3 | 6,7 – 7,4 |
| | <i>Elodea sp</i> - 3% | 6,8 – 7,1 | 40,3 – 44,7 | 6,3 – 7,0 |
| | Controle | 7,4 – 7,6 | 43,2 – 46,2 | 7,0 – 7,4 |

Na figura 22 encontram-se os resultados de pH medidos a cada 3 dias nas formulações de 1 a 3 durante o período experimental.

Figura 22: Valores de pH obtidos a cada três dias, no decorrer de 15 dias de experimento, com relação ao conteúdo de matéria orgânica proveniente de ração e *Elodea* sp.: a) Formulação 1 contendo 20% de matéria orgânica; b) Formulação 2 contendo 15% de matéria orgânica; c) Formulação 3 contendo 5% de matéria orgânica.



c

Fonte: autoria própria

De acordo com os resultados de pH apresentados, as formulações 1, 2 e 3 não se mostraram adequadas ao uso em teste toxicológico durante o intervalo de 15 dias, pois os sistemas, no geral, não apresentaram estabilidade, tampouco estiveram com valores de pH próximos à faixa recomendada entre 7,2 e 7,6 para o cultivo e teste com *Hyalella azteca* (ABNT, 2007). A razão para as mudanças no pH e a não alteração nos padrões de OD não é muito clara, sendo provável que tenha ocorrido a predominância de decomposição anaeróbica da matéria orgânica, pois os valores de OD não foram significativamente alterados. Contudo, os experimentos foram feitos com aeração branda, o que pode ter mascarado o teor real de oxigênio dissolvido, caso não houvesse aeração. Dessa forma, não é possível afirmar com precisão sobre o tipo predominante de decomposição que ocorreu nesses sistemas.

Em relação às formulações 4 e 5, ambas apresentaram resultados de pH próximos ou semelhantes ao obtido no controle, permanecendo, portanto, dentro da faixa mais neutra, como pode ser visto nas tabelas 11 e 12, fato que deve estar

relacionado aos baixos teores de matéria orgânica. Esses resultados confirmam os obtidos por Campagna (2010) ao testar uma formulação simples de sedimento (90% de areia grossa e 10% de argila) contendo 1%, 3% e 5% de teor de matéria orgânica (também com um tipo de macrófita aquática), concluindo que teores acima de 1% tornavam a água inadequada à sobrevivência do organismos-teste em períodos de tempo inferiores a 10 dias.

Para ambas as formulações, aquelas com 1% de matéria orgânica oriunda de ração de peixe foram as que se apresentaram mais adequadas quanto aos padrões de qualidade de água para a sobrevivência da *H. azteca* (formulações 4A e 5A), pois tiveram valores de pH um pouco mais próximos ao recomendado para o cultivo destes organismos, como pode ser observado nas tabelas 11 e 12 e figura 23. Os valores mínimo e máximo de pH registrados foram de 6,3 e 7,3 para a formulação 4 e de 6,8 e 7,3 para a formulação 5, respectivamente, com exceção do controle.

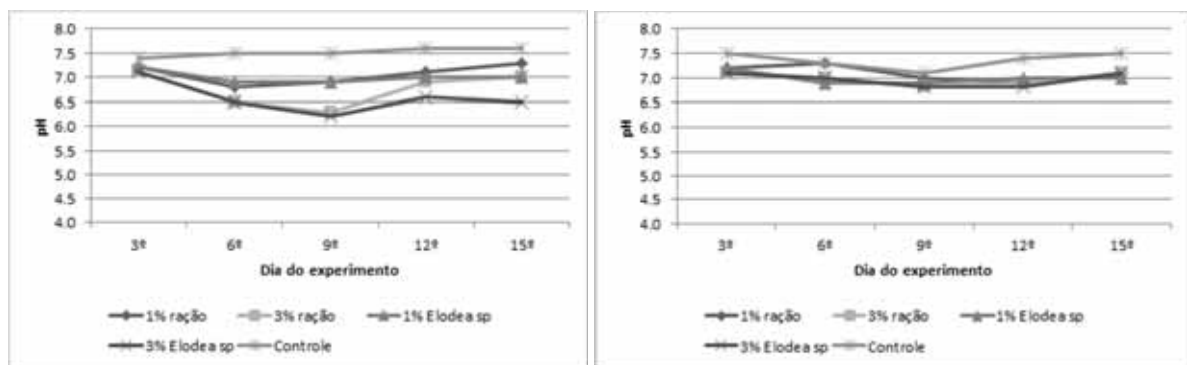
Tabela 11: Resultados das análises químicas das formulações 4 com duas procedências de matéria orgânica em proporções de 1% e 3%, com predomínio de areia grossa e média, com base no sistema Tietê (Estado de São Paulo)

| Formulação | Dia | pH | Dureza (mgCaCO ₃ /L) | OD (mg/L) |
|------------|-----------------|-----|------------------------------------|-----------|
| Controle 4 | 3 ^o | 7.4 | 45,8 | 7.4 |
| | 6 ^o | 7.5 | 44,6 | 7.5 |
| | 9 ^o | 7.5 | 44,2 | 7.3 |
| | 12 ^o | 7.6 | 44,0 | 7.4 |
| | 15 ^o | 7.6 | 43,2 | 7.3 |
| 4A | 3 ^o | 7,2 | 44,2 | 7,3 |
| | 6 ^o | 6,8 | 43,2 | 7,0 |
| | 9 ^o | 6,9 | 41,9 | 7,0 |
| | 12 ^o | 7,1 | 43,9 | 7,2 |
| | 15 ^o | 7,3 | 44,2 | 7,0 |
| 4B | 3 ^o | 7.1 | 44,6 | 7,0 |
| | 6 ^o | 6,5 | 42,5 | 6,8 |
| | 9 ^o | 6,3 | 42,4 | 6,3 |
| | 12 ^o | 6,9 | 41,3 | 6,1 |
| | 15 ^o | 7,0 | 44,3 | 6,9 |
| 4C | 3 ^o | 7,2 | 45,2 | 6,9 |
| | 6 ^o | 6,9 | 43,1 | 6,8 |
| | 9 ^o | 6,9 | 44,1 | 7,0 |
| | 12 ^o | 7,0 | 44,3 | 7,1 |
| | 15 ^o | 7,0 | 46,3 | 6,9 |
| 4D | 3 ^o | 7.1 | 44,6 | 7,0 |
| | 6 ^o | 6.5 | 42,5 | 6,8 |
| | 9 ^o | 6.2 | 42,4 | 6,3 |
| | 12 ^o | 6.6 | 41,3 | 6,1 |
| | 15 ^o | 6.5 | 44,3 | 6,2 |

Tabela 12: Resultados das análises químicas das formulações 5 com duas procedências de matéria orgânica em proporções de 1% e 3%, com predomínio de areia fina, com base no sistema Tietê (Estado de São Paulo)

| Formulação | Dia | pH | Dureza (mgCaCO ₃ /L) | OD (mg/L) |
|------------|-----------------|-----|---------------------------------|-----------|
| Controle 5 | 3 ^o | 7,5 | 44,3 | 7,2 |
| | 6 ^o | 7,3 | 44,1 | 7,0 |
| | 9 ^o | 7,1 | 43,2 | 7,3 |
| | 12 ^o | 7,4 | 44,8 | 7,4 |
| | 15 ^o | 7,5 | 46,2 | 7,3 |
| 5A | 3 ^o | 7,2 | 43,0 | 7,0 |
| | 6 ^o | 7,3 | 43,2 | 6,9 |
| | 9 ^o | 7,0 | 44,1 | 6,9 |
| | 12 ^o | 6,9 | 43,1 | 7,0 |
| | 15 ^o | 7,1 | 42,8 | 7,0 |
| 5B | 3 ^o | 7,1 | 45,4 | 7,0 |
| | 6 ^o | 7,0 | 41,8 | 6,6 |
| | 9 ^o | 6,8 | 46,8 | 6,9 |
| | 12 ^o | 6,9 | 45,6 | 6,0 |
| | 15 ^o | 7,1 | 44,0 | 7,0 |
| 5C | 3 ^o | 7,2 | 43,2 | 7,0 |
| | 6 ^o | 6,9 | 44,0 | 6,9 |
| | 9 ^o | 6,9 | 45,6 | 6,7 |
| | 12 ^o | 7,0 | 46,2 | 7,0 |
| | 15 ^o | 7,0 | 46,3 | 6,9 |
| 5D | 3 ^o | 7,1 | 42,8 | 7,0 |
| | 6 ^o | 7,0 | 42,1 | 6,5 |
| | 9 ^o | 6,8 | 44,7 | 6,7 |
| | 12 ^o | 6,8 | 40,3 | 6,3 |
| | 15 ^o | 7,1 | 41,8 | 6,8 |

Figura 23: Valores médios de pH obtidos a cada três dias nas formulações 4 (a) e 5 (b), contendo 1 e 3% de matéria orgânica procedente de ração e Elodea sp, em 15 dias de experimento



a

b

Fonte: autoria própria

De acordo com Esteves *et al.* (2011), a alteração da qualidade da água em sedimentos formulados relaciona-se com a biodisponibilidade de subprodutos gerados da decomposição da matéria orgânica presente, o que, por sua vez, depende da comunidade microbiana, fatores físicos e químicos do sedimento e da própria água. Neste sentido, houve maior tendência à neutralidade da água nas formulações 5, com predomínio de areia fina, em que os valores de pH registrados ficaram mais próximos aos do controle e aos valores recomendados pela norma ABNT (2007) para os dois tipos de matéria orgânica, desde os primeiros dias de teste, se comparado à formulação 4, com predomínio de areia grossa, em que os valores de pH foram levemente ácidos na formulação 4D (utilizando de 3% de *Elodea sp.*). Este fato supõe que, como testado por Kemble *et al.* (1999), os sedimentos de granulometria mais fina detêm maior capacidade de adsorver os subprodutos gerados pela decomposição da matéria orgânica, tornando-os menos disponíveis para a coluna d'água.

A análise de variância de Kruskal-Wallis revelou que as formulações 4B e 4D (3% de matéria orgânica) apresentaram $p \leq 0,05$ em relação ao controle, considerando-se os valores de pH. Contudo, a primeira formulação apresentou estabilidade a partir do 10º dia, com valores próximos à neutralidade, fato que não foi observado para a segunda formulação, a qual manteve-se ácida até o final do experimento. Para a formulação 5, todos os testes apresentaram $p \geq 0,05$ em relação ao controle e entre si, fato que atesta também a boa estabilidade para o parâmetro pH, que variou apenas 0,5 unidade do valor mínimo ao valor máximo para as quatro formulações (com 1% e 3% de matéria orgânica).

No geral, levando-se em conta os testes de variância e a observação dos valores de pH mais próximos aos recomendados para cultivo, sobrevivência e reprodução de *H. azteca*, assim como o tempo para estabilização deste parâmetro, a formulação 5A apresentou-se como a mais adequada. Contudo, as formulações 5 como um todo apresentaram-se adequadas, variando-se o tempo de estabilização do parâmetro citado de uma formulação para outra. As formulações 4 também apresentaram conformidade com os parâmetros citados, com exceção da formulação 4D (utilizando 3% de *Elodea sp.*).

Diversos autores têm relatado que, dentre os fatores abióticos, o conteúdo de matéria orgânica no sedimento parece ser o fator principal que controla a

biodisponibilidade de poluentes orgânicos em estudos toxicológicos (Di Toro *et al.*, 1991; Fleming *et al.*, 1998). Desta forma, além da quantidade, o tipo de matéria orgânica utilizado para a formulação de sedimentos também é muito importante, visto que ela influencia, de acordo com sua estrutura e composição, na sorção de contaminantes e na sua biodisponibilidade a espécies de micro e macroinvertebrados, assim como no grau de realismo para a representação de ambientes naturais (Gonzalez, 2012). Dentre as diversas fontes de matéria orgânica para sedimentos formulados que têm sido utilizadas (como turfa, esterco, húmus, plantas e ração de peixe), para este trabalho ela foi escolhida levando-se em conta a representatividade do ambiente natural e também a facilidade de obtenção comercial e aplicação em laboratório. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para avaliar a interação de diferentes tipos de matéria orgânica com contaminantes e sua influência sobre a biodisponibilidade de poluentes tóxicos a organismos bentônicos.

5.1.2 Ensaio de sobrevivência, crescimento e reprodução com *Hyalella azteca* em sedimentos formulados

Os resultados das análises ecotoxicológicas vão ao encontro dos resultados obtidos pelas análises químicas das águas das diferentes formulações 4 e 5.

Em relação à sobrevivência, todos os organismos expostos sobreviveram ao final dos testes. Os parâmetros de crescimento, tanto por comprimento quanto por massa média, apresentaram valores muito próximos entre si, mesmo comparando-se as duas formulações. Isso pode ser observado na tabela 13, que apresenta os valores médios de massa e comprimento de 10 réplicas feitas para cada formulação. Os valores de comprimento mínimo e máximo atingidos foram de 2,07 mm e 2,67 mm para a formulação 4 e de 2,09 mm e 3,41 mm para a formulação 5, respectivamente.

A análise de variância de Kruskal-Wallis revelou que, para o parâmetro comprimento, não houve diferenças significativas entre todos os testes em relação ao controle, com $p > 0,05$ para as formulações 4 e 5. Para a massa média dos organismos, o teste Exato de Fisher também acusou $p > 0,05$ para ambas as

formulações comparadas aos seus controles, revelando que não houve diferenças significativas em relação aos resultados obtidos nos lotes controle. A massa média foi obtida em função da medição de 10 organismos juntos devido ao limite do aparelho utilizado. Portanto, não foi possível calcular o desvio para essas medidas, conforme resultados da tabela 13.

Tabela 13: Parâmetros fisiológicos dos organismos em contato com sedimentos formulados após 10 dias

| Formulação | Massa média (µg) | Comprimento médio (mm) |
|------------|------------------|------------------------|
| Controle 4 | 0,123 | 2,300 ± 0,081 |
| 4A | 0,132 | 2,307 ± 0,061 |
| 4B | 0,136 | 2,276 ± 0,104 |
| 4C | 0,141 | 2,386 ± 0,146 |
| 4D | 0,128 | 2,307 ± 0,147 |
| Controle 5 | 0,138 | 2,280 ± 0,093 |
| 5A | 0,155 | 2,300 ± 0,084 |
| 5B | 0,143 | 2,438 ± 0,245 |
| 5C | 0,139 | 2,251 ± 0,118 |
| 5D | 0,132 | 2,266 ± 0,086 |

O parâmetro reprodução também revelou semelhança entre os diferentes tratamentos com as formulações. Os dados apresentados na tabela 14 mostram o número de filhotes gerados por casal ao final de duas semanas, em 5 réplicas de experimento por formulação. O menor valor encontrado foi de 3 filhotes para a formulação 4B e o maior foi de 11 nas formulações 4C, 5A e 5D. A análise de variância de Kruskal-Wallis indicou $p > 0,05$ para todas as formulações 4 e 5 em relação aos seus controles e também entre elas, indicando que não houve diferenças significativas entre os valores de filhotes gerados nos diferentes tratamentos.

Tabela 14: Parâmetros fisiológicos dos organismos em contato com sedimentos formulados após 10 dias

| Formulação | Controle 4 | 4A | 4B | 4C | 4D | Controle 5 | 5A | 5B | 5C | 5D |
|-----------------------------|------------|------|------|------|------|------------|------|------|------|------|
| Média de filhotes por casal | 8,0 | 8,0 | 7,6 | 7,2 | 7,0 | 8,0 | 8,6 | 7,6 | 7,6 | 8,4 |
| Desvio padrão | 1,00 | 1,00 | 2,79 | 2,28 | 1,22 | 1,00 | 1,52 | 1,67 | 1,14 | 1,52 |

Dessa maneira, ambas as formulações 4 e 5, utilizando 1% e 3% de matéria orgânica proveniente de *Elódea sp.* e ração de peixe TetraMin®, se mostraram adequadas à aplicação em testes toxicológicos com base nas análises realizadas, não tendo sido observadas variações significativas dentro dos parâmetros crescimento e reprodução. Mesmo apresentando um resultado levemente desfavorável em relação aos valores de pH nas análises químicas da água, as formulações 4 contendo 3% de matéria orgânica (4B e 4D) se mostraram aptas à aplicação em experimentos com *H. azteca*.

5.2 Análise de diferentes minerais de argilas esmectitas para a composição de sedimento formulado como alternativa ao uso da caulinita

Devido à grande dificuldade em encontrar principalmente os organismos jovens de *Hyalella azteca* pelo fato de a coloração dos organismos ser muito parecida com a da areia, e ao mineral de argila caulinita, que frequentemente se ressuspendia na solução, tornando a parte aquosa turva, foram testados outros tipos de minerais de argila (esmectitas), visto que estes, aparentemente, não deixavam a água turva, o que facilitaria na visualização dos organismos.

5.2.1 Análise dos parâmetros oxigênio dissolvido e pH

Os resultados obtidos mostraram que, para o oxigênio dissolvido, todos os testes apresentaram valores acima de 4 mg/L, embora todos apresentassem grande variação com o passar do tempo devido ao sistema de aeração que, por vezes, se descolava da parede do recipiente, assim como houve variação comparando-se os ambientes com diferentes argilas.

Em relação ao parâmetro pH, o sistema contendo a argila amarela apresentou grande variação com o passar do tempo, aparentando ser um sistema instável. O experimento de 15 dias com as argilas esmectitas, com medições de OD e pH a cada 2 dias, revelou os resultados apresentados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Valores de oxigênio dissolvido (mg/L) referentes aos recipientes contendo diferentes cores de argilas esmectitas

| Dia | Oxigênio dissolvido na presença das argilas | | | | | | | |
|-----|---|-------|-------|--------|-------|-------|----------|----------|
| | Amarela | Rosa | Cinza | Branca | Verde | Preta | Vermelha | Controle |
| 1° | 9,73 | 9,12 | 9,75 | 8,88 | 9,29 | 10,84 | 8,49 | 8,77 |
| 3° | 12,12 | 17,77 | 15,16 | 22,34 | 15,13 | 24,25 | 10,43 | 15,46 |
| 5° | 9,58 | 9,58 | 11,28 | 12,05 | 11,15 | 12,49 | 11,69 | 12,18 |
| 7° | 9,42 | 19,76 | 32,39 | 27,24 | 18,65 | 23,93 | 21,66 | 14,69 |
| 9° | 19,48 | 14,89 | 18,34 | 17,85 | 16,26 | 20,14 | 14,94 | 16,11 |
| 11° | 10,30 | 7,61 | 17,45 | 6,95 | 19,81 | 20,86 | 7,41 | 14,72 |
| 13° | 6,84 | 7,50 | 16,11 | 14,67 | 17,21 | 18,07 | 18,04 | 16,64 |
| 15° | 8,78 | 9,69 | 11,86 | 5,86 | 6,49 | 8,60 | 10,27 | 14,55 |

Tabela 16: Valores de pH referentes aos recipientes contendo diferentes cores de argilas esmectitas

| Dia | pH na presença das argilas | | | | | | | |
|-----|----------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|----------|----------|
| | Amarela | Rosa | Cinza | Branca | Verde | Preta | Vermelha | Controle |
| 1° | 7,058 | 7,329 | 7,327 | 7,285 | 7,094 | 7,264 | 6,965 | 7,395 |
| 3° | 8,007 | 7,940 | 7,875 | 7,817 | 7,526 | 7,708 | 7,658 | 7,966 |
| 5° | 7,706 | 7,668 | 7,768 | 7,896 | 7,436 | 7,678 | 7,587 | 7,821 |
| 7° | 7,771 | 7,917 | 7,878 | 7,749 | 7,491 | 7,795 | 7,645 | 7,765 |
| 9° | 7,925 | 8,043 | 7,932 | 8,058 | 7,520 | 8,071 | 7,905 | 7,845 |
| 11° | 7,410 | 7,973 | 7,952 | 7,972 | 7,711 | 7,981 | 7,902 | 7,926 |
| 13° | 7,976 | 8,002 | 8,102 | 7,993 | 7,375 | 7,952 | 7,948 | 7,902 |
| 15° | 7,822 | 8,095 | 7,882 | 7,833 | 7,546 | 8,083 | 7,766 | 7,877 |

Como pode ser observado, o sistema com argila rosa apresentou maior estabilidade do 7º dia em diante, tendendo a apresentar valores de pH mais básicos. O teste contendo argila cinza se mostrou estável a partir do 3º dia, porém apresentou considerável queda ao final do experimento (15º dia). O teste com argila branca apresentou instabilidade durante todo o período de experimento, aumentando e diminuindo os valores de pH até o último dia. A partir do 3º dia, o sistema com argila verde apresentou estabilidade, sofrendo pouca variação até o final do experimento. O teste contendo argila preta apresentou boa estabilidade a partir do 9º dia da montagem, assim como o teste contendo argila vermelha. O

controle também sofreu algumas alterações mas se manteve estável a partir do 3º dia.

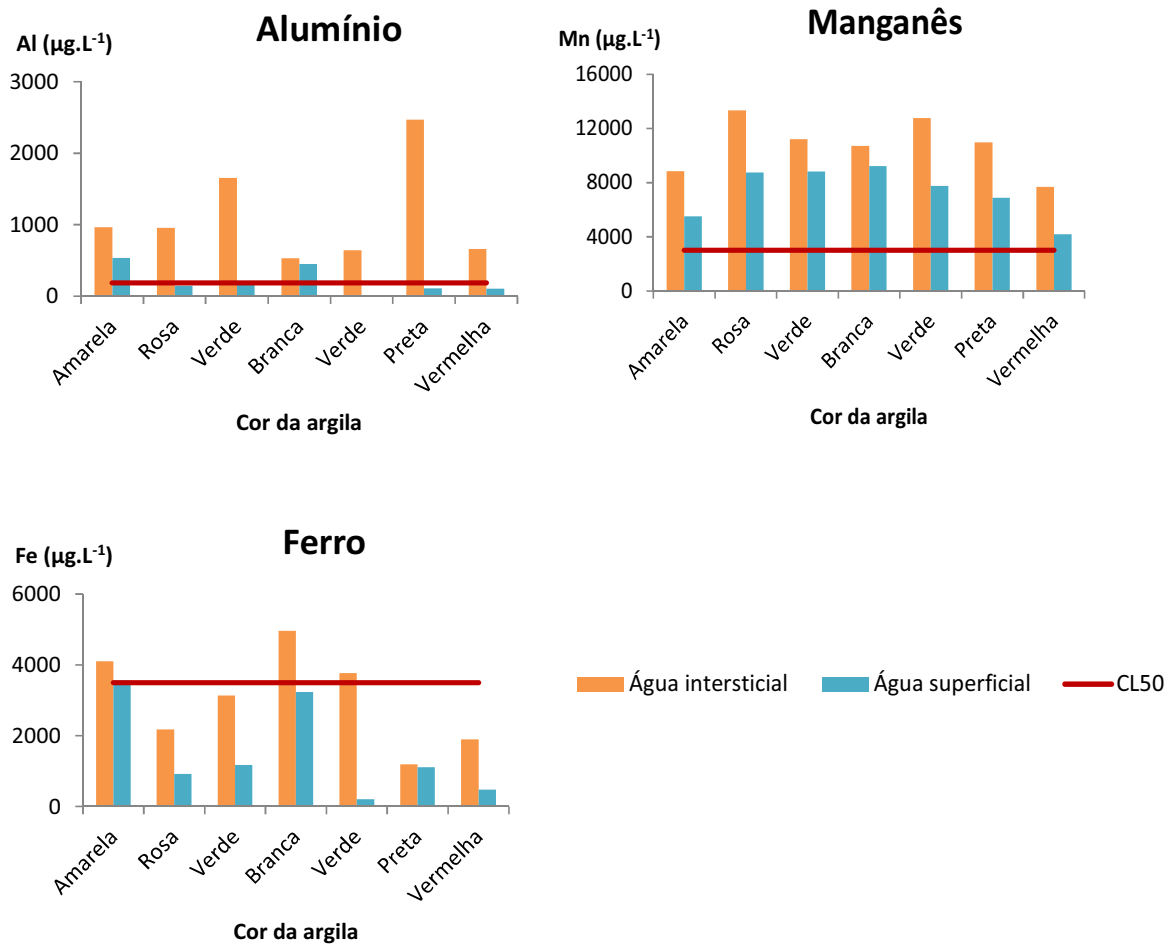
No geral, os valores de pH apresentaram-se levemente básicos, inclusive o controle, sendo esta a característica da água utilizada (água de torneira, abastecimento de Sorocaba), desclorada e com dureza corrigida para 44 mg CaCO₃/L.

5.2.2 Quantificação de metais

Metais disponíveis na coluna de água e nos interstícios do sedimento

O conteúdo dos metais Al, Fe e Mn totais liberados na água superficial e intersticial ficaram acima do CL50 para *Hyalella azteca* na maioria dos casos (sob condições de CL50 apresentadas na tabela 17, com valores de dureza considerados baixos, próximos a 44 mg CaCO₃/L), como pode ser visto na figura 24. Desta forma, pode-se prever que tais minerais de argila apresentariam elevado grau de toxicidade aos organismos-teste. Os metais Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn ficaram abaixo do limite de detecção (*limit of detection* - LOD).

Figura 24: Conteúdo de metais em água superficial e intersticial em relação a diferentes argilas emesectitas coloridas e CL50 para *Hyalella azteca* encontradas na literatura



Fonte: autoria própria

Tabela 17: CL50 para *Hyalella azteca* e condições dos testes encontrados na literatura

| Metal | CL50 (µg/L) | Dureza (mg CaCO ₃ /L) | Duração do teste | pH | Autor |
|-------|-------------|----------------------------------|------------------|-----|---------------------------------|
| Mn | 3000 | 26 | 96 h | 8.0 | Lasier <i>et al.</i> , (2000) |
| Al | 186 | 18 | 7 dias | 7.4 | Borgmann <i>et al.</i> , (2005) |
| Fe | 3500 | 50 | 96 h | 6.0 | Phippen <i>et al.</i> , (2008) |

Observa-se que as argilas coloridas utilizadas neste trabalho apresentaram altos níveis dos metais Mn, Al e Fe, a maioria levando a concentrações letais para *H. azteca* (acima da CL50). Porém, a determinação dos referidos metais foi feita de todas as espécies químicas. Portanto, não necessariamente o conteúdo quantificado

dos metais Mn, Al e Fe estaria biodisponível e seria assimilado por organismos expostos, sendo necessária a condução de testes toxicológicos utilizando a citada espécie para a confirmação da toxicidade causada por estes elementos.

Metais biodisponíveis

O conteúdo de metais totais biodisponíveis determinado pela metodologia de Silvério (1999), os quais puderam ser quantificados (acima do LOD), foram comparados com valores de referência da CCME (2002) que haviam disponíveis, como pode ser visto na tabela 18 para os metais Cr, Cu e Pb. Cinco dos sete tipos de argila apresentaram níveis de chumbo associados a efeitos biológicos adversos à vida aquática (sublinhados).

Tabela 18: ISQG*, PEL** e metais biodisponíveis para sete argilas coloridas (mg/kg)

| Metal | ISQG* | PEL** | Amarela | Rosa | Cinza | Branca | Verde | Preta | Vermelha |
|-----------|-------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|---------------|----------|
| Cr | 37,30 | 90,00 | 4,48 | 8,82 | 2,33 | <LOD | 6,68 | 5,75 | 11,73 |
| Cu | 35,70 | 197,00 | 8,41 | 10,14 | 2,37 | 2,92 | 22,96 | 11,99 | 22,85 |
| Pb | 35,00 | 91,30 | <u>154,52</u> | <u>154,46</u> | <u>156,30</u> | <u>500,90</u> | 83,51 | <u>158,99</u> | 85,69 |

**Interim freshwater sediment quality guidelines* (ISQG): Nível de concentração abaixo do qual efeitos biológicos adversos não são esperados.

***Probable effect levels* (PEL): O menor limite da concentração química associada a efeitos biológicos adversos.

A biodisponibilidade dos metais Cr e Cu mostraram valores aceitáveis de acordo com a CCME (2002), ou seja, abaixo do nível de concentração em que não são esperados efeitos biológicos adversos. Porém, para o metal Pb, foram registrados valores acima dos limites que causam efeitos adversos à fauna aquática. No caso da argila branca, foi quantificado um alto valor de chumbo, sendo a maior concentração dentre as demais amostras (500,90 mg/kg).

No geral, todas as argilas utilizadas não se mostraram aplicáveis para testes de toxicidade devido aos altos teores de metais encontrados. Dessa forma, o próprio sedimento causaria efeito de toxicidade a organismos expostos ao experimento, mesmo sem a adição de contaminantes, mascarando o real propósito do trabalho.

Portanto, a escolha final para a formulação de sedimento foi da argila caulinita, que é fornecida esterilizada e é mais representativa de ambientes aquáticos brasileiros no geral. A quantificação de metais totais analisados para o sedimento e para a caulinita está registrada no item 5.3.2.

5.3 Parâmetros físico-químicos de diferentes tipos de matéria orgânica e sedimento formulado utilizado para experimento toxicológico

5.3.1 Avaliação do aspecto de diferentes tipos de matéria orgânica

O aspecto da parte líquida em contato com os diferentes tipos de matéria orgânica foi diferente para cada amostra. A avaliação visual revelou que, com exceção do húmus, todas as amostras testadas apresentaram turbidez elevada, além de forte odor (proveniente de matéria em decomposição) e pegajosidade, tornando as soluções aparentemente inviáveis para aplicação em ensaios ecotoxicológicos com organismos nectônicos em questão.

A figura 25 ilustra as amostras de 4 dos tipos de matéria orgânica testadas, com apenas 2 dias de condicionamento em água (tempo de contato em teste de toxicidade para troca de soluções). Nota-se que o húmus foi o material que proporcionou menos turbidez.

Figura 25: Aspecto da água em contato com ração TetraMin®, Spirulina®, húmus e Elódea sp. (da esquerda para a direita)



Fonte: arquivo pessoal

Em relação ao recipiente com húmus, notou-se que parte do material decantou e parte permaneceu em suspensão, sendo que este não apresentou cheiro e pegajosidade, apenas uma leve coloração esverdeada. Isso pode ser atribuído ao fato de o húmus ser um material já decomposto, ao contrário dos outros materiais utilizados, que estariam entrando em fase de decomposição após a adição de água, evidenciado pelo odor apresentado. Tanto o TetraMin® quanto a Spirulina® decantaram completamente após algumas horas. A solução contendo *Elodea* sp. apresentou pouco cheiro e, assim como a ração Sera®, apresentou material suspenso e parte decantou.

O húmus, além de ter aparentado ser o material mais adequado para composição de sedimento formulado em relação aos aspectos avaliados, ele pode se assemelhar mais ao material orgânico de sedimentos naturais quanto aos aspectos físico-químicos, visto que é um material constantemente decomposto pela rede microbiológica existente no ambiente.

5.3.2 Quantificação de metais totais e biodisponíveis do sedimento formulado e da argila caulinita

Os resultados referentes à quantificação de metais totais (pelo método “livre” no ambiente aquático e pelo método biodisponível descrito por Silvério (1999)) presentes na água condicionada com sedimento ou com argila caulinita revelaram que, no geral, os valores são considerados aceitáveis em relação ao ambiente aquático natural e para aplicação em ensaios ecotoxicológicos. A tabela 19 mostra os metais livres quantificados da fase aquosa de sedimento formulado, argila caulinita e controle (água mineral).

Tabela 19: Metais livres na fase aquosa de sedimento formulado, argila caulinita e controle ($\mu\text{g/L}$)

| Amostra | Al | Co | Cr | Cu | Fe | Mn | Ni | Pb | Zn |
|-----------|--------|------|-------|------|-------|--------|------|------|-------|
| Sedimento | 316,65 | <LOQ | 27,57 | 2,06 | 53,86 | 118,06 | <LOQ | 7,12 | 54,96 |
| Caulinita | 17,51 | <LOQ | <LOQ | 0,11 | 7,44 | 140,56 | <LOQ | 3,57 | 20,38 |
| Controle | 51,47 | <LOQ | 0,25 | <LOQ | 7,20 | 56,94 | <LOQ | 2,89 | 11,81 |

LOQ: *Limit of quantification* (Limite de quantificação)

De acordo com resultados de metais quantificados de amostras do Sistema Tietê por Rodgher et al. (2005), os valores de cromo (Cr) ficaram entre 8 e 56 µg/L, de cobre (Cu) entre 1 e 11 µg/L, e de zinco (Zn) entre 2 e 1215 µg/L, sendo que os valores aceitáveis para a resolução CONAMA n° 357/2005 para água doce de classe 1 são de 50 µg/L, 9 µg/L e 180 µg/L, respectivamente. Considerando que, para esta classificação, não devem ser observados efeitos crônicos a organismos através de ensaios toxicológicos padronizados, os valores obtidos nesse trabalho podem ser considerados satisfatórios, sendo inferiores aos valores máximos encontrados por Rodgher et al. (2005) no Sistema Tietê, e também inferiores aos limites máximos para água doce de classe 1 da referida resolução.

Tomando-se como referência a mesma resolução, os valores máximos aceitáveis para água doce de classe 1 para os demais metais são: 100 µg/L (Al), 50 µg/L (Co), 300 µg/L (Fe), 100 µg/L (Mn), 25 µg/L (Ni) e 10 µg/L (Pb).

Com isso percebe-se que, em relação ao alumínio total (Al), a amostra com sedimento completo apresentou elevados teores para esse metal, provavelmente devido à relação com a fração de areia, composta de alumínio em sua cadeia. Ainda assim, esse resultado foi inferior aos valores apresentados pelas argilas esmectitas (figura 24). A argila apresentou concentração baixa para o alumínio, diferente das grandes quantidades encontradas pelas esmectitas, mostrando-se um material adequado para aplicação em sedimentos formulados em relação a esse aspecto. Percebeu-se que o controle apresentou maior concentração de alumínio do que a fração líquida contendo caulinita, o que pode ser devido à adsorção do metal à argila.

Os teores de cobalto e níquel estiveram abaixo do limite de quantificação. Os valores obtidos para o ferro (Fe) e chumbo (Pb) foram considerados baixos, de acordo com os limites máximos apresentados pela Resolução CONAMA, não apresentando riscos à fauna aquática. Em relação ao manganês (Mn), os valores foram de 118,06 e 140,56 µg/L para o sedimento e para a argila, respectivamente, sendo valores mais elevados que o valor de referência da citada resolução (de 100 µg/L). Até mesmo o controle apresentou um valor acentuado para este metal, de 56,94 µg/L, sendo que este metal não faz parte dos reagentes adicionados na correção da dureza (soluções 1 e 2, Apêndice H).

Os valores de metais biodisponíveis encontrados neste trabalho ficaram mais próximos aos valores mínimos encontrados por Rodgher *et al.* (2005) em sedimentos coletados ao longo do Sistema Tietê, sendo encontrados nos intervalos de 3,6 a 11,67 mg/kg (Cr), 0,8 a 97,57 mg/kg (Cu) e 1,56 a 224,93 mg/kg (Zn). Os resultados dos metais biodisponíveis encontrados para o sedimento formulado e a caulinita estão apresentados na tabela 20.

Tabela 20: Metais biodisponíveis em amostras de sedimento formulado, caulinita e controle (mg/kg)

| Amostra | Al | Co | Cr | Cu | Fe | Mn | Ni | Pb | Zn |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Sedimento | 35,27 | <LOQ | 0,16 | 0,24 | 13,42 | 2,43 | <LOQ | 0,52 | 3,74 |
| Caulinita | 61,42 | <LOQ | 0,02 | 0,78 | 8,87 | 9,19 | <LOQ | 1,44 | 2,85 |
| Controle | 6,10 | <LOQ | <LOQ | 0,03 | 1,07 | 0,87 | <LOQ | 0,11 | 2,66 |

A tabela 21 mostra os valores de cromo, cobre e chumbo biodisponíveis encontrados nesse trabalho, comparados com valores de referência da CCME (2002). Observa-se que todos os metais apresentaram teores biodisponíveis bem abaixo do *PEL*, indicando que não causam efeitos adversos à fauna aquática nessas condições.

Tabela 21: ISQG, PEL e metais biodisponíveis para sedimento formulado, caulinita e controle (mg/kg)

| Metal | ISQG | PEL | Sedimento | Caulinita | Controle |
|--------------|-------------|------------|------------------|------------------|-----------------|
| Cr | 37,30 | 90,00 | 0,16 | 0,02 | <LOQ |
| Cu | 35,70 | 197,00 | 0,24 | 0,78 | 0,03 |
| Pb | 35,00 | 91,30 | 0,52 | 1,44 | 0,11 |

Com isso, exceto pelos teores de alumínio e manganês encontrados livres na fase aquosa do experimento, mas que não são considerados significativamente elevados levando-se em conta os valores máximos permitidos pela resolução CONAMA n° 357/2005, o sedimento formulado e, principalmente a argila caulinita, apresentaram adequação para aplicação em ensaios ecotoxicológicos.

5.3.3 Análise de nitrogênio, fósforo total e carbono orgânico e total (TOC) das soluções com ração de peixe e húmus (USEPA 600/R-99/064, 2000)

Optou-se pela determinação dos parâmetros de nitrogênio, fósforo e carbono orgânico na água em vez do sedimento pois este último não foi utilizado diretamente nos testes ecotoxicológicos, e sim a água intersticial. Como as amostras de ração e húmus foram usadas na proporção de 3 vezes a mais do que a quantidade utilizada nos testes toxicológicos, para garantir a quantificação pelo método, pode-se estimar que os valores reais são, na verdade, os obtidos pelo método de quantificação divididos por 3. Ou seja, para 300 mL de água, foram usados nos testes toxicológicos 200 g de sedimento e 2 g de matéria orgânica (sendo aqui, para determinação de N, P e TOC, de aproximadamente 6 g). Assim, os valores corrigidos estão representados pela tabela 22.

Tabela 22: Valores de nitrogênio, fósforo e carbono orgânico total para amostras líquidas contendo húmus e ração de peixe

| Amostra | Nitrogênio (mg/L) | Fósforo (mg/L) | TOC (mg/L) |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Controle | 1,20 ± 0,00 | 0,25 ± 0,01 | 13,89 ± 0,17 |
| Húmus | 16,10 ± 0,99 | 15,70 ± 0,39 | 39,22 ± 0,14 |
| Ração | 43,92 ± 0,54 | 43,83 ± 2,82 | 550,37 ± 1,92 |
| CONAMA* | ~13,0 | 0,025 | — |

* Valores referentes à água doce classe 1

Observa-se que, para todos os parâmetros, a ração de peixe apresentou valores muito mais elevados do que o húmus. Para o nitrogênio e o fósforo, as soluções com ração e húmus tiveram valores proporcionalmente próximos, sendo que a ração apresentou concentrações 63,3% e 64,2% mais elevadas do que a solução contendo húmus, respectivamente. Já a amostra com ração apresentou 92,9% a mais de conteúdo de carbono orgânico total do que a amostra contendo húmus.

Valores mais elevados dos citados parâmetros eram esperados para a ração de peixe, tendo-se em vista a tabela 4 apresentada pela EPA. Os valores apresentados para ração de truta, mais semelhante à ração para ciclídeos utilizada

nesse experimento, são de 43% de carbono, 36 mg/g de nitrogênio e 11 µg/g de fósforo. Em relação à turfa (mais semelhante ao húmus), esses valores foram de 47% de carbono, 4 mg/g de nitrogênio e 0,4 µg/g de fósforo. Com isso, observa-se que apenas para o nitrogênio e fósforo a ração de truta apresentou valores expressivamente mais elevados do que para a turfa. Porém, em relação ao conteúdo de carbono, os valores foram semelhantes em porcentagem para ambas as fontes de matéria orgânica.

Rodgher *et al.* (2005) avaliaram os teores de N e P ao longo dos reservatórios em cascata do Rio Tietê, sendo este o estudo de referência para a formulação dos sedimentos utilizados nesse trabalho. Os autores encontraram valores máximos de 5,5 mg/L de nitrogênio em amostragens do Rio Tietê em julho/2000 (época de estiagem) e 1,9 mg/L em fevereiro/2000 (época chuvosa). No reservatório Três Irmãos (base para a formulação dos sedimentos 4 e 5), esses valores foram de cerca de 0,7 e 1,3 mg/L de nitrogênio em julho/2000, à montante e à jusante, respectivamente.

Para o nitrogênio total, a resolução CONAMA nº 357/2005 apresenta valores máximos para água doce de classe 1 de cerca de 13 mg/L, somando-se o conteúdo de nitrato, nitrito e nitrogênio amoniacal total. Com isso, a solução contendo húmus apresenta-se mais próxima a esse valor (16,10 mg/L) e a solução contendo ração de peixe apresentou um valor muito mais elevado, de 43,92 mg/L.

Para o fósforo, Rodgher *et al.* (2005) encontraram valores máximos de 0,75 mg/L no Rio Piracicaba (em julho/2000) e 0,23 mg/L à jusante do reservatório de Barra Bonita, sendo que no reservatório Três Irmãos, esses valores foram de cerca de 0,04 mg/L à jusante e à montante, nas duas épocas do ano. Para a resolução CONAMA nº 357/2005, os teores máximos de fósforo para água doce de classe 1 é de 0,025 mg/L e de 0,075 mg/L para classe 3. Neste caso, o próprio controle apresentou valor mais elevado de fósforo, com 0,25 mg/L em água mineral reconstituída.

Muitos autores modificam o conteúdo de carbono do sedimento pois a quantidade de TOC tem se mostrado o maior determinante na biodisponibilidade de químicos orgânicos (DiToro *et al.*, 1991; DeWitt *et al.*, 1992; Kosian *et al.*, 1999). De acordo com Holthaus *et al.* (2002), maiores conteúdos de carbono orgânico foram associados com maiores coeficientes de distribuição em sedimentos, indicando

maiores propriedades de adsorção de compostos orgânicos. Sendo assim, é esperado que a biodisponibilidade dos estrógenos em ambiente com sedimento formulado utilizando a ração de peixe como fração orgânica seja significativamente menor do que em ambiente com húmus representando a matéria orgânica, devido ao acentuado valor de TOC do primeiro em relação ao segundo. Isso pode implicar em respostas muito diferentes em ensaios de toxicidade, apenas variando-se o tipo de matéria orgânica da formulação.

Os resultados obtidos de testes utilizando diferentes formas de matéria orgânica (com TOC modificado ou não) em sedimentos formulados devem ser interpretados com cuidado, pois são diversos os fatores que comprovadamente contribuem com diferentes respostas de comportamento, ligação e biodisponibilidade dos contaminantes nesses ambientes, afetando o equilíbrio do contaminante no compartimento água-sedimento. Dessa forma, modificações no conteúdo de TOC podem ser necessárias para alcançar determinados objetivos de estudo, como a representatividade de ambientes naturais.

Ressalta-se, portanto, a importância da realização de medições dos parâmetros citados, além de outros parâmetros físico-químicos, para sedimentos formulados com diferentes tipos de matéria orgânica, a fim de se observar a fonte mais adequada para a composição, ou seja, a que mais se aproxima das características de sedimentos naturais quanto a esses parâmetros.

Apenas os valores do controle (água reconstituída) foram equivalentes aos encontrados em ambientes naturais. Porém, deve-se ressaltar que, para uma comparação mais concreta, seria necessário realizar medições desses parâmetros nas regiões mais profundas dos ambientes aquáticos, ou mesmo da água intersticial extraída de sedimentos naturais, pois os valores obtidos da superfície dos corpos aquáticos não correspondem aos encontrados pelas amostras contendo ração de peixe e húmus, apresentando concentrações expressivamente mais elevadas.

5.4 Ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* utilizando água intersticial de sedimento formulado

O primeiro teste preliminar, em que foi utilizada água intersticial de amostras de sedimento extraída por centrifugação e sem filtração posterior, apresentou mortalidade de 90% dos organismos utilizados, demonstrando-se procedimento inadequado para o uso de *C. dubia*. A referida amostra apresentou aspecto viscoso e materiais em suspensão, o que pode ter desencadeado a alta mortalidade até o sétimo dia de experimento ecotoxicológico. Como citado nos tópicos anteriores, a matéria orgânica utilizada (ração de peixe Sera®) deve ter causado esse aspecto à água e, conseqüentemente, pode ter sido responsável pela alta letalidade dos organismos expostos.

Após ajustes com as amostras de água intersticial, que constituiu na filtração após a extração por centrifugação, foi verificada uma melhor aceitação por parte dos organismos-teste, evidenciada pela diminuição significativa da mortalidade (0%), com quantidade de filhotes equivalente ao controle contendo apenas água de cultivo (média de 4 neonatos por fêmea após 5 dias).

Com isso, prosseguiu-se com os testes definitivos utilizando o protocolo estabelecido para os estudos ecotoxicológicos, conforme descrito anteriormente.

5.4.1 Ensaio com água intersticial

O conteúdo de matéria orgânica utilizada nesse ensaio foi de 0,7% do peso total do sedimento, visto que em testes anteriores, estava causando efeito sobre a reprodução dos organismos.

Os valores dos parâmetros da solução do teste não apresentaram grandes flutuações no decorrer do experimento. As novas soluções para a preparação das soluções-teste e dos controles apresentaram dureza mínima de 43 e máxima de 47 mg CaCO₃/L, valores de pH entre 7,85 e 7,94, OD entre 8,33 e 10,12 mg/L e condutividade mínima de 179,1 e máxima de 191,5 µS/cm (tabela 23). Quanto às

soluções descartadas nas trocas de solução e desmontagem do teste, os valores de dureza foram levemente elevados para os controles CA e CAM, com valor máximo de 49 mg CaCO₃/L e valor mínimo de 38 mg CaCO₃/L para as soluções de CS e EE2. Apenas este parâmetro se mostrou fora do intervalo recomendado de 40 a 48 mg CaCO₃/L para cultivo de *C. dubia*, de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2010), porém a média permaneceu dentro deste intervalo. Os valores de pH sempre se apresentaram acima de 7,6, sendo este o valor máximo recomendado pela citada norma (entre 7,0 a 7,6). Entretanto, os organismos de *Ceriodaphnia dubia* estão sendo cultivados com a mesma água mineral utilizada para testes, a qual apresenta, naturalmente, valor de pH levemente básico, entre 7,8 e 8,1, e dureza entre 5 e 10 mg CaCO₃/L. Devido à adaptação dos organismos ao valor de pH levemente básico, optou-se pelo não ajuste da solução-teste para este parâmetro.

As soluções preparadas com água intersticial de sedimento (CS, E2 e EE2) apresentaram maiores valores de condutividade, sendo o máximo de 399,3 µS/cm para o EE2 na desmontagem do teste, e mínima de 186,49 µS/cm para o CAM na 2ª troca de solução (tabela 24). Os valores de OD permaneceram sempre acima de 4 mg/L, que é o recomendado para o cultivo destes organismos. Os parâmetros, no geral, apresentaram pouca variação no decorrer de 8 dias de experimento e permaneceram dentro ou próximos à faixa recomendada para a sobrevivência destes organismos, não apresentando influências negativas para a espécie.

Tabela 23: Condições da água de cultivo para o Teste 1

| Parâmetros | Montagem | 1ª Troca | 2ª Troca |
|----------------------------------|----------|----------|----------|
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 45 | 43 | 47 |
| pH | 7,91 | 7,94 | 7,85 |
| OD (mg/L) | 8,33 | 10,12 | 8,65 |
| Condutividade (µS/cm) | 179,1 | 184,2 | 191,5 |

Tabela 24: Condições das soluções descartadas do Teste 1

| Parâmetros | CA | CS | CAM | E2 | EE2 |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| 1ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 46 | 48 | 47 | 48 | 47 |
| pH | 7,82 | 7,66 | 8,12 | 7,85 | 7,77 |
| OD (mg/L) | 8,7 | 8,0 | 8,9 | 7,5 | 8,2 |
| Condutividade (µS/cm) | 217,0 | 384,9 | 215,5 | 428,3 | 383,6 |
| 2ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 44 | 38 | 44 | 39 | 38 |
| pH | 7,87 | 7,79 | 7,81 | 7,86 | 7,91 |
| OD (mg/L) | 6,81 | 7,59 | 6,29 | 4,98 | 5,18 |
| Condutividade (µS/cm) | 192,87 | 318,8 | 186,49 | 318,0 | 311,4 |
| Desmontagem | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 49 | 42 | 48 | 42 | 43 |
| pH | 7,96 | 7,56 | 8,13 | 7,82 | 7,66 |
| OD (mg/L) | 6,25 | 11,42 | 10,19 | 11,25 | 10,5 |
| Condutividade (µS/cm) | 196,0 | 338,7 | 197,26 | 349,3 | 399,3 |

O teste apresentou resultados satisfatórios para a geração parental em função da letalidade do controle ter sido inferior a 20% e de ter havido 15 filhotes ou mais produzidos em 60% no controle CA, o que indica que o teste pôde ser validado. Ao todo, apenas um organismo do controle CA, um organismo do CS e um do teste contaminado com E2 morreram (tabela 25). 60% dos organismos fêmeas do controle CA produziram 15 ou mais neonatos, assim como o CAM. Porém, observa-se que o número de neonatos do controle CS foi expressivamente inferior aos outros controles CA e CAM, os quais apresentaram média de 8,1, 16,22 e 16,9 neonatos gerados em 8 dias, respectivamente. Já as médias de neonatos encontradas para os testes contaminados com E2 e EE2 foram de, respectivamente, 4,4 e 5,6.

Tabela 25: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do Teste 1

| Réplica | CA | | CS | | CAM | | E2 | | EE2 | |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes |
| 1 | V | 14 | M | 7 | V | 16 | V | 7 | V | 5 |
| 2 | V | 15 | V | 2 | V | 15 | V | 2 | V | 7 |
| 3 | M | 0 | V | 6 | V | 16 | V | 3 | V | 8 |
| 4 | V | 13 | V | 5 | V | 17 | V | 5 | V | 10 |
| 5 | V | 20 | V | 8 | V | 17 | V | 3 | V | 5 |
| 6 | V | 13 | V | 10 | V | 16 | V | 6 | V | 6 |
| 7 | V | 21 | V | 11 | V | 14 | V | 5 | V | 3 |
| 8 | V | 19 | V | 15 | V | 16 | V | 4 | V | 4 |
| 9 | V | 15 | V | 10 | V | 23 | V | 5 | V | 3 |
| 10 | V | 16 | V | 7 | V | 19 | M | 0 | V | 5 |

V = vivo; M = morto

Com isso, notou-se que os organismos neonatos que nasceram no ambiente de água intersticial (geração F1) não se adaptaram ao meio e alguns foram encontrados mortos, não contabilizando no total de filhotes gerados (apenas os encontrados vivos). Além disso, o teste montado com a geração F1 mostrou-se inviável visto que, logo na primeira troca do experimento, restaram apenas 5 organismos vivos expostos ao EE2 e 3 organismos expostos ao E2, e 5 organismos do controle CS. Não houve produção de neonatos da geração F1 para os organismos expostos aos meios CS, E2 e EE2.

Para confirmar os resultados descritos, o teste acima foi repetido conforme as condições destacadas na tabela 26 para montagem e trocas de solução, sendo este denominado Teste 2.

Novamente, os valores dos parâmetros da solução do teste não apresentaram grandes flutuações no decorrer do experimento, sendo que os valores de dureza ficaram entre 41 e 42 mg CaCO₃/L para as montagens das soluções, com pH mínimo de 7,92 e máximo de 8,54, OD entre 6,96 e 13,62 mg/L e condutividade entre 172 e 179 µS/cm (tabela 26). Para as soluções descartadas nas trocas de solução e desmontagem do teste, os valores de dureza mínimo e máximo registrados foram de 42 e 48 mg CaCO₃/L, respectivamente, com pH entre 7,77 e 8,47, OD entre 4,26 e 8,10 mg/L, e condutividade mínima de 179,92 µS/cm (CAM) e máxima de 448 µS/cm (CS), conforme tabela 27. Os parâmetros se apresentaram

dentro da faixa aceitável para a sobrevivência dos organismos em estudo, não representando influência negativa sobre a toxicidade das amostras.

Tabela 26: Condições da água de cultivo para o Teste 2

| Parâmetros | Montagem | 1ª Troca | 2ª Troca |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 41 | 41 | 42 |
| pH | 8,54 | 8,15 | 7,92 |
| OD (mg/L) | 13,62 | 12,25 | 6,96 |
| Condutividade (µS/cm) | 178,74 | 173,45 | 172,31 |

Tabela 27: Condições das soluções descartadas do Teste 2

| Parâmetros | CA | CS | CAM | E2 | EE2 |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| 1ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 48 | 46 | 48 | 44 | 43 |
| pH | 8,15 | 7,93 | 8,12 | 7,82 | 7,89 |
| OD (mg/L) | 5,34 | 4,26 | 5,46 | 7,24 | 8,1 |
| Condutividade (µS/cm) | 191,87 | 386,3 | 189,53 | 395,1 | 418,1 |
| 2ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 48 | 46 | 48 | 46 | 46 |
| pH | 8,02 | 7,91 | 8,18 | 7,77 | 7,84 |
| OD (mg/L) | 5,51 | 5,68 | 4,98 | 6,39 | 5,26 |
| Condutividade (µS/cm) | 206,2 | 448,0 | 196,2 | 401,2 | 388,9 |
| Desmontagem | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 44 | 42 | 44 | 42 | 42 |
| pH | 7,99 | 8,09 | 8,47 | 8,27 | 7,93 |
| OD (mg/L) | 5,89 | 5,68 | 5,07 | 5,78 | 5,51 |
| Condutividade (µS/cm) | 186,63 | 354,4 | 179,92 | 396,9 | 359,5 |

O teste 2, igualmente, apresentou letalidade inferior a 20% e 15 filhotes ou mais produzidos em 60% do controle CA. No total, morreu um organismo das soluções CA, CS, CAM e E2 e 2 organismos da solução com EE2 (tabela 26). 60% dos organismos fêmeas do controle CAM também produziram 15 ou mais neonatos. Nessa réplica do Teste 1, observou-se que, novamente, o número de neonatos do controle CS foi inferior aos outros controles CA e CAM, os quais apresentaram uma média de 7,9, 17 e 17,6 filhotes gerados em 8 dias, respectivamente. As médias de neonatos encontradas para os testes contaminados com E2 e EE2 foram de, respectivamente, 5 e 4,7, excluindo-se os organismos mortos que não produziram filhotes.

Tabela 28: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do Teste 2 (réplica)

| Réplica | CA | | CS | | CAM | | E2 | | EE2 | |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes |
| 1 | V | 21 | M | 0 | V | 23 | V | 3 | V | 3 |
| 2 | M | 16 | V | 11 | V | 18 | V | 5 | V | 5 |
| 3 | V | 14 | V | 8 | V | 20 | V | 6 | M | 4 |
| 4 | V | 15 | V | 9 | V | 20 | V | 4 | V | 5 |
| 5 | V | 21 | V | 8 | V | 16 | V | 7 | V | 6 |
| 6 | V | 14 | V | 7 | V | 18 | V | 4 | V | 6 |
| 7 | V | 18 | V | 8 | V | 16 | V | 4 | V | 2 |
| 8 | V | 17 | V | 7 | M | 0 | V | 6 | V | 5 |
| 9 | V | 15 | V | 6 | V | 12 | V | 6 | V | 7 |
| 10 | V | 19 | V | 7 | V | 15 | M | 0 | M | 4 |

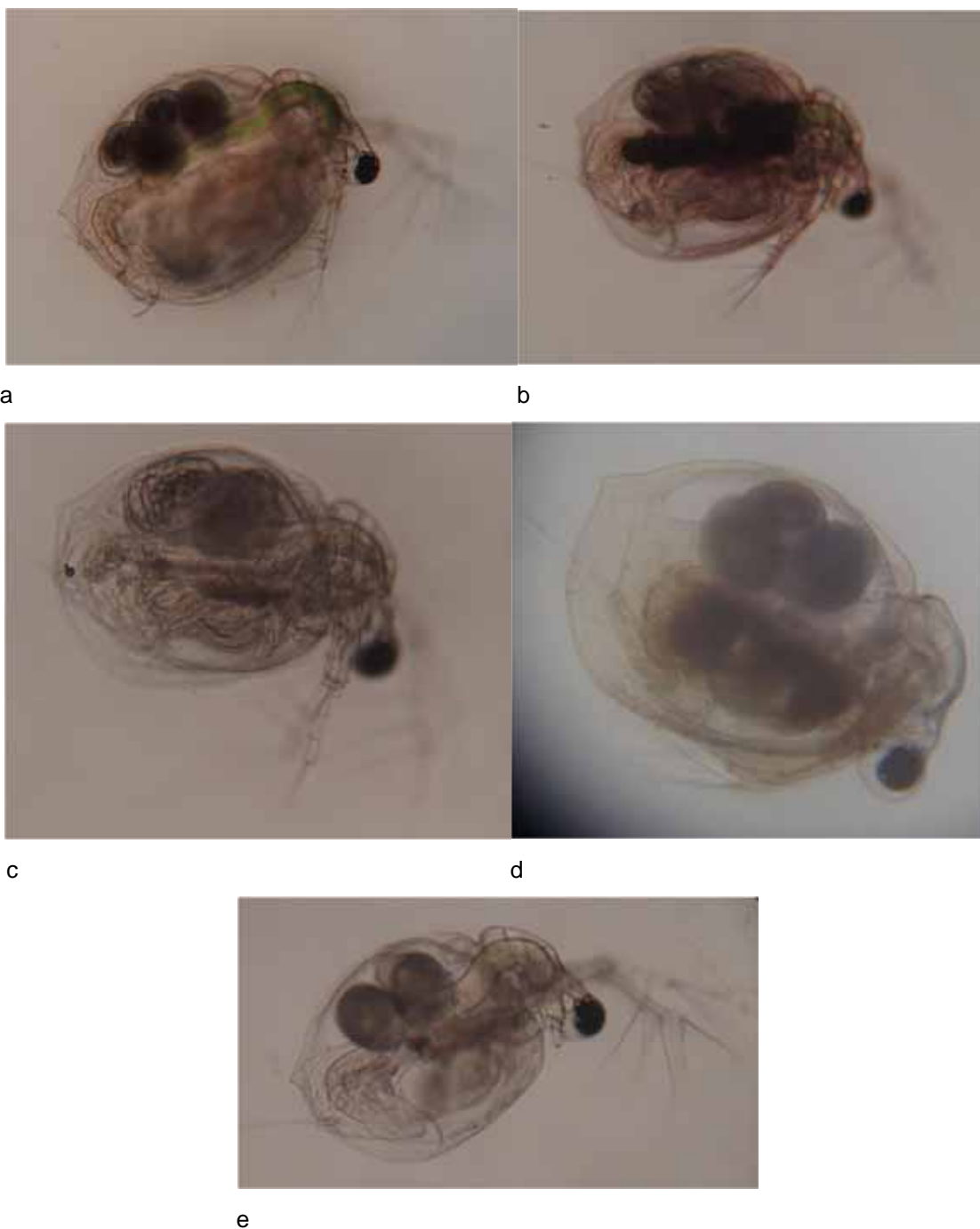
V = vivo; M = morto

Assim como notado no primeiro teste realizado, a geração F1 em contato com a água extraída de sedimento formulado não se mostrou bem adaptada e, ao final do teste, 90% dos organismos do controle CS haviam morrido, restando apenas 1 organismo vivo, assim como para os tratamento com E2 e EE2, em que 2 e 1 organismos sobreviveram. Igualmente, não houve produção de filhote da geração F1 para os organismos expostos aos meios CS, E2 e EE2, confirmando que a solução-teste necessita de ajustes para a adequação de sobrevivência e reprodução de *C. dubia*.

Ambos os testes 1 e 2 puderam ser validados de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2010).

Foi notada uma grande diferença no tamanho dos organismos expostos à água intersticial, sendo que estes apresentaram-se visivelmente menores do que os organismos comuns e expostos aos controles CA e CAM. Pode-se perceber que os controles CA e CAM apresentaram uma aparência saudável, com o trato digestivo com coloração verde pela alimentação com algas. Além do tamanho, a diferença na cor também foi notada, sendo os organismos dos testes CS, E2 e EE2 aparentemente mais pálidos do que os outros do CA e CAM, conforme ilustra a figura 26.

Figura 26: Imagens de microscópio óptico com amostras de adultos da espécie *Ceriodaphnia dubia* a cada tratamento fornecido: a) Controle CA; b) Controle CAM; c) Controle CS; d) Tratamento com EE2; e) Tratamento com E2



Fonte: arquivo pessoal

A aparência dos organismos foi uniforme entre as réplicas e seguiu o mesmo padrão para o Teste 1 e o Teste 2.

5.4.2 Ensaio de toxicidade com IE: sistema *top down*

Os valores dos parâmetros da água mineral reconstituída para a montagem das soluções do sistema *top down* estiveram de acordo com os testes realizados previamente com *C. dubia*, com dureza entre 43 e 44 mg CaCO₃/L, pH máximo de 8,11, OD acima de 4 mg/L e condutividade máxima de 193,77 µS/cm (tabela 29).

Tabela 29: Condições da água de cultivo para o teste sistema *top down*

| Parâmetros da nova solução | Montagem | 1ª Troca | 2ª Troca |
|----------------------------------|----------|----------|----------|
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 44 | 43 | 44 |
| pH | 8,11 | 7,91 | 8,05 |
| OD (mg/L) | 8,93 | 9,44 | 10,5 |
| Condutividade (µS/cm) | 180,42 | 185,96 | 193,77 |

Os parâmetros das soluções descartadas apresentaram valores de dureza variando de 45 a 56 mg CaCO₃/L, sendo valores até 48 mg CaCO₃/L considerados satisfatórios de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2010) para cultivo de *C. dubia*. Porém, por se tratar de sedimento contendo matéria orgânica, é comum que esses valores sejam mais elevados, como pode ser observado para as soluções CS, E2 e EE2. O OD ficou acima de 5 mg/L para todas as amostras e o pH máximo foi de 8,26 (CAM), sendo o restante valores satisfatórios em relação à água de cultivo que tende a apresentar valores sempre acima de 7 ou até acima de 8. Os parâmetros das soluções descartadas estão apresentadas na tabela 30.

Tabela 30: Condições das soluções descartadas do teste sistema *top down*

| Parâmetros | CA | CS | CAM | E2 | EE2 |
|----------------------------------|--------|-------|--------|-------|-------|
| 1ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 46 | 56 | 47 | 54 | 54 |
| pH | 8,22 | 8,25 | 8,21 | 8,1 | 8,04 |
| OD (mg/L) | 6,66 | 7,3 | 8,14 | 6,39 | 6,09 |
| Condutividade (µS/cm) | 201,2 | 303,3 | 193,99 | 369,9 | 323,1 |
| 2ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 46 | 55 | 46 | 55 | 54 |
| pH | 8,25 | 8,19 | 8,26 | 8,08 | 8,15 |
| OD (mg/L) | 5,6 | 6,77 | 6,45 | 7,26 | 7,12 |
| Condutividade (µS/cm) | 204,6 | 295,2 | 203,8 | 336,5 | 391,9 |
| Desmontagem | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 45 | 54 | 45 | 54 | 55 |
| pH | 8,03 | 7,82 | 7,93 | 7,68 | 7,87 |
| OD (mg/L) | 12,58 | 10,71 | 9,91 | 9,32 | 10,18 |
| Condutividade (µS/cm) | 195,45 | 270,5 | 186,79 | 320,0 | 370,6 |

Este ensaio apresentou média de neonatos de 19,11 (CA), 2,14 (CS), 15,9 (CAM), 1,9 (E2) e 1,3 (EE2), descontando-se os valores de zero apresentados pela geração parental com letalidade. Observa-se uma grande taxa de letalidade dos organismos expostos às soluções de CS (letalidade de 90%), E2 (letalidade de 80%) e EE2 (letalidade de 60%), não estando clara a razão para este comportamento, já que foi observado em ensaios anteriores que as soluções extraídas de sedimento formulado não causavam letalidade. A tabela 31 apresenta estes resultados.

Tabela 31: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do teste sistema *top down*

| Réplica | CA | | CS | | CAM | | E2 | | EE2 | |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes |
| 1 | V | 20 | M | 2 | V | 17 | M | 3 | M | 3 |
| 2 | V | 25 | V | 0 | V | 13 | V | 1 | V | 2 |
| 3 | V | 16 | M | 4 | V | 15 | M | 2 | V | 2 |
| 4 | V | 16 | M | 0 | V | 17 | M | 3 | M | 1 |
| 5 | V | 16 | M | 2 | M | 9 | M | 1 | M | 0 |
| 6 | V | 22 | M | 2 | V | 16 | M | 0 | V | 0 |
| 7 | V | 19 | M | 3 | V | 19 | M | 2 | M | 0 |
| 8 | V | 24 | M | 0 | V | 18 | V | 0 | V | 0 |
| 9 | V | 19 | M | 0 | V | 14 | M | 3 | M | 1 |
| 10 | V | 14 | M | 2 | V | 21 | M | 2 | M | 0 |

Da mesma forma que nos testes preliminares com água intersticial (testes 1 e 2), os organismos apresentaram tamanhos e coloração diferenciada entre os tratamentos CS, E2 e EE2 com relação aos controles CA e CAM .

5.4.3 Ensaio de toxicidade com IE: sistema *bottom up*

A água mineral reconstituída utilizada para o preparo das soluções-teste para o sistema *bottom up* apresentou valores dos parâmetros constantes na tabela 32. Como nos ensaios prévios, a dureza permaneceu dentro da faixa recomendada, assim como o OD e a condutividade. Os valores de pH ficaram entre 8,05 e 8,24.

Tabela 32: Condições da água de cultivo para o teste sistema *bottom up*

| Parâmetros da nova solução | Montagem | 1ª Troca | 2ª Troca |
|----------------------------------|----------|----------|----------|
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 44 | 46 | 44 |
| pH | 8,05 | 8,24 | 8,21 |
| OD (mg/L) | 10,5 | 6,37 | 8,93 |
| Condutividade (µS/cm) | 193,77 | 180 | 180,42 |

Quanto aos parâmetros das soluções descartadas, a dureza variou de 46 a 49 mg CaCO₃/L, sendo estes valores satisfatórios de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2010). Observa-se que, por se tratar de amostras coletadas na superfície do recipiente-teste (e não com o sedimento), esses valores foram mais baixos do que os encontrados nos ensaios anteriormente citados. O OD ficou acima de 6 mg/L para todas as amostras e o pH máximo foi de 7,95 (CA). Os parâmetros das soluções descartadas estão apresentadas na tabela 33.

Tabela 33: Condições das soluções descartadas do teste sistema *bottom up*

| Parâmetros | CA | CS | CAM | E2 | EE2 |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| 1ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 48 | 47 | 48 | 47 | 47 |
| pH | 7.89 | 7.69 | 7.79 | 7.73 | 7.74 |
| OD (mg/L) | 7.02 | 8.59 | 7.85 | 8.23 | 10.58 |
| Condutividade (µS/cm) | 205.8 | 306.2 | 206.9 | 371.6 | 298.1 |
| 2ª Troca | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 46 | 48 | 46 | 47 | 46 |
| pH | 7.95 | 7.84 | 7.94 | 7.82 | 7.75 |
| OD (mg/L) | 10.56 | 10.21 | 7.83 | 6.74 | 8.81 |
| Condutividade (µS/cm) | 195.38 | 313.5 | 193.17 | 307.7 | 306.1 |
| Desmontagem | | | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 48 | 48 | 48 | 48 | 49 |
| pH | 7.8 | 7.78 | 7.77 | 7.85 | 7.85 |
| OD (mg/L) | 7.02 | 10.87 | 9.57 | 9.62 | 9.64 |
| Condutividade (µS/cm) | 192.79 | 288.1 | 194.42 | 302.6 | 373.6 |

O ensaio apresentou letalidade de 20% no controle (CA) e média de 16,44 neonatos (descontando-se o organismo morto que não gerou filhotes). Com relação à sobrevivência, 80% dos organismos do CS sobreviveram, assim como para o controle CAM. Para os tratamentos com E2 e EE2, todos os organismos sobreviveram ao final de 8 dias de experimento. Porém, quanto ao número de neonatos, novamente o CS apresentou baixos valores, com média de 2,44 filhotes. O E2 e EE2 apresentaram médias de 2,6 e 1,8 neonatos, respectivamente. A tabela 34 apresenta os resultados de sobrevivência e número médio de neonatos produzidos para o teste sistema *bottom up*.

Tabela 34: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do teste sistema *bottom up*

| Réplica | CA | | CS | | CAM | | E2 | | EE2 | |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes |
| 1 | V | 13 | M | 0 | V | 12 | V | 3 | V | 1 |
| 2 | V | 20 | V | 3 | V | 18 | V | 3 | V | 3 |
| 3 | V | 9 | V | 4 | V | 24 | V | 0 | V | 1 |
| 4 | V | 17 | M | 1 | M | 16 | V | 3 | V | 0 |
| 5 | M | 0 | V | 3 | V | 12 | V | 3 | V | 3 |
| 6 | V | 25 | V | 3 | V | 23 | V | 5 | V | 3 |
| 7 | V | 12 | V | 0 | V | 22 | V | 2 | V | 4 |
| 8 | M | 12 | V | 2 | V | 15 | V | 2 | V | 0 |
| 9 | V | 26 | V | 4 | V | 7 | V | 2 | V | 1 |
| 10 | V | 14 | V | 2 | M | 13 | V | 3 | V | 2 |

Observa-se que, mesmo coletando-se a solução da superfície do sistema simulando sedimento e coluna de água, o sedimento exerceu influência na qualidade dos organismos, visto que os que foram expostos ao CS, E2 e EE2 continuaram a produzir número reduzido de neonatos.

O objetivo dos ensaios toxicológicos foi de determinar se a concentração utilizada dos contaminantes pode causar ou não efeito sobre a população da espécie de *C. dubia*, avaliando possíveis efeitos tóxicos das frações biodisponíveis presentes no sedimento. Porém, como pode ser observado pelos testes 1, 2, *top down* e *bottom up*, os organismos do controle CS, sem contaminação, apresentaram baixo número de neonatos, indicando a necessidade de novos ajustes metodológicos para ensaio de toxicidade crônica com *C. dubia*. É possível que a mesma formulação de sedimento e tratamento empregado (agitação, centrifugação e filtração) seja aplicável a ensaios de toxicidade aguda (48 horas), avaliando-se apenas a sobrevivência.

Como a solução-teste foi filtrada, é improvável que a queda na qualidade dos organismos expostos ao CS e demais soluções extraídas do sedimento tenha ocorrido devido a partículas em suspensão, causando o entupimento da carapaça, por se tratar de uma espécie filtradora não-seletiva. Logo, o mais provável é que tenha ocorrido efeito negativo aos organismos decorrente dos altos níveis de N e P, conforme mostrado no item 5.3.3. Os resultados para a verificação da adaptação quanto à sobrevivência e número de neonatos gerados a sedimento contendo outro tipo de matéria orgânica está apresentado no item 5.4.4.

5.4.4 Teste de verificação para comparação de matéria orgânica

Nesse experimento, para 200g de sedimento foram usados 1,5 g de matéria orgânica (ração macerada ou húmus seco em estufa a 30°C por 15 horas) esperando-se obter menores teores de nitrogênio e fósforo nas soluções. Assim como nos ensaios anteriores, os organismos juvenis utilizados foram provenientes de adultos com idade de 0 a 7 dias.

A tabela 35 apresenta os parâmetros iniciais da água de cultivo para a montagem do experimento. Nota-se que são valores semelhantes aos obtidos anteriormente, sendo aceitáveis para as condições de ensaio com o organismo-teste: dureza entre 45 e 46, pH máximo de 7,9, OD acima de 8 mg/L e condutividade de até 188,62 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Tabela 35: Condições da água de cultivo para montagem e trocas do ensaio com ração de peixe e húmus

| Parâmetros | Montagem | 1ª Troca | 2ª Troca |
|---|----------|----------|----------|
| Dureza (mg CaCO_3/L) | 45 | 46 | 46 |
| pH | 7,8 | 7,9 | 7,8 |
| OD (mg/L) | 10,40 | 8,81 | 7,93 |
| Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | 188,62 | 166,30 | 156,96 |

Os parâmetros medidos das soluções descartadas apresentaram diferenças acentuadas quanto à dureza, sendo que a solução contendo húmus sempre se manteve com valores mais elevados do que a solução contendo ração de peixe. O máximo valor foi de 66 mg CaCO_3/L no descarte da primeira troca do teste e mínimo de 52 mg CaCO_3/L para a segunda troca e desmontagem do teste (SR). Observa-se que o OD do teste SR apresentou valores inferiores em relação ao controle CA e ao teste SH, em todos os descartes, podendo ser um comportamento relativo à degradação aeróbica do material orgânico. Esse mesmo comportamento pode ser observado para o pH, em que se mostrou levemente inferior ao CA e SH para todos os descartes. Já o SH apresentou valores semelhantes ao controle para pH e OD, sendo este um fator favorável a este material (húmus). Com relação à condutividade, as soluções de SR mostraram valores sempre mais elevados do que as soluções de SH, como pode ser observado pela tabela 36.

Tabela 36: Condições das soluções descartadas do ensaio com ração de peixe e húmus

| Parâmetros | CA | SR | SH |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 1ª Troca | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 47 | 58 | 66 |
| pH | 7,8 | 7,6 | 7,6 |
| OD (mg/L) | 10,72 | 8,82 | 10,20 |
| Condutividade (µS/cm) | 166,4 | 487,5 | 386,2 |
| 2ª Troca | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 47 | 52 | 62 |
| pH | 7,9 | 7,5 | 7,9 |
| OD (mg/L) | 7,7 | 5,8 | 7,72 |
| Condutividade (µS/cm) | 177,88 | 464,9 | 370,6 |
| Desmontagem | | | |
| Dureza (mg CaCO ₃ /L) | 47 | 52 | 63 |
| pH | 7,6 | 7,3 | 7,6 |
| OD (mg/L) | 7,81 | 5,05 | 7,57 |
| Condutividade (µS/cm) | 173,1 | 443,6 | 419,1 |

Este ensaio revelou um comportamento importante dos organismos com relação às amostras a que foram submetidos. Observa-se pela tabela 37 que os organismos do controle CA apresentaram número de neonatos muito semelhante ao que pode ser notado no teste com húmus (SH), com médias de 15,8 e 16,7 neonatos, respectivamente. Novamente, os organismos de SR (que seria o mesmo tratamento de CS nos testes anteriores), apresentaram valores baixos de neonatos, com média de 2,25, descontando-se os organismos mortos (tabela 37).

Tabela 37: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do ensaio com ração de peixe e húmus

| Réplica | CA | | SR | | SH | |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes | V ou M | n° filhotes |
| 1 | V | 15 | V | 2 | V | 14 |
| 2 | V | 23 | V | 4 | V | 21 |
| 3 | V | 17 | M | 1 | V | 15 |
| 4 | V | 17 | V | 2 | V | 17 |
| 5 | V | 15 | V | 2 | V | 15 |
| 6 | M | 10 | V | 4 | V | 15 |
| 7 | V | 14 | M | 0 | V | 14 |
| 8 | V | 14 | V | 1 | V | 15 |
| 9 | M | 14 | M | 0 | V | 18 |
| 10 | V | 19 | V | 1 | V | 18 |

Nota-se ainda que a solução SH não apresentou letalidade aos organismos expostos e a média de neonatos foi superior à do CA. Quanto à aparência, os adultos do tratamento SH se mostraram semelhantes aos do controle CA, o que revela, dentre todos os fatores, que o húmus se mostrou adequado quanto ao uso na composição de sedimento formulado para aplicação em ensaios com *Ceriodaphnia dubia*.

Os fatores para a reprodução de um ambiente natural, como as diferentes escolhas para o material orgânico, podem interferir em resultados de diversas maneiras, como a lenta decomposição da matéria orgânica, valores de pH mais ácidos e até no comportamento de sobrevivência e geração de neonatos pelos organismos, como pode ser observado nos testes toxicológicos. De acordo com USEPA (2001), a formulação de sedimento deve ser viável à sobrevivência, crescimento e reprodução de organismos bentônicos, não sendo o ocorrido no presente caso.

Diversos autores, além da USEPA (2001), consideram a matéria orgânica um componente crítico em sedimentos formulados, desde que não está claro se existe um tipo superior aos outros, além de que a própria representação de ambientes naturais pode variar em tipo e estrutura de material orgânico.

5.4.5 Teste com todo o sedimento e húmus

A tabela 38 apresenta os resultados obtidos com o ensaio utilizando todo o sedimento com húmus na composição. São notáveis os altos valores de neonatos produzidos no ambiente em questão, com média de $25,67 \pm 1,37$, sendo os maiores valores registrados durante os ensaios deste trabalho. Não foi observada letalidade e os parâmetros químicos permaneceram estáveis, com pH variando de 7,7 a 7,9, OD entre 7,56 e 10,51 mg/L e condutividade mínima de 271 e máxima de 286 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Para a medição da dureza, ao final do experimento, foram misturadas as soluções dos 6 recipientes, resultando em 60 mg CaCO_3/L .

Tabela 38: Sobrevivência e número total de neonatos em 8 dias de experimento do ensaio com todo o sedimento e parâmetros da água

| Réplica | V ou M | n° filhotes | pH | OD (mg/L) | Condutividade (µS/cm) |
|---------|--------|-------------|-----|-----------|-----------------------|
| 1 | V | 24 | 7,9 | 8,12 | 273 |
| 2 | V | 25 | 7,9 | 10,51 | 281 |
| 3 | V | 25 | 7,8 | 9,65 | 283 |
| 4 | V | 26 | 7,8 | 7,56 | 277 |
| 5 | V | 28 | 7,7 | 8,66 | 271 |
| 6 | V | 26 | 7,7 | 8,24 | 286 |

Todos os organismos apresentaram aspecto saudável, com coloração e tamanho normais, diferentemente do aspecto dos organismos observados nos ensaios com água intersticial de sedimento utilizando ração de peixe (figuras 26 c, d, e). Dessa forma, o presente protocolo de formulação de sedimento, utilizando húmus como matéria orgânica, pode ser recomendado para aplicação em ensaios de toxicidade crônica com a espécie *Ceriodaphnia dubia*.

5.4.6 Análise estatística

De acordo com as análises estatísticas, pelo método de Kruskal-Wallis em relação ao número de neonatos gerados por fêmea, observa-se que houve diferenças significativas com relação aos controles CA e CAM e os dois tratamentos com os contaminantes, para o primeiro teste e sua réplica, como pode ser visto na tabela 39. Como era esperado, devido ao baixo número de neonatos gerados, o controle CS não apresentou diferenças significativas entre os testes contaminados com E2 e EE2, sendo um tratamento que apresenta toxicidade aos organismos, mesmo sem sua contaminação. Porém, o CS também não apresentou diferença significativa com relação aos controles CA (testes 1 e 2) e CAM (teste 2), estando em um nível intermediário entre os controles CA e CAM (com maior número de filhotes) e os testes contaminados (contendo menos filhotes), como também pode ser observado pelos gráficos da figura 27. Para os tratamentos *bottom up* e *top down*, as diferenças significativas entre os tratamentos foram idênticas, não havendo diferenças apenas entre os tratamentos CA e CAM, CS e E2, CS e EE2, e E2 com

EE2. Com isso, pode ser observado que os valores de neonatos entre esses tratamentos foram semelhantes, apresentando toxicidade em relação aos controles os tratamentos CS, E2 e EE2 dos testes *bottom up* e *top down*.

Tabela 39: Diferenças significativas detectadas pelo método estatístico de Kruskal-Wallis para os testes 1 e 2, *bottom up* e *top down*

| Pares de tratamento | Teste 1 | Teste 2 | Top down | Bottom up |
|----------------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| CA x CS | ns | ns | p < 0,05 | p < 0,05 |
| CA x CAM | ns | ns | ns | ns |
| CA x E2 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 |
| CA x EE2 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 |
| CS x CAM | p < 0,05 | ns | p < 0,05 | p < 0,05 |
| CS x E2 | ns | ns | ns | ns |
| CS x EE2 | ns | ns | ns | ns |
| CAM x E2 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 |
| CAM x EE2 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 | p < 0,05 |
| E2 x EE2 | ns | ns | ns | ns |

ns: não significativo

Para o ensaio comparativo de matéria orgânica (ração de peixe e húmus), o método estatístico de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença significativa entre os tratamentos do controle CA com a solução contendo ração de peixe SR, e entre as soluções de SR com SH, contendo húmus (tabela 40).

Tabela 40: Diferenças significativas detectadas pelo método estatístico de Kruskal-Wallis para o experimento com diferentes MO

| Tratamento | Teste MO |
|-------------------|-----------------|
| CA x SR | p < 0.05 |
| CA x SH | ns |
| SR x SH | p < 0.05 |

Comparando-se as análises estatísticas empregadas, é interessante notar que praticamente todas as análises comparadas com o controle CA apresentaram o mesmo resultado, seja com diferença significativa ou não, exceto entre CA e CS dos testes 1 e 2 e CA e CAM do experimento *top down* (tabela 41). Com relação ao primeiro, pode-se observar que o método de Kruskal-Wallis apresentou maior tolerância na comparação entre os pares, não apresentando diferença significativa

entre CA e CS, sendo que até mesmo o teste t de bioequivalência, que é corrigido com o fator “b” para apresentar uma faixa maior de aceitabilidade entre as médias de neonatos ao considerar uma amostra tóxica ou não, resultou em diferença significativa para este par de soluções.

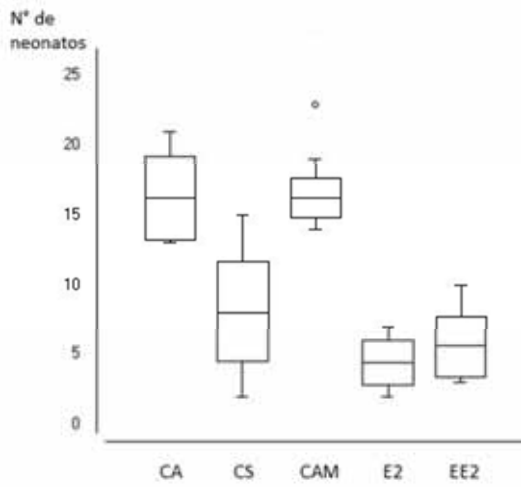
Com isso, pode-se inferir que o método de análise estatística de Kruskal-Wallis pode apresentar erros ao predizer quando uma amostra se apresenta não tóxica, quando na verdade pode apresentar toxicidade, se analisada sob a perspectiva da importância ecológica do resultado e comparada com o teste de bioequivalência.

Tabela 41: Comparação entre os métodos estatísticos empregados: Kruskal-Wallis (análise de variância não paramétrico), teste t e teste t com bioequivalência

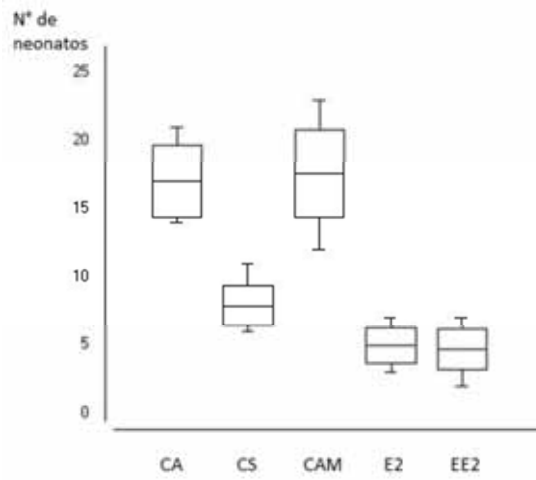
| Teste | Tratamento | Kruskal-Wallis | Teste t | Bioequivalência (B = 0.79) |
|------------------|------------|----------------|------------|----------------------------|
| Testes 1 e 2 | CA x CS | ns | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x CAM | ns | ns | ns |
| | CA x E2 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x EE2 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| <i>Top down</i> | CA x CS | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x CAM | ns | $p < 0.05$ | ns |
| | CA x E2 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x EE2 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| <i>Bottom up</i> | CA x CS | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x CAM | ns | ns | ns |
| | CA x E2 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x EE2 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| Teste MO | CA x SR | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| | CA x SH | ns | ns | ns |

A figura 27 apresenta gráficos boxplot para a média de neonatos produzidos em cada tratamento, representando as aproximações do controle CS com os tratamentos contaminados com E2 e EE2.

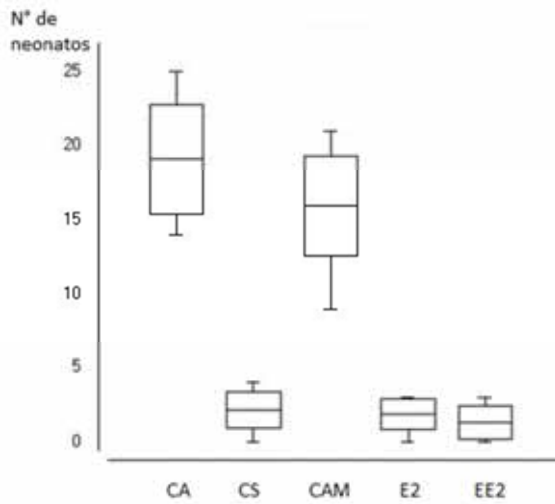
Figura 27: Gráficos representativos das médias de neonatos gerados por fêmeas de cada tratamento do experimento a) Teste 1; b) Teste 2; c) Top down; d) Bottom up; e) MO



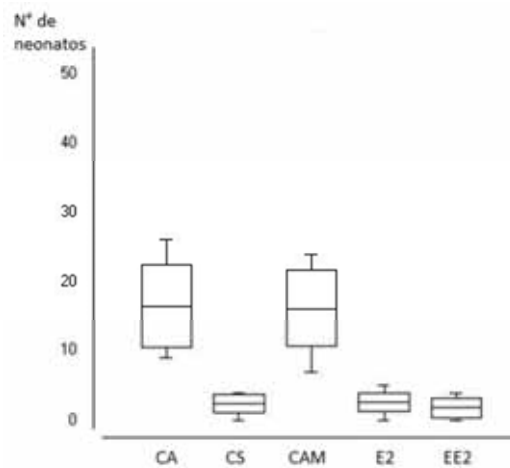
a



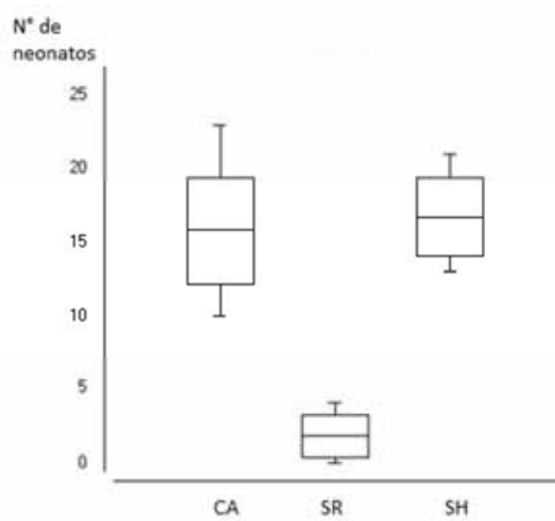
b



c



d



e

É interessante notar que o controle utilizando metanol (CAM) proporcionou uma média um pouco maior de neonatos que o controle utilizando apenas água de cultivo (CA) nos testes 1 e 2 e no ensaio *bottom up*. Este comportamento foi observado também em outros experimentos com controle utilizando metanol, em mesma quantidade, no mesmo laboratório e com a mesma espécie, sendo possível que a presença desta substância, ainda que em concentração ínfima, possa agir como estimulante na reprodução dos organismos, atuando de forma aparentemente benéfica ao desenvolvimento e geração de filhotes de *Ceriodaphnia dubia*.

De acordo com Adams *et al.* (2001), a interpretação de resultados de testes com água intersticial precisa ser bem avaliada. Em 2001 essa questão era considerada de importância crítica para avaliação ambiental e monitoramento nos EUA, havendo ainda várias questões a serem elucidadas, como o melhor entendimento da relação entre concentração de compostos químicos nos sedimentos e na água intersticial e sua toxicidade, espécie indicadora mais apropriada para esse tipo de teste e os principais fatores toxicológicos a serem analisados para prever impactos na fauna bentônica.

Poucos dados estão disponíveis acerca da toxicologia de estrógenos em invertebrados aquáticos. Ainda assim, Jukosky *et al.* (2008) atestaram que não houve efeitos significativos na sobrevivência e reprodução de *Ceriodaphnia dubia* em ensaio de 7 dias em água, utilizando concentrações de 0,005 mg/L a 1 mg/L de E2 e EE2 (10^6 vezes a concentração que causou efeitos na reprodução de diversas espécies de peixe). Os autores relataram que o teste de toxicidade crônica com a citada espécie pode não ser uma ferramenta adequada para o monitoramento de efeito de hormônios sobre a biota aquática, a menos que outros parâmetros sejam analisados, como taxa de maturação, frequência de muda e frequência do sexo dos neonatos. Porém, sabe-se que as condições ambientais influenciam tanto no comportamento dos organismos como dos compostos químicos e, dessa forma, entende-se que nas condições de diferentes soluções (com parâmetros de dureza, nitrogênio, TOC, tamanho de partículas, quantidade e tipo de argila, entre outros), a resposta biológica pode ser diferente.

Segundo Zagatto (2008), é importante que sejam realizados estudos para validação dos testes de toxicidade, no sentido de extrapolar os resultados obtidos em laboratório para amostras ambientais, seja de efluentes ou de amostras de rios e

outros corpos receptores. Isso se faz necessário, segundo o autor, devido a diversos fatores ambientais como OD na água, disponibilidade de alimento, variabilidade natural da estrutura da comunidade aquática, a qualidade da água que pode tornar o poluente mais ou menos biodisponível, dentre muitos outros fatores. Em estudos de validação, em que se pretende correlacionar resultados de testes laboratoriais com as comunidades biológicas, tem sido notado que os testes de toxicidade com espécies representativas apresentam significado ecológico para o ambiente aquático e representam ferramenta necessária para o monitoramento da qualidade das águas e controle de efluentes líquidos, com a finalidade de proteger a vida aquática (Zagatto, 2008).

5.5 Determinação do tempo de degradação e capacidade de retenção dos IE ao sedimento formulado por cromatografia gasosa

As concentrações dos estrógenos encontradas nas soluções em contato com os sedimentos contaminados neste trabalho foram maiores do que o esperado, tendo sido observadas também em outros trabalhos nesse laboratório com água contaminada. A razão para esse fenômeno não está clara; contudo, pode ter havido erro no preparo da solução padrão ou durante a preparação das outras soluções de diluição, ou ainda ter ocorrido interferências analíticas.

Os controles (sedimento sem contaminação) e os testes contaminados apenas com EE2 apresentaram altas concentrações do estrógeno 17 β -estradiol e estrona (E1) em alguns casos, com valores inferiores aos dos testes contaminados com este hormônio. Porém, em nenhum controle foi detectada a presença do 17 α -etinilestradiol e nem nas amostras de E2. Algumas hipóteses estão listadas abaixo:

- a) A solução estoque de EE2 (concentração de 1 g/L em metanol) foi contaminada com E2 durante seu preparo;
- b) Houve contaminação dos cartuchos ou outros materiais durante o manuseio na preparação das amostras (porém, não justifica as altas concentrações);
- c) Houve contaminação devido a alguns materiais não serem descartáveis, como as peças integrantes do manifold, na etapa de SPE;

- d) Pode ocorrer a presença de hormônios na ração de peixe, utilizada aqui como matéria orgânica do sedimento e, portanto, presente em todos os testes com sedimento.

5.5.1 Tempo de degradação dos IE

O experimento do tempo de degradação permitiu observar uma forte tendência de degradação dos estrógenos E2 e EE2 com o passar do tempo, mesmo com o experimento sendo feito no escuro (agitação e repouso). Contudo, a diminuição da disponibilidade dos hormônios na fração líquida também se deve à adsorção ao sedimento, conforme apresentado mais adiante (item 5.5.2).

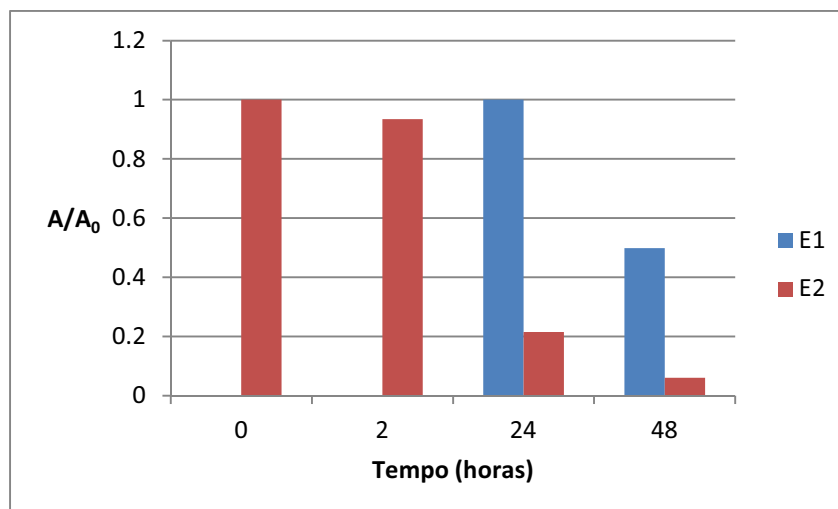
Através dos valores de área dos picos cromatográficos obtidos por GC-MS, foram traçados gráficos que representassem a transformação dos estrógenos detectados em relação ao tempo de exposição, no modelo A/A_0 (sendo A_0 a concentração inicial no tempo 0, antes de entrar em contato com o sedimento, e A a concentração no tempo correspondente).

O experimento com o E2 mostrou que, com 2 horas de agitação em sedimento, a concentração diminuiu 6,6% em relação à concentração inicial, ou parte das moléculas ficaram adsorvidas ao sedimento. Após 24 horas, a concentração diminuiu para 21,5% da concentração inicial de E2 e surgiu a Estrona (E1), subproduto de degradação do estradiol (E2).

Após 48 horas, a concentração presente de E2 diminuiu para 6,0% da inicial, e a concentração de E1 também diminuiu a uma taxa de 50,1% em relação à sua concentração com 24h de agitação. Essa queda no valor de E1 pode ser explicada pela maior probabilidade de ter ocorrido adsorção da estrona ao sedimento, tornando-o menos disponível no compartimento aquático. Não foi detectada a presença de estriol (subproduto de degradação da estrona), que poderia estar presente com maior tempo de experimento (5 dias ou mais).

A figura 28 mostra a relação das concentrações de E2 com a inicial em função do tempo de exposição, e o surgimento do E1 após 24 horas de agitação.

Figura 28: Gráfico de decaimento da concentração de E2 em sedimento formulado em função do tempo de exposição

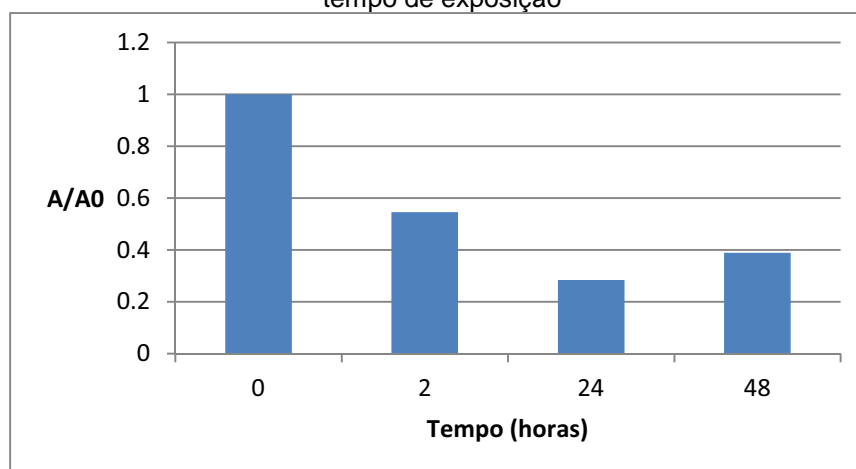


Fonte: autoria própria

Para o experimento com EE2, com apenas 2 horas de agitação, 45,5% do conteúdo do composto diminuiu em relação ao conteúdo inicial, possivelmente tendo sido em maior parte adsorvido ao sedimento.

Após 24 horas, a concentração de EE2 diminuiu para 28,5% da original. Após 48 horas, houve um aumento em relação à concentração encontrada com 24h de experimento, com 39,0% da concentração inicial (0 hora), podendo ter ocorrido a dessorção das moléculas aderidas ao sedimento. A figura 29 mostra a relação das concentrações de EE2 com a inicial em função do tempo de exposição.

Figura 29: Gráfico de decaimento da concentração de EE2 em sedimento formulado em função do tempo de exposição



Fonte: autoria própria

Neste gráfico, fica claro o decaimento da concentração de EE2 no meio aquoso, podendo ter sido causado pela degradação das moléculas com o passar do tempo ou mesmo pela adsorção ao sedimento.

De acordo com a tabela 3, a constante de sorção do EE2 é maior que do E2, sendo de 4.770 e 3.300, respectivamente, o que pode ser notado pelas maiores taxas de decaimento nas concentrações disponíveis do primeiro em relação ao segundo em água intersticial.

O processo de degradação, o qual consiste na conversão de uma substância química de estrutura complexa em moléculas mais simples, pode ser causado por processo biótico ou abiótico. A degradação biótica, ou biodegradação, se fundamenta na ação de microorganismos presentes no ambiente que utilizam as substâncias como substrato para obter a energia necessária à sua sobrevivência, crescimento e metabolismo. Já a degradação abiótica se faz através de transformações químicas como a fotólise, oxidação/redução, hidrólise e reações de troca iônica (Buratini, 2008). No presente experimento, o mais provável é que tenha ocorrido degradação por microorganismos, principalmente, já que as substâncias em estudo possuem elevada característica hidrofóbica, sendo improvável que sofram degradação por hidrólise. Além disso, os experimentos foram conduzidos no escuro (agitação em incubadora fechada), o que descarta a possibilidade de degradação por fotólise.

Geralmente, a biodegradação de compostos orgânicos é um processo decorrente da participação de uma cadeia de microorganismos que atua em sinergia. Espera-se que a população microbiológica estabelecida neste experimento seja bem restrita em termos quantitativos de espécie. A biodegradabilidade, que é a capacidade de um composto ser suscetível à ação microbiológica, é influenciada pelas características físicas do composto (como solubilidade em água e pressão de vapor), pelas características químicas (massa e estrutura molecular, grupos funcionais), e pela disponibilidade de microorganismos adequados presentes no ambiente (Buratini, 2008). Fatores como concentração no substrato e propriedades físico-químicas do composto (volatilidade, solubilidade em água, tendência à adsorção em partículas sólidas) influenciam na velocidade e eficácia da biodegradação de substâncias orgânicas. Além disso, fatores relativos aos

microorganismos são igualmente relevantes, como a composição da população e densidade microbiológica.

Com isso, destaca-se como de relevada importância a determinação da presença microbiológica estabelecida no sedimento formulado nos períodos de condicionamento utilizados (2, 24 e 48 horas), mesmo para comparar com o conteúdo presente em sedimentos naturais e possibilitar uma melhor aferência a estes ambientes.

5.5.2 Capacidade de retenção dos IE ao sedimento formulado

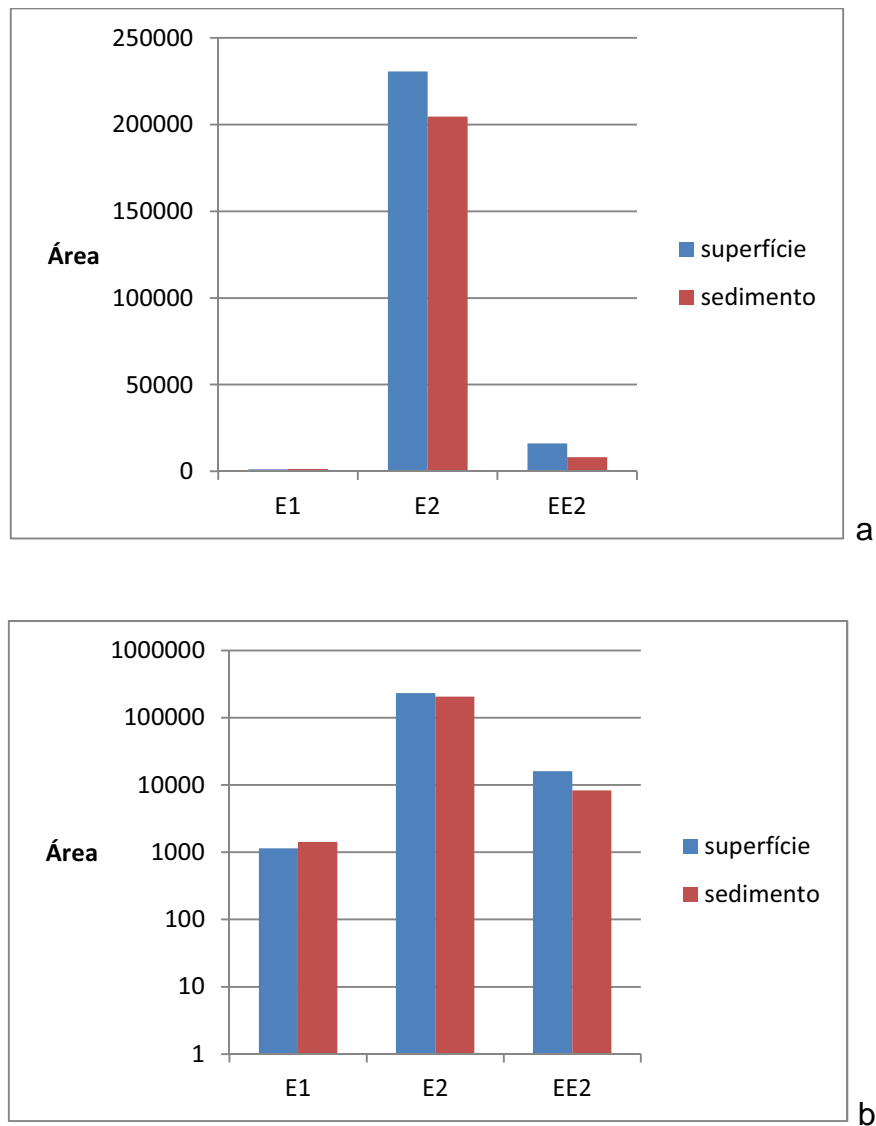
A concentração dos hormônios encontrados tanto na água intersticial como na superfície do recipiente foi muito semelhante (figura 30). Esperava-se que, próximo ao sedimento, a concentração seria maior que na superfície devido à decantação, adsorção, etc. Porém, observou-se que nos casos do E2 e EE2 suas concentrações foram levemente menores no sedimento. Isso pode ter sido ocasionado pelo tempo de agitação (2 horas) e de descanso (1 hora), o qual não foi suficiente para que as moléculas decantassem e sedimentassem, explicando sua homogeneidade ao longo da coluna do recipiente-teste. Por outro lado, as menores concentrações desses hormônios encontradas na água intersticial pode ser devido a uma rápida taxa de adsorção ao sedimento, deixando esses compostos menos disponíveis no compartimento água mais próxima ao sedimento. Portanto, seria válida a recomendação de um novo experimento contemplando as seguintes observações:

- a) Com o mesmo tempo de agitação (2 horas) e fazendo-se uma lavagem do sedimento centrifugado com solvente, a fim de se determinar a quantidade realmente adsorvida nesse período;
- b) Com tempo prolongado de agitação e repouso, para que o contato da água contaminada com o sedimento seja mais realístico, pretendendo-se verificar maiores taxas dos compostos na água intersticial e menores concentrações na superfície, como ocorre em ambientes naturais com contaminantes diversos, em que as concentrações próximas ao sedimento tendem a ser expressivamente maiores.

Yu e Wu (2012) extraíram interferentes endócrinos de materiais sólidos por extração ultrassônica e afirmaram que poucos estudos mediram IE presente em matrizes sólidas, como lodo de esgoto, solo e sedimento. Xu *et al.* (2008) recuperaram fármacos e IE diversos utilizando extração ultrassônica com acetona e acetato de etila.

A figura 30 expressa os valores de área dos picos cromatográficos obtidos por GC-MS para E1, E2 e EE2, após 2 horas de agitação e 1 hora de repouso.

Figura 30: Gráfico de disponibilidade do conteúdo de E2 e EE2 na água superficial e na água intersticial com sedimento formulado após 2 horas de agitação: a) escala decimal; b) escala logarítmica na base 10



Fonte: autoria própria

Considerando-se os valores de áreas iniciais de E2 e EE2 (tempo 0), observou-se que, para o E2, esse valor diminuiu para 56% na superfície e para 50% próximo ao sedimento, em relação à concentração inicial. Para o EE2, esses valores diminuíram para 34% na água superficial e 18% na água intersticial. Isso vai de encontro com a maior capacidade de retenção do EE2 ao sedimento.

Holthaus *et al.* (2002) investigaram o potencial de sorção de E2 e EE2 em sedimento suspenso e de fundo, coletado de rios britânicos, indicando que a sorção a sedimentos de fundo está mais associada com o tamanho da partícula. Gilroy *et al.* (2012) indicaram que, devido à sua alta hidrofobicidade, o etinilestradiol pode estar menos disponível na presença de sedimento (pois estaria adsorvido em grande parte), se comparado com ensaios de toxicidade contendo apenas água, o que contribui para a redução na biodisponibilidade e toxicidade para organismos bentônicos em estudos com sedimento.

É sabido que o E2 e E1 possuem curta meia-vida sob condições aeróbicas em rios (Jürgens *et al.*, 2002). Nesse sentido, Holthaus *et al.* (2002) discutiram que o E2 é particularmente suscetível à biodegradação sob condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas em sedimentos e, dessa forma, seria improvável que se acumulasse nesse compartimento. Já o E1 poderia persistir em sedimentos anaeróbicos, conforme sugerido por Jürgens *et al.* (2002) em experimento de curta duração com microcosmo.

Se o EE2, que é mais resistente à biodegradação, pode ser preservado, sua biodisponibilidade deve ser melhor estabelecida. Holthaus *et al.* (2002) concluíram que o potencial do EE2 em estabelecer ligações e persistir em sedimentos naturais deve receber mais atenção. Dessa forma, o comportamento de degradação e ligação a partículas de sedimento (natural ou formulado) para este estrógeno deve ser mais estudado, a fim de atestar a capacidade de biodisponibilidade deste contaminante a diversas classes de organismos.

De acordo com Silva *et al.* (2012), o parâmetro K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água) está relacionado com o S_w (solubilidade em água), coeficientes de adsorção e fatores de biodisponibilidade para organismos aquáticos, para compostos orgânicos. Assim, compostos químicos com altos valores de K_{ow} (maiores que 104) são considerados altamente hidrofóbicos e possuem elevado potencial de sorção a particulados sólidos (Jones-Lepp e Stevens, 2007). Ao

contrário, baixos valores de K_{ow} (menor que 10) podem ser considerados relativamente hidrofílicos e tendem a ter altos valores de S_w , baixo coeficiente de adsorção em solo/sedimento e baixos fatores de bioconcentração para vida aquática.

A falta de entendimento sobre características físico-químicas de sedimentos naturais, que interferem na biodisponibilidade de contaminantes, dificulta a utilização em larga escala de sedimentos formulados em avaliação de riscos ecológicos. Embora seja difícil fazer uma referência a sedimentos naturais através de sedimentos sintéticos, levando-se em conta todas as suas propriedades que podem afetar a biodisponibilidade de contaminantes, os sedimentos formulados exercem grandes vantagens em relação aos naturais, podendo ser facilmente replicados em diferentes laboratórios. Além disso, o uso de sedimentos formulados é recomendado pelas mais importantes agências ambientais (OECD, USEPA, ASTM). Contudo, não foram encontrados trabalhos que utilizassem sedimentos formulados para estudo do comportamento de contaminantes emergentes (CECs) e, visto o atual contexto e ocorrência em corpos de água no mundo todo, fica registrada esta grande recomendação. Baseando-se em estudos sobre a urgência do estudo de poluentes IE, os hormônios estrógenos sintéticos e naturais são os que merecem maior atenção atualmente, a fim de que sejam regulamentados limites em corpos de água e sedimentos para a proteção da vida dos organismos que vivem nestes ambientes.

6. CONCLUSÃO

Em relação ao experimento para a padronização da formulação de sedimento a ser utilizado nos testes ecotoxicológicos, a formulação 4 (40% areia grossa, 40% areia média, 10% areia fina e 10% argila caulinita) com 1% de matéria orgânica e as formulações 5 como um todo (10% areia grossa, 10% areia média, 70% areia fina e 10% argila caulinita), com 1 e 3% de MO, se mostraram adequadas, apresentando uma rápida estabilidade dos parâmetros recomendados em normas de ensaios ecotoxicológicos. As formulações 4 e 5 estão aptas à aplicação em experimentos com *Hyalella azteca*, não tendo sido observadas variações significativas dentro dos parâmetros sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos, requeridos por normas nacionais e internacionais. Contudo, a mesma formulação 5, contendo ração de peixe representando a matéria orgânica, não foi viável à aplicação em testes toxicológicos com o organismo-teste *Ceriodaphnia dubia* devido à detecção de toxicidade aguda e crônica para as gerações parental e F1, mesmo sem a adição de contaminantes. Ao se trocar o tipo de matéria orgânica, utilizando-se todo o sedimento com húmus, os resultados se mostraram satisfatórios à aplicação em ensaios ecotoxicológicos com *C. dubia* por apresentar altos valores de neonatos e aparência saudável.

Testes com argilas esmectitas revelaram altos teores de metais biodisponíveis, apresentando um potencial natural de causar toxicidade a organismos expostos, não sendo propício seu emprego em testes ecotoxicológicos. Por outro lado, o sedimento formulado e a argila caulinita não apresentaram quantidades elevadas dos metais quantificados, exceto pelos teores de alumínio e manganês encontrados livres na fase aquosa do experimento, mas que não são considerados significativamente elevados levando-se em conta os valores máximos permitidos pela resolução CONAMA nº 357/2005. Assim, o sedimento formulado e, principalmente a argila caulinita, apresentaram adequação para aplicação em ensaios ecotoxicológicos quanto a esses parâmetros.

Os resultados de degradação e adsorção dos hormônios aos sedimento formulado confirmaram uma maior taxa de adsorção do EE2 em relação ao E2, apresentando concentrações muito menores após 2 horas de agitação, revelando uma baixa biodisponibilidade aos organismos em ensaios ecotoxicológicos. O E2 apresentou menor taxa de adsorção, porém se degradou após 24 horas em contato com sedimento e surgiu seu subproduto, E1. Dessa forma, estima-se que os organismos expostos a sedimentos contaminados sofreram efeitos referentes a menores concentrações do que a concentração teórica da solução-teste, além de estarem expostos também ao E1 após 24 horas da montagem e troca dos testes.

Os parâmetros considerados importantes pela USEPA (2001) para avaliação de compostos orgânicos em sedimentos foram analisados nesse trabalho (N, P, TOC, pH e condutividade), revelando valores discrepantes para as diferentes fontes de matéria orgânica testadas, sendo que a solução contendo ração de peixe apresentou valores expressivamente elevados para os parâmetros nitrogênio total, fósforo total e TOC em relação à solução contendo húmus.

O presente trabalho propôs realizar ensaios que simulassem a realidade de ambientes naturais, com a mesma concentração dos contaminantes encontrada nos ambientes aquáticos, visando verificar se existe uma resposta adversa observável nas espécies utilizadas. Com isso, espera-se que os resultados sirvam de base à determinação de limites ambientalmente aceitáveis para essas substâncias, especialmente no Estado de São Paulo, onde a concentração populacional é a maior do país e onde estão presentes importantes polos da indústria química, de modo a garantir que tais limites não serão prejudiciais às espécies mais sensíveis, com o objetivo de priorizar a proteção da vida aquática.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É importante citar algumas recomendações para complementação deste trabalho, o que poderá servir de base para a tomada de decisões futuras:

- Comparação de dados de toxicidade e quantidade de TOC, N e P com sedimentos formulados e naturais coletados em pontos espaçados ao longo do Sistema Tietê e contaminados em laboratório, visando validar os testes quanto à representatividade;
- Realizar testes de degradação das moléculas e capacidade de retenção (adsorção) ao sedimento composto com húmus como matéria orgânica, e também com amostras de sedimentos naturais para comparação de comportamento, uma vez que fatores como atividade biológica, redox e teor de carbono orgânico alteram algumas propriedades de sorção e dessorção de contaminantes em sedimentos;
- Realização de lavagem com solvente de sedimentos naturais e formulados (contaminados e condicionados), para o conhecimento da capacidade de adsorção dos contaminantes;
- Avaliação da toxicidade dos IE sob as mesmas concentrações utilizadas neste trabalho (30 ng/L) para outros grupos animais, como alga, anfípodas e peixes, para verificar possíveis efeitos dessas substâncias em diferentes classes da cadeia trófica;
- Avaliação da aplicação de alfa celulose sintética como fonte de matéria orgânica em estudos químicos e toxicológicos, visto que é recomendada por diversos autores como sendo uma fonte promissora de MO por apresentar características padronizadas e por ser aceita por organismos diversos;
- Avaliação da toxicidade dos IE sobre *C. dubia* utilizando-se todo o sedimento contendo húmus;
- Adoção do parâmetro tamanho dos organismos *C. dubia* para avaliação de características do organismo-teste, medido em área através de *software* como ImageJ.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. J. *et al.* **Summary of the SETAC Workshop on “Porewater Toxicity Testing: Biological, Chemical, and Ecological Considerations with a Review of Methods and Applications, and Recommendations for Future Areas of Research.** Pensacola: SETAC Press, 2001. 29 p.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic Toxicology Test Methods. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Orgs.). . **Handbook of Ecotoxicology.** 2a. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003. p. 19–43.

ALEGRE, Gabriel Fonseca. **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do rio Tietê, entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP.** Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-22092011-094743/>>. Acesso em: 13 dez. 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **E1706-05: Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminantes with Freshwater Invertebrates.** West Conshohocken: ASTM International, 2010. 120 p.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Orgs.). . **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações.** 2a. ed. São Carlos: Editora Rima, 2008. p. 117–152.

ARAÚJO, Rosalina Pereira de Almeida *et al.* Testes com Invertebrados para Avaliar a Toxicidade de Contaminantes Associados ao Sedimento de Ecossistemas de Água Doce. In: MOZETO, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F. (Orgs.). . **Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaios Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce.** 1a. ed. São Carlos: Editora Cubo, 2006. p. 112–133.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6502: Rochas e Solos.** Rio de Janeiro: ABNT, 1995. 18 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648: Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica: Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).** Rio de Janeiro: ABNT, 2011. 28 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373: Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade crônica: Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro: ABNT, 2010. 23 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15470: Ecotoxicologia Aquática: Toxicidade em sedimento: Método de ensaios com *Hyalella spp* (Amphipoda)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2007. 20 p.

AYRES, M. *et al.* **BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: MCT, 2007. 364 p.

BAREL-COHEN, Keren *et al.* Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management** v. 78, n. 1, p. 16–23, jan. 2006.

BEGIN, R.; RACINE, T.; ROY, J. C. Value of capillary blood gas analyses in the management of acute respiratory distress. **The American Review of Respiratory Disease** PMID: 936, v. 112, n. 6, p. 879–881, dez. 1975.

BELL, Katherine Y. *et al.* Emerging Pollutants. **Water Environment Research** v. 83, n. 10, p. 1906–1984, 1 jan. 2011.

BERTOLETTI, E. *et al.* Selection of Relevant Effect Levels for Using Bioequivalence Hypothesis Testing. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 2, n. 2, p. 139–145, 2007.

BERTOLETTI, E.; BURATINI, V. A. Análise Estatística. In: BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. (Orgs.). **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2a. ed. São Carlos: Editora Rima, 2008. p. 221–249.

BERTOLETTI, Eduardo; ZAGATTO, Pedro Antonio. Aplicações dos Ensaio Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2a. ed. São Carlos: Editora Rima, 2008. p. 347–382.

BESSER, John M. *et al.* Effects of organic amendments on the toxicity and bioavailability of cadmium and copper in spiked formulated sediments. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 22, n. 4, p. 805–815, abr. 2003.

BLACK, Marsha C. *et al.* Continued Toxicity in Trail Creek Sediments One Year after the Industrial Fire. In: GEORGIA WATER RESOURCES, GWRI2013. Water Quality Issues, abr. 2013, Athens. **Anais...** Athens: Georgia Institute of Technology, abr. 2013. Disponível em: <<https://smartech.gatech.edu/handle/1853/51495>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

BORGMANN, Uwe *et al.* Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 24, n. 3, p. 641–652, mar. 2005.

BOTTA, Clarice Maria Rispoli *et al.* Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) de Amostras de Sedimento de Água Doce. In: MOZETO, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F. (Orgs.). **Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce**. 1a. ed. São Carlos: Editora Cubo, 2006. p. 135–159.

BRAGA, O. *et al.* Steroid estrogens in ocean sediments. **Chemosphere** v. 61, n. 6, p. 827–833 , nov. 2005.

BRÖNMARK, Christer; HANSSON, Lars-Anders. Environmental issues in lakes and ponds: current state and perspectives. **Environmental Conservation**, n. 03, p. 290–307 , set. 2002.

BURATINI, V. A. Biodegradação. In: BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. (Orgs.). . **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2a. ed. São Carlos: Editora Rima, 2008. p. 221–249.

BURTON, G. A. Jr. *et al.* Sediment toxicity testing: issues and methods. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Orgs.). . **Handbook of Ecotoxicology**. 2a. ed. Washington: CRC Press LLC, 2003. p. 111–150.

CALDAS, Sergiane Souza *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova** v. 34, n. 9, p. 1604–1617 , set. 2011.

CAMPAGNA, A. **Estudos Limnológicos e Ecotoxicológicos da Bacia do Alto Jacaré-Guaçu com Ênfase no Desenvolvimento de Sedimentos Artificiais para Avaliação da Toxicidade do Cromo**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. **EPC-98E: Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. Winnipeg: CCME, 2002.

CANTWELL, Mark G.; BURGESS, Robert M.; KING, John W. Resuspension of contaminated field and formulated reference sediments Part I: Evaluation of metal release under controlled laboratory conditions. **Chemosphere** v. 73, n. 11, p. 1824–1831 , dez. 2008.

CHOI, Seul Min; YOO, Sun Dong; LEE, Byung Mu. Toxicological Characteristics of Endocrine-Disrupting Chemicals: Developmental Toxicity, Carcinogenicity, and Mutagenicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B** v. 7, n. 1, p. 1–23 , 1 jan. 2004.

CICEK, Nazim *et al.* Removal of selected natural and synthetic estrogenic compounds in a Canadian full-scale municipal wastewater treatment plant. **Water Environment Research: A Research Publication of the Water Environment Federation** v. 79, n. 7, p. 795–800 , jul. 2007.

COFALLA, Catrina *et al.* A combined hydraulic and toxicological approach to assess re-suspended sediments during simulated flood events—part II: an interdisciplinary experimental methodology. **Journal of Soils and Sediments** v. 12, n. 3, p. 429–442, 1 mar. 2012.

COMISSÃO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE - CONAMA. *Resolução n° 344, de 25 de março de 2004. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências*. [S.l.]: Diário Oficial União. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>>. Acesso em: 13 dez. 2014. , 2004

COMISSÃO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE - CONAMA. *Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA*. [S.l.]: Diário Oficial União. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>>. Acesso em: 13 dez. 2014. , 2011

COMISSÃO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE - CONAMA. *Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. [S.l.]: Diário Oficial União. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 13 dez. 2014. , 2005

CREUSOT, Nicolas *et al.* Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** v. 405, n. 8, p. 2553–2566, mar. 2013.

DALLEGRAVE, A. **Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS**. Dissertação – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

DE ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography. A** v. 938, n. 1-2, p. 145–153, 14 dez. 2001.

DEWITT, Theodore H. *et al.* **Development of a Chronic Sediment Toxicity Test for Marine Benthic Amphipods**. Newport: U. S. Environmental Protection Agency, 1992.

DIAMOND, Jerome M. *et al.* Prioritizing contaminants of emerging concern for ecological screening assessments. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 30, n. 11, p. 2385–2394, nov. 2011.

DICKERSON, R. L. *et al.* Dose-response relationships. In: KENDALL, R. J. *et al.* (Orgs.). **Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife**. Pensacola: SETAC Press, 1998. p. 69–96.

DI TORO, Dominic M. *et al.* Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 10, n. 12, p. 1541–1583, 1991.

DOIG, Lorne E.; LIBER, Karsten. Nickel partitioning in formulated and natural freshwater sediments. **Chemosphere** v. 62, n. 6, p. 968–979, fev. 2006.

EBA, F. *et al.* Evaluation of the absorption capacity of the natural clay from Bikougou (Gabon) to remove Mn (II) from aqueous solution. **International Journal of Engineering Science and Technology** v. 2, p. 5001–5016, 2010.

FILHO, R. W. R. **Hormônios estrógenos no Rio do Monjolinho, São Carlos - SP: uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais.** Dissertação – Universidade de São Paulo, 2008.

FLEMING, Rachel J.; HOLMES, Dawn; NIXON, Samantha J. Toxicity of permethrin to *Chironomus riparius* in artificial and natural sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 17, n. 7, p. 1332–1337, 1998.

FOLMAR, L.C *et al.* Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology** v. 49, n. 1-2, p. 77–88, maio 2000.

FRACÁCIO, Renata *et al.* A comparative study of different diets to optimize cultivation of *Hyalella azteca* in the laboratory. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 74, n. 6, p. 1615–1618, set. 2011.

FRACÁCIO, Renata. **Utilização de Bioensaios com *Danio rerio* (Cypriniformes Cyprinidae) e Análises Limnológicas para a Avaliação Ambiental dos Reservatórios do Médio e Baixo Tietê (SP).** Dissertação – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

FRANZEN, Julia *et al.* Organic carbon source in formulated sediments influences life traits and gene expression of *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology (London, England)** v. 21, n. 2, p. 557–568, mar. 2012.

FROMME, Hermann *et al.* Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water Research** v. 36, n. 6, p. 1429–1438, mar. 2002.

FUCHSMAN, Phyllis C.; BARBER, Timothy R. Spiked Sediment Toxicity Testing of Hydrophobic Organic Chemicals: Bioavailability, Technical Considerations, and Applications. **Journal of Soil Contamination** v. 9, n. 3, p. 197–218, 1 maio 2000.

GÁMIZ, E. *et al.* Relationships between chemico-mineralogical composition and color properties in selected natural and calcined Spanish kaolins. **Applied Clay Science EUROCLAY 2003.** v. 28, n. 1–4, p. 269–282, jan. 2005.

GANNON, John E.; BEETON, A. M. Procedures for Determining the Effects of Dredged Sediments on Biota: Benthos Viability and Sediment Selectivity Tests. **Journal (Water Pollution Control Federation)** p. 392–398, 1971.

GILROY, Ève A. M. *et al.* Behaviour of pharmaceuticals in spiked lake sediments – Effects and interactions with benthic invertebrates. **Chemosphere** v. 86, n. 6, p. 578–584, fev. 2012.

GIMENO, Sylvia *et al.* Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. **Aquatic Toxicology** v. 43, n. 2–3, p. 93–109, 1 out. 1998.

GONG, Jian *et al.* Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China. **Marine Pollution Bulletin** v. 63, n. 5–12, p. 556–563, 2011.

GONZALEZ, Adrian M. A Retrospective Assessment of Artificial, Formulated and Synthetic Sediment. **Annals of Environmental Science** v. 6, n. 1, p. 6, 2012.

GRATZER, Hermann; AHLF, Wolfgang. Adjustment of a formulated sediment for sediment testing with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). **Acta hydrochimica et hydrobiologica** v. 29, n. 1, p. 41–46, 2001.

GROSS, T. S. *et al.* Endocrine Disruption Chemicals and Endocrine Active Agents. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Orgs.). . **Handbook of Ecotoxicology**. 2a. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.

GRUND, Stefanie *et al.* The endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) as revealed by in vitro bioassays and chemical analysis. **Environmental Science and Pollution Research** v. 18, n. 3, p. 446–460, 2011.

HADERLEIN, Stefan B.; WEISSMAHR, Kenneth W.; SCHWARZENBACH, René P. Specific Adsorption of Nitroaromatic Explosives and Pesticides to Clay Minerals. **Environmental Science & Technology** v. 30, n. 2, p. 612–622, 1996.

HALLING-SØRENSEN, B. *et al.* Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere** v. 36, n. 2, p. 357–393, jan. 1998.

HAN, Jie; QIU, Wei; GAO, Wei. Adsorption of estrone in microfiltration membrane filters. **Chemical Engineering Journal** v. 165, n. 3, p. 819–826, 15 dez. 2010.

HANSON, Niklas; ÅBERG, Per; SUNDELÖF, Andreas. Population-level effects of male-biased broods in eelpout (*Zoarces viviparus*). **Environmental toxicology and chemistry** v. 24, n. 5, p. 1235–1241, 2005.

HARRAHY, Elisabeth A.; CLEMENTS, William H. Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 16, n. 2, p. 317–327, 1997.

HEATH, E. *et al.* Second interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drug analysis in environmental aqueous samples. **Talanta** v. 81, n. 4-5, p. 1189–1196, 15 jun. 2010.

HIGLEY, Eric *et al.* Endocrine disrupting, mutagenic, and teratogenic effects of upper Danube River sediments using effect-directed analysis. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 31, n. 5, p. 1053–1062, maio 2012.

HOFFMAN, David J. Wildlife toxicity testing. In: HOFFMAN, D. J. *et al.* (Orgs.). . **Handbook of Ecotoxicology**. 2a. ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 2003.

HOLBECH, Henrik *et al.* Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** v. 144, n. 1, p. 57–66, set. 2006.

HOLMES, Robert W. *et al.* Statewide Investigation of the Role of Pyrethroid Pesticides in Sediment Toxicity in California's Urban Waterways. **Environmental Science & Technology** v. 42, n. 18, p. 7003–7009, 2008.

HOLTHAUS, Karlijn I. E. *et al.* The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 21, n. 12, p. 2526–2535, dez. 2002.

IPARRAGUIRRE, Arantza *et al.* Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** v. 401, n. 1, p. 339–352, jul. 2011.

JÄRVISALO, J.; SARIS, N. E. Action of propranolol on mitochondrial functions--effects on energized ion fluxes in the presence of valinomycin. **Biochemical Pharmacology** PMID: 13, v. 24, n. 18, p. 1701–1705, 15 set. 1975.

JOBLING, Susan; TYLER, Charles R. Introduction: the ecological relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. **Environmental health perspectives** v. 114, n. Suppl 1, p. 7, 2006.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. D. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **The Science of the Total Environment** v. 256, n. 2-3, p. 163–173, 10 jul. 2000.

JONES-LEPP, T. L.; STEVENS, Rick. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** v. 387, n. 4, p. 1173–1183, 1 fev. 2007.

JUKOSKY, James A.; WATZIN, Mary C.; LEITER, James C. Elevated concentrations of ethinylestradiol, 17beta-estradiol, and medroxyprogesterone have little effect on reproduction and survival of *Ceriodaphnia dubia*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** v. 81, n. 3, p. 230–235, set. 2008.

JURGENS. M. D.; JOHNSON. A. C.; WILLIAMS. R. J. **In Fate and Behavior of Steroid Oestrogens in Rivers: A Scoping Study**. , n° P161. London: Environment Agency, 1999.

KAKALI, G *et al.* Thermal treatment of kaolin: the effect of mineralogy on the pozzolanic activity. **Applied Clay Science** v. 20, n. 1–2, p. 73–80, set. 2001.

KEMBLE, Nile E. *et al.* Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 18, n. 2, p. 222–230, 1999.

KENDALL, Ronald J.; BROUWER, A.; GIESY, John P. A risk-based field and laboratory approach to assess endocrine disruption in wildlife. In: KENDALL, R. J. *et al.* (Orgs.). . **Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife**. Pensacola: SETAC Press, 1998. p. 1–16.

KIM, Sunmi *et al.* In vitro and in vivo toxicities of sediment and surface water in an area near a major steel industry of Korea: endocrine disruption, reproduction, or survival effects combined with instrumental analysis. **The Science of the Total Environment** v. 470-471, p. 1509–1516, 1 fev. 2014.

KNAPP, Daniel R. **Handbook of Analytical Derivatization Reactions**. 1 edition ed. New York: Wiley-Interscience, 1979. 768 p.

KNÖRR, Susanne; BRAUNBECK, Thomas. Decline in Reproductive Success, Sex Reversal, and Developmental Alterations in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) after Continuous Exposure to Octylphenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 51, n. 3, p. 187–196, mar. 2002.

KOENIGS, J. W. Hydrogen peroxide and iron: a microbial cellulolytic system? **Biotechnology and Bioengineering Symposium** PMID: 97, n. 5, p. 151–159, 1975.

KOSIAN, Patricia A. *et al.* Use of nonpolar resin for reduction of fluoranthene bioavailability in sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 18, n. 2, p. 201–206, 1999.

KRAAK, G. V. D. *et al.* Comparative endocrinology and mechanisms of endocrine modulation in fish and wildlife. In: KENDALL, R. J. *et al.* (Orgs.). . **Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife**. Pensacola: SETAC Press, 1998. p. 97–119.

KUMIRSKA, Jolanta *et al.* Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography. A** v. 1296, p. 164–178, 28 jun. 2013.

LABADIE, Pierre; HILL, Elizabeth M. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry: Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1141, n. 2, p. 174–181, 9 fev. 2007.

LAI, K. M. *et al.* Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. **Environmental Science & Technology** v. 34, n. 18, p. 3890–3894, 2000.

LASIER, P. J.; WINGER, P. V.; BOGENRIEDER, K. J. Toxicity of manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v. 38, n. 3, p. 298–304, abr. 2000.

LEE, Ching-Chang *et al.* The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. **Chemosphere** v. 91, n. 7, p. 904–911, maio 2013.

LEEUWEN, C. J.; VERMEIRE, T. G. (Orgs.). **Risk Assessment of Chemicals: An Introduction**. 2a. ed. [S.l.]: Springer, 2007. 686 p. Disponível em: <<http://www.springer.com/environment/environmental+chemistry/book/978-1-4020-6101-1>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

LINTELMANN, J. *et al.* Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry** v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LIU, Qinfu; SPEARS, D. A.; LIU, Qinpu. MAS NMR study of surface-modified calcined kaolin. **Applied Clay Science Surface Modification of Clay Minerals**. v. 19, n. 1–6, p. 89–94, jul. 2001.

LOPES, Laudicéia G. *et al.* Estrogens in natural and treated waters in the region of Jaboticabal - São paulo, Brazil. **Química Nova** v. 33, n. 3, p. 639–643, jan. 2010.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, F. J.; ROSALES-MARCANO, M.; RUBIO, S. Restricted access property supramolecular solvents for combined microextraction of endocrine disruptors in sediment and sample cleanup prior to their quantification by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A** v. 1303, p. 1–8, 16 ago. 2013.

MACHADO, Karina Scurupa. **Determinação de hormônios sexuais femininos na Bacia do Alto Iguaçu, Região Metropolitana de Curitiba-PR**. Dissertação – Universidade Federal do Paraná, 2010. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/26942>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

MARNIEMI, J.; PARKKI, M. G. Radiochemical assay of glutathione S-epoxide transferase and its enhancement by phenobarbital in rat liver in vivo. **Biochemical Pharmacology** PMID: 9, v. 24, n. 17, p. 1569–1572, 1 set. 1975.

MATTHIESSEN, P. *et al.* An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. **Marine Environmental Research** v. 45, n. 1, p. 1–15, fev. 1998.

METCALFE, C. D. *et al.* Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 20, n. 2, p. 297–308, fev. 2001.

MOREIRA, Davi S. *et al.* Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology** v. 30, n. 10, p. 1041–1049, set. 2009.

MOREIRA, Davi Silva. **Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte**. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/2188>>. Acesso em: 4 jan. 2015.

MORTEANI, Giulio *et al.* Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). **Environmental Geochemistry and Health** v. 28, n. 3, p. 257–264, jun. 2006.

MOZETO, A. A. Coleta de Sedimentos de Ambientes Aquáticos Continentais, Extração de Águas Intersticiais e Determinação Granulométrica. In: MOZETO, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F. (Orgs.). . **Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce**. 1a. ed. São Carlos: Editora Cubo, 2006. p. 25–35.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, Pedro Antonio. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Orgs.). . **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2a. ed. São Carlos: Editora Rima, 2008. p. 117–152.

MURDOCH, Mary H. *et al.* Spiking sediment with organochlorines for toxicity testing. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 16, n. 7, p. 1504–1509, 1997.

NAYLOR, C.; RODRIGUES, C. Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. **Chemosphere** v. 31, n. 5, p. 3291–3303, set. 1995.

NIA, Y. *et al.* Mobility of Cd and Cu in formulated sediments coated with iron hydroxides and/or humic acids: a DGT and DGT-PROFS modeling approach. **Chemosphere** v. 85, n. 9, p. 1496–1504, nov. 2011.

NORBERG-KING, Teresa J. *et al.* Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 25, n. 10, p. 2662–2674, out. 2006.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Detailed Review Paper on Aquatic Arthropods in Life Cycle Toxicity Tests With an Emphasis on Developmental, Reproductive and Endocrine Disruptive Effects**. Paris: OECD Publishing, 2006. 125 p. (OECD Series on Testing and Assessment, 55).

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Detailed Review Paper on Aquatic Testing Methods for Pesticides and Industrial Chemicals**. Paris: OECD Publishing, 2002. 260 p. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/detailed-review-paper-on-aquatic-testing-methods-for-pesticides-and-industrial-chemicals_9789264078291-en>. Acesso em: 13 dez. 2014. (OECD Series on Testing and Assessment, 11).

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment**. Paris: OECD Publishing, 2010. 29 p. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-233-sediment-water-chironomid-life-cycle-toxicity-test-using-spiked-water-or-spiked-sediment_9789264090910-en>. Acesso em: 13 dez. 2014. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2).

OVIEDO-GÓMEZ, Dennis Gloria Carolina *et al.* Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v. 29, n. 1, p. 39–43, jan. 2010.

OW/ORD EMERGING CONTAMINANTS WORKGROUP. **Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern**. Draft Document [S.I.]: United States Environmental Protection Agency, 3 jun. 2008.

PANKO, Julie M. *et al.* Chronic toxicity of tire and road wear particles to water- and sediment-dwelling organisms. **Ecotoxicology (London, England)** v. 22, n. 1, p. 13–21, jan. 2013.

PANTER, G.H; THOMPSON, R.S; SUMPTER, J.P. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. **Aquatic Toxicology** v. 42, n. 4, p. 243–253, ago. 1998.

PANTER, Grace H.; THOMPSON, Roy S.; SUMPTER, John P. Intermittent Exposure of Fish to Estradiol. **Environmental Science & Technology** v. 34, n. 13, p. 2756–2760, jul. 2000.

PARROTT, Joanne L.; BLUNT, Beverley R. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. **Environmental Toxicology** v. 20, n. 2, p. 131–141, abr. 2005.

PAWLOWSKI, S *et al.* Temperature-dependent vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18°C. **Toxicology in Vitro** v. 14, n. 6, p. 531–540, dez. 2000.

PÉRY, Alexandre R. R. *et al.* Body residues: a key variable to analyze toxicity tests with *Chironomus riparius* exposed to copper-spiked sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 61, n. 2, p. 160–167, jun. 2005.

PETROVIĆ, Mira *et al.* Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** v. 20, n. 11, p. 637–648, nov. 2001.

PHILLIPS, Bryn M. *et al.* Solid-phase sediment toxicity identification evaluation in an agricultural stream. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC** v. 25, n. 6, p. 1671–1676, jun. 2006.

PHIPPEN, B. et al. **Ambient water quality guidelines for iron**. British Columbia: Ministry of Environment, 2008.

QUINÁGLIA, Gilson Alves. **Caracterização dos níveis basais de concentração de metais nos sedimentos do sistema estuarino da baixada santista**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46133/tde-09022007-133741/>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

REIS, Ricardo W. Filho; ARAÚJO, Juliana Coutinho De; VIEIRA, Eny Maria. Sexual estrogenic hormones: bioactive contaminants. **Química Nova** v. 29, n. 4, p. 817–822, jul. 2006.

RIBEIRO, R. *et al.* A novel formulated sediment for toxicity testing with a highly controlled composition sediment. In: 15TH ANNUAL MEETING ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 1994, Denver. **Anais...** Denver: SETAC Press, 1994. p.224.

RODGERS-GRAY, Trevor P. *et al.* Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-Dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development. **Environmental Science & Technology** v. 35, n. 3, p. 462–470, fev. 2001.

RODGHER, S. *et al.* Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the Tietê River (São Paulo, Brazil). **Brazilian Journal of Biology** v. 65, n. 4, p. 697–710, nov. 2005.

RODRIGUEZ-MOZAZ, Sara; LÓPEZ DE ALDA, Maria J; BARCELÓ, Damià. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1045, n. 1-2, p. 85–92, ago. 2004.

ROGERS, James A.; METZ, Luanne; YONG, V. Wee. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. **Molecular Immunology** v. 53, n. 4, p. 421–430, abr. 2013.

ROMAN, Yblin E. *et al.* Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: sensitivity comparison and preliminary risk assessment. **The Science of the Total Environment** v. 387, n. 1-3, p. 128–140, 15 nov. 2007.

ROSAL, Roberto *et al.* Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research Emerging Contaminants in water: Occurrence, fate, removal and assessment in the water cycle (from wastewater to drinking water)**. v. 44, n. 2, p. 578–588, jan. 2010.

SASSON-BRICKSON, Gemini; BURTON, G. Allen. In situ and laboratory sediment toxicity testing with ceriodaphnia dubia. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 10, n. 2, p. 201–207, 1991.

SAWYER, L. N.; BURTON, G. A. Jr. Validation of various formulated sediment recipes for use in toxicity assessments. In: ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 1994, Denver. **Anais...** Denver: SETAC Press, 1994.

SCHMID, T. *et al.* Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Toxicology Letters** v. 131, n. 1-2, p. 65–74, maio 2002.

SCHUBAUER-BERIGAN, Mary K. *et al.* pH-Dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 12, n. 7, p. 1261–1266, 1993.

SEGNER, H. *et al.* Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 54, n. 3, p. 302–314, mar. 2003.

SHIN, Ho-Sang; OH, Jin-Aa; SHIN, Sun-Kyoung. Sensitive Determination of Natural and Synthetic Steroidal Hormones of a Free and Conjugated Form in Surface Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Bulletin of the Korean Chemical Society** v. 32, n. 3, p. 809–814, 20 mar. 2011.

SILVA, Carla Patrícia; OTERO, Marta; ESTEVES, Valdemar. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution Chemicals Management and Environmental Assessment of Chemicals in China**. v. 165, p. 38–58, jun. 2012.

SILVÉRIO, P. F. **Partição, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados a organismos bentônicos em sedimentos**. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos, 1999. 77 p. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/14371/particao-biodisponibilidade-e-toxicidade-de-metais-pesados-a-organismos-bentonicos-em-sedimentos-lac/>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

SODRÉ, Fernando F. *et al.* Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal** Brazilian National Meeting of Analytical Chemistry, 2009. v. 96, n. 1, p. 92–98, set. 2010.

SODRÉ, F. F. *et al.* Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático, IQ-Unicamp** v. 6, 2007.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology** v. 65, n. 1-6, p. 143–150, abr. 1998.

STEWART, K.; THOMPSON, R. Comparison of natural sediment and sand at varying food levels. In: SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 1995, Vancouver. **Anais...** Vancouver: SETAC Press, 1995. p.262–263.

SUEDEL, B. C.; DEEVER, E.; JR, J. H. Rodgers. Formulated sediment as a reference and dilution sediment in definitive toxicity tests. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v. 30, n. 1, p. 47–52, 1 jan. 1996.

SUEDEL, Burton C.; RODGERS, John H. Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 13, n. 7, p. 1163–1175, 1994a.

SUEDEL, Burton C.; RODGERS, John H. Responses of *Hyalella azteca* and *chironomus tentans* to particle-size distribution and organic matter content of formulated and natural freshwater sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 13, n. 10, p. 1639–1648, 1994b.

SUTER, Glenn. Risk assessment of chemicals: An introduction. **Integrated Environmental Assessment and Management** v. 4, n. 3, p. 380–380, 2008.

THACKER, Paul D. Sensing environmental estrogens with glowing yeast. **Environmental Science & Technology Online News** 2005 Disponível em: <<http://lists.dep.state.fl.us/pipermail/pharmwaste/2005-July/000181.html>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

THORPE, Karen L. *et al.* Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science & Technology** v. 37, n. 6, p. 1142–1149, 15 mar. 2003.

TILLITTI, D. E. *et al.* Role of exposure assessment in characterizing risks of endocrine-disrupting substances to wildlife. In: KENDALL, R. J. *et al.* (Orgs.). . **Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife**. Pensacola: SETAC Press, 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA 600/R-99/064: Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates**. 2a. ed. Washington: Office of Research and Development, 2000a. 212 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Test Method 100.4: *Hyalella azteca* 42-d test for measuring the effects of sediment-associated contaminants on survival, growth, and reproduction. **EPA 600/R-99/064: Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates**. 2a. ed. Washington: Office of Research and Development, 2000b. p. 72–83.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA 823/B-01/002: Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Contaminated Sediments in Water**. Washington: Office of Science and Technology, 2001. 208 p. Disponível em: <<http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/collection.cfm>>.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3050B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils**. Alexandria: National Technical Information Service, 1996. 12 p. (SW-846, 3000).

VALKONEN, I. [Report from the National Representatives of the Scandinavian Nurses' Federation's meeting in Iceland]. **Sairaanhoitaja. Sjuksköterskan** PMID: 797, v. 50, n. 19, p. 16–20, 7 out. 1975.

VERRHIEST, G. J. *et al.* Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments. **Chemosphere** v. 46, n. 7, p. 961–974, fev. 2002.

VIGANÒ, L. Assessment of the toxicity of River Po sediments with *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic Toxicology** v. 47, n. 3–4, p. 191–202, jan. 2000.

WALSH, G. E. *et al.* Synthetic substrata for propagation and testing of soil and sediment organisms. **Pedobiologia** v. 36, p. 1–10, 1992.

WALSH, Gerald E. *et al.* Toxicity tests of effluents with marsh plants in water and sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 10, n. 4, p. 517–525, 1991.

WANG, Jiafan *et al.* Determination of fullerenes (C60) in artificial sediments by liquid chromatography. **Talanta** v. 87, p. 35–39, 15 dez. 2011.

WÄSTLUND, D. **The role of sediment characteristics and food regimen in a toxicity test with *Chironomus riparius***. Dissertação – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1999.

WEAVER, Charles E. **Clays, muds, and shales**. Amsterdam: Elsevier: Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co, 1989. 819 p. (Developments in sedimentology, 44).

WELTJE, Lennart; SCHULTE-OEHLMANN, Ulrike. The seven year itch—progress in research on endocrine disruption in aquatic invertebrates since 1999. **Ecotoxicology** v. 16, n. 1, p. 1–3, 1 fev. 2007.

WU, Jingming *et al.* Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. **Journal of Chromatography A** v. 1216, n. 7, p. 1053–1058, 13 fev. 2009.

XU, Jian *et al.* Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1202, n. 2, p. 189–195, 22 ago. 2008.

YING, Guang-Guo; KOOKANA, Rai S; RU, Ying-Jun. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International** v. 28, n. 6, p. 545–551, dez. 2002.

YU, Yong; WU, Laosheng. Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta** v. 89, p. 258–263, 30 jan. 2012.

ZAGATTO, Pedro Antonio. Validação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Orgs.). **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**. 2a. ed. São Carlos: Editora Rima, 2008. p. 251–267.

ZAIKIN, Vladimir; HALKET, John M. **A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry**. Chichester: IM Publications LLP, 2009. 543 p.

ZHU, Xiaoshan *et al.* The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Nanotechnology** v. 20, n. 19, p. 195103, 13 maio 2009.

ZIELKE, Hanno *et al.* The impact of extraction methodologies on the toxicity of sediments in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo test. **Journal of Soils and Sediments** v. 11, n. 2, p. 352–363, 1 fev. 2011.

Apêndice A

Relação do uso de sedimentos formulados, diferentes guias de referência e principais usos em trabalhos científicos

| Autor | Composição do sedimento formulado | Local ou guia de referência | Organismo utilizado | Substância testada | Objetivo do estudo |
|------------------------------|--|---|--|--|---|
| Walsh <i>et al.</i> 1991 | 0,6% areia grossa, 8,7% areia média, 69,2% areia fina, 10,2% silte, 6,4% argila e 4,9% matéria orgânica (turfa) | Áreas alagadas próximas a Milton, Florida | Gramínea de pântano de água doce, <i>Echinochloa crusgalli</i> | Esgoto, têxtil, papel e celulose, chapeamento, coque, efluentes de curtume | Avaliar a toxicidade de efluentes complexos usando sedimentos sintéticos similares aos sedimentos naturais |
| Suedel e Rodgers, 1994a | Argila montmorillonita, silte (formada com argila mineral caulinita), areia grossa (2,0-0,5 mm), areia média (0,5-0,25 mm) e areia fina (0,25-0,05 mm), húmus constituído de material vegetal em decomposição, esterco e dolomita como um tampão natural de bicarbonato. | EUA como um todo | <i>Hyalella azteca</i> , <i>Chironomus tentans</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Pimephales promelas</i> | - | Desenvolver e avaliar sedimentos de referência formulados para uso em testes definitivos de toxicidade em sedimento. |
| Naylor e Rodrigues, 1995 | 69% de areia lavada com ácido, 20% de argila caulinita, 10% de turfa de musgo esfagno e 1% carbonato de cálcio | OECD guideline 207 | <i>Chironomus riparius</i> | - | Avaliar o potencial de uma simples formulação constituída de areia, caulinita, turfa de musgo esfagno e carbonato de cálcio em um teste sub-letal de 10 dias com organismos |
| Harrahy e Clements, 1997 | 850 g de areia média de quartzo lavada, 150 g de mistura de argila e silte, 22 g de musgo esfagno, 0,1 g de ácidos húmicos solúveis e 0,5 g de calcário dolomítico (3% de matéria orgânica) | Walsh <i>et al.</i> , 1992 | <i>Chironomus tentans</i> | Cd, Cu, Pb e Zn | Investigar a toxicidade e bioacumulação de uma mistura de Cd, Cu, Pb e Zn em <i>Chironomus tentans</i> em sedimento sintético. |
| Fleming <i>et al.</i> , 1998 | Areia em banho ácido, argila de caulino, 1% carbonato de cálcio, e ou turfa de musgo esfagno finamente moída ou α -celulose. | Lagoa na WRc, Medmenham, UK (para comparar os efeitos do poluente, não para fazer um sedimento igual) | <i>Chironomus riparius</i> | Permetrina | Investigar os efeitos agudos e crônicos de permetrina em dois sedimentos artificiais usando larva de <i>C. riparius</i> |
| Wästlund, 1999 | 68,3% areia marítima, 19,7% argila de caulino, 10,3% de turfa finamente pulverisada e 1,7% de CaCO ₃ (peso seco) | OECD guideline 207 | <i>Chironomus riparius</i> | Lindane (pesticida) | Determinar como características dos sedimentos (por exemplo, composição de matéria orgânica e densidade) e adição de alimentos |

| | | | | | |
|-----------------------------|---|--|---|---------|---|
| | | | | | afetaria a biodisponibilidade de pesticidas em um teste padronizado de toxicidade. |
| Kemble <i>et al.</i> , 1999 | Areia (quartzo branco), mistura de argila e silte, α -celulose e dolomita, variando as quantidades dos componentes formulados em três diferentes sedimentos | Walsh <i>et al.</i> , 1991 e Harray e Clements, 1997 | <i>Hyalella azteca</i> , <i>Chironomus riparius</i> , <i>Chironomus tentans</i> e <i>Lumbriculus variegatus</i> | - | Desenvolver um método para a preparação de sedimentos formulados para utilização em testes de toxicidade usando materiais comercialmente disponíveis sob uma forma consistente, avaliando a tolerância de organismos de água doce |
| Gratzer and Ahlf, 2001 | 18 sedimentos formulados variando o conteúdo de turfa de musgo esfagno, areia industrial, calcário dolomítico, Fe ₂ O ₃ , montmorilonita K-10, Clorita e Al ₂ O ₃ | Comoponentes escolhidos para similar sedimentos nativos | <i>Caenorhabditis elegans</i> | - | Examinar a adequação de um sediment formulado para testes de toxicidade com <i>C. elegans</i> |
| Verrhiest et al., 2002 | 65% de areia de quartzo (silício e caulina), 30% de argila de caulim, 4,85% de α -celulose, 0,15% de flocos de ração de peixe moídos (TetraMin) e 0,1% de carbonato de cálcio | De acordo com vários estudos onde composições semelhantes foram utilizadas com sucesso em testes de toxicidade | - | - | Caracterizar alterações físico-químicas e bacterianas ocorrendo nos sedimentos durante a fase de condicionamento e comparar as variações de tais parâmetros entre um sedimento formulado e um natural |
| Besser et al., 2003 | Porções iguais de areia de sílica n° 1, silte ASP 400, pequenas quantidades de dolomita em pó (5 g/kg) e ácido húmico (100 mg/kg), e também duas fontes de particulado de matéria orgânica: α -celulose e húmus orgânico natural | Kemble et al., 1999 | <i>Hyalella azteca</i> | Cd e Cu | Avaliar a gama de variação de toxicidade por metais que pode ser esperada em sedimentos contendo diferentes concentrações e diferentes tipos de matéria orgânica |

| | | | | | |
|-------------------------------|--|---|--|------------------------------|---|
| Péry <i>et al.</i> , 2005 | Dois tipos de sedimentos formulados: um composto apenas com silicato e outro produzido pelo Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Verneuil en Halatte, France, com 6,5% de turfa, 60% de silicato, 33,25% de caulino, 0,1% de CaCO ₃ e 0,15% TetraMin | - | <i>Chironomus riparius</i> | Cu | Avaliar o crescimento e taxa de sobrevivência de organismos expostos, comparando 2 sedimentos formulados e 2 sedimentos naturais |
| Doig e Liber 2006 | Um solo obtido localmente (seco e pulverizado), calcite (CaCO ₃), dolomita (CaMgCO ₃) e turfa de terra seca | - | <i>Hyaella azteca</i> | Ni | Comparar as previsões de resposta de toxicidade para os resultados de testes observados a partir de sedimentos naturais e formulados para <i>H. azteca</i> , enriquecidos com Ni. |
| Roman <i>et al.</i> , 2007 | 75% de areia de quartzo (<500 mm de diâmetro), 20% de argila caulinita, 5% de turfa de musgo esfagno, carbonato de cálcio. | OECD guideline 218 | <i>Lumbriculus variegatus</i> , <i>Tubifex tubifex</i> , <i>Chironomus riparius</i> , <i>Gammarus pulex</i> e <i>Hyaella azteca</i> | Cu | Estabelecer um ranking de sensibilidade relativa entre intervebrados bentônicos comumente utilizados em testes de toxicidade de sedimentos |
| Cantwell <i>et al.</i> , 2008 | Silte e argila de referência, juntamente com areia coletada de Narragansett Town Beach (Narragansett, RI, EUA) | Os sedimentos foram formulados para abranger a faixa de distribuição de tamanho de grão, e concentrações AVS e TOC presentes em sedimentos estuarinos | - | Cd, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn | Avaliar se as simples características físicas e químicas poderiam ser utilizadas para prever liberação de metal resuspenso durante um evento tal como a drenagem de correção |
| Zhu <i>et al.</i> , 2009 | 219 g de areia (quartzo branco), 1242 g de mistura de silte-argila (ASP 400), 77,3 g de α-celulose, 0,15 g de ácido húmico e 7,5 g de dolomita | USEPA guideline 600/R- 99/064 | Embriões de <i>Danio rerio</i> | Nanopartículas de ZnO (nZnO) | Determinar e comparar a toxicidade de agregados de nZnO na presença e ausência de sedimentos artificiais para avaliar o efeito de nanopartículas em conjunto com sedimentos |

| | | | | | |
|---------------------------------|--|--------------------|--------------------------------|--|--|
| Oviedo-Gómez <i>et al.</i> 2010 | 70% de areia (0,2 mm), 20% de caulinita (< 0,002 mm) e 10% de matéria orgânica (0,2 mm) representada por compostagem desativada por aquecimento a 55-60 °C por 3 dias. | - | <i>Hyalella azteca</i> | Diclofenaco | Avaliar a toxicidade do fármaco em <i>H. azteca</i> utilizando biomarcadores de estresse oxidativo |
| Nia <i>et al.</i> , 2011 | 70% de areia lavada com ácido, 22% de argila de caulinita e 4% de calcite, revestida com oxihidróxidos de ferro e/ou ácidos húmicos | - | - | Cd e Cu | Investigar o reabastecimento cinético de Cd e Cu à água intersticial de sedimentos formulados |
| Wang <i>et al.</i> , 2011 | 8,5% de areia, 4,5% de silte, 10% de argila | OECD guideline 225 | - | Fulerenos (C60) | Representar um método validade de extração de fluereno, considerando os principais componentes em matrizes sólidas |
| Zielke <i>et al.</i> , 2011 | Composição da orientação 218 da OECD, exceto para um teor de argila de caulino reduzido de 20% para 5% e substituído com areia de quartzo | OECD guideline 218 | Embriões de <i>Danio rerio</i> | 2,4-dinitrofenol, diuron, fluoranteno, nonilfenol, parationa e pentaclorofenol | Extrair seis poluentes orgânicos do sedimento natural e artificial para testá-los em ensaios com embriões do peixe <i>D. Rerio</i> para potencial embriotóxico e teratogênico |
| Cofalla <i>et al.</i> 2012 | 5,0% de turfa, 74,5% de areia de quartzo, 19,9% de argila caulinita e 0,6% de carbonato de cálcio | OECD guideline 218 | - | Fenantreno, criseno, pireno e benzo[a]pireno | Fornecer e controlar um ambiente adequado e estável para animais de testes, simular e investigar uma inundação em calha anular e modificar o processo de preparação e contaminação de sedimentos OECD 218 para experimentos em larga escala. |
| Franzen <i>et al.</i> 2012 | Al ₂ O ₃ , CaCO ₃ , argila dolomita, Fe ₂ O ₃ , areia de quartzo (diferentes tamanhos de grãos) e dois tipos de matéria orgânica (turfa e um preparado de substâncias húmicas comerciais – HuminFeed) | ISO 10872:2010 | <i>Caenorhabditis elegans</i> | - | Testar duas fontes diferentes de carbono orgânico, como também a mistura de ambos, em termos de varáveis de perfis de desempenho de vida e genes de stress dos organismos |

Apêndice B

Manutenção do organismo-teste *Hyalella azteca*

Durante a manutenção da cultura, alguns parâmetros foram ajustados para melhor adaptar os organismos ao laboratório, como a fonte de água para cultivo e período por tipo de alimento. A tabela abaixo mostra o resumo das condições de cultivo da cultura de *Hyalella azteca* utilizadas das últimas modificações.

Resumo das condições de cultivo de *H. azteca*

| Parâmetros | Condições de cultivo |
|--|--|
| Sistema | Semi-estático |
| Temperatura/ ambiente | 25 ± 1°C |
| Qualidade da luz | Luz fria, tipo led |
| Intensidade luminosa | 400 a 800 lux |
| Fotoperíodo | 16 horas luz: 8 horas escuro |
| Tipo/ capacidade do recipiente | Recipientes de vidro com capacidade para 2L |
| Água de manutenção | Água de abastecimento desclorada e reconstituída para dureza 40-48 mg CaCO ₃ /L e pH 7,2 a 7,8 |
| Substrato | <i>Elodea</i> sp. |
| Aeração | Não |
| Troca de água | Quintas-feiras |
| Número de organismos por recipiente | 100 |
| Número de recipientes/ cultura | 1 recipiente correspondente a cada idade: (0-1), (1-2), (2-3), (3-4), (4-5), (5-6), (6-7), (7-8) e (8-9) semanas, e 1 recipiente reserva com organismos descartados da cultura (velhos e juvenis) |
| Idade dos organismos | Conhecida |
| Tipo e quantidade de alimentos ministrados | 2 pipetas de: alimento composto (todos os dias), ração de peixe carnívoro (segunda e sexta), alga <i>Raphidocelis subcapitata</i> (terça e quinta), e espirulina (quarta) |
| Rodízio das culturas | Semanalmente, organismos com mais de 8 semanas são descartados no recipiente reserva. Nas trocas de água as idades são atualizadas e os filhotes (0-1) são formados com os organismos adultos que já produzem filhotes (a partir de 3 semanas) |

| | |
|--------------------|---|
| Controles semanais | Sobrevivência e coloração dos organismos na cultura, número de jovens produzidos por quantidade de adultos, dureza, pH, temperatura da água na incubadora e do ambiente externo |
|--------------------|---|

1. ALIMENTAÇÃO

A alimentação deve ser realizada conforme cronograma estabelecido e fixado na incubadora.

- Alimento Composto – 1 pipeta para cada um dos aquários;
- Ração de peixe carnívoro – 1 pipeta para cada um dos aquários;
- Ração Spirulina – 1 pipeta para cada um dos aquários;
- Alga *R. subcapitata* – 2 pipetas para cada um dos aquários.

Nota: Os alimentos estão armazenados em geladeira de 4 a 10°C.

2. TROCA DE ÁGUA

Materiais:

- Pipetas de vidro (pipeta cilíndrica com tetina para 2 mL);
- Recipientes de vidro (2 a 3 litros);
- Bandeja de plástico branca;
- Água de torneira reconstituída (sem cloro, pH: 6,8–8,0, Dureza: 40–48 mg CaCO₃/L);
- Balde para descarte;
- Caneta permanente;
- Alimentos;

Procedimento: Limpar bem a bancada com papel descartável e álcool 70%. Primeiramente, deve-se transferir a cultura de um dos recipientes de *Hyalella azteca* (de preferência começar com as idades mais avançadas para manter o controle)

para a bandeja branca, onde é feita a visualização dos organismos e de onde são transportados para o novo recipiente, com auxílio de pipeta de vidro. Deve-se ter, para isso, disposto um ou dois novos recipientes preenchidos com água reconstituída devidamente ajustada: um para os adultos que avançaram 1 semana de idade e um para os juvenis, com idade de 0 a 7 dias. Realizar a troca para todos os aquários, respeitando-se a idade de cada lote e separando-se os filhotes, quando houver, para o novo recipiente (0-1 semana). Para todos os recipientes usados, efetuar a limpeza utilizando detergente e bucha apropriados e remover todo o resíduo e detergente,

Notas

- Adicionar o alimento apropriado do dia da troca à água antes de iniciar a troca.
- Ao montar o aquário contendo filhotes, adicionar macrófitas ao recipiente.
- Identificar cada recipiente corretamente com o nome do organismo, idade (em intervalo de semana), data de montagem e responsáveis pela troca.
- À água de descarte deve-se adicionar detergente para evitar que possíveis organismos tornem-se espécies invasoras no ambiente onde o efluente foi descartado.

Apêndice C

Procedimento Operacional Padrão – POP

Preparo de alimentos para cultura de *Hyaella azteca*

- Para o preparo dos alimentos (semanalmente, de segunda-feira), inicialmente deve-se limpar a bancada com papel descartável e álcool 70%.
- O alimento antigo contido nos 3 frascos deve ser descartado e os frascos devem ser devidamente higienizados (com buchinha própria e detergente Extran 20%) e todo o material possível deve ser periodicamente autoclavado.

1) Alimento Composto

- Levar à bancada os materiais:
 - Frasco do alimento composto com a “pulga”;
 - Fermento biológico;
 - Óleo de prímula;
 - Ração de peixe (tetramin ou tetrafin);
 - Proveta contendo 100 mL de água destilada;
 - Béquer de 10 mL ou béquer pequeno;
 - Espátula de metal.
- Colocar 100 mL de água destilada no frasco do alimento composto, adicionar 2 ou 3 gotas de óleo de prímula, 0,25 g de fermento biológico e 0,5 g de ração de peixe, pesados na balança analítica com auxílio do béquer e espátula de metal.
- Ligar a mesa agitadora em tomada 220V. Colocar o frasco fechado e com a “pulga” dentro sobre o aparelho. Deixar agitando por 1 hora.
- Após pronto, identificar o frasco com o nome do responsável e a data. Guardar o alimento em geladeira.
- Utilizar esse alimento durante a mesma semana apenas.

2) Ração de Peixe Carnívoro (2ª, 4ª e 6ª)

- Levar à bancada os materiais:
 - Frasco do alimento “ração de peixe carnívoro”;
 - Proveta contendo 100 mL de água destilada;
 - Ração para peixe carnívoro (ciclídeos);
 - Cadinho com macerador;
 - Béquer de 10 mL ou béquer pequeno;
 - Espátula de metal.
- Colocar 100 mL de água destilada no frasco “ração de peixe carnívoro” e adicionar 1 g de ração para peixe carnívoro, pesado na balança analítica com auxílio do béquer e espátula de metal.
- Tampar o frasco e agitar manualmente.
- Identificar o frasco com o nome do responsável e a data. Guardar o alimento na geladeira.
- Utilizar esse alimento durante a mesma semana.

3) Ração de Spirulina (3ª e 5ª)

- Levar à bancada os materiais:
 - Frasco do alimento “Spirulina”;
 - Proveta contendo 50 mL de água destilada;
 - Ração de Spirulina;
 - Béquer de 10 mL ou béquer pequeno;
 - Espátula de metal.
- Colocar 50 mL de água destilada no frasco “Spirulina” e adicionar 1 g de ração de Spirulina, pesado na balança analítica com auxílio do béquer e espátula de metal.
- Tampar o frasco e agitar manualmente.
- Identificar o frasco com o nome do responsável e a data. Guardar o alimento na geladeira.
- Utilizar esse alimento durante a mesma semana.

4) Alga (*Raphidocelis subcapitata*)

O preparo do meio e cultivo da alga está descrito no Apêndice F.

Apêndice D

Manutenção do organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*

Os organismos nectônicos são cultivados com cuidados diários e semanais, armazenados em recipientes de vidro dentro de uma das incubadoras do laboratório didático de Biologia. Suas idades são conhecidas e separadas por semana, sendo que semanalmente é realizada a triagem dos filhotes para que haja o controle do tempo de vida, sendo de 0 a 1 semana, 1 a 2 semanas e 2 a 3 semanas as idades dos organismos mantidos para cultivo.

Até o mês de abril/2014, a água utilizada para o cultivo de *C. dubia* era proveniente de torneira, passando por um copo de separação de fitoplâncton, para a remoção de fitoplâncton e possível microzooplâncton, e desclorada por aeração. Porém percebeu-se uma grande queda na qualidade da cultura na época de estiagem, o que levou a equipe a iniciar um novo cultivo com água mineral (água Klarina, fonte Roseira, Piedade-SP). A água é despejada em um aquário prévia e semanalmente higienizado (lavado com água e sabão neutro para vidraria), onde fica sob aeração e a dureza é corrigida com as soluções 1 e 2*, visando atingir um valor dentro da faixa de 40 a 48 mg CaCO₃/L, segundo recomendado pela norma ABNT NBR 13373 (2010). Quando necessário, o pH também é ajustado para se adequar à faixa de 7,0 a 7,6 utilizando-se ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de cálcio (NaOH). A água permanece constantemente sob aeração para a solubilização total dos sais e estabilização dos parâmetros de interesse.

*A solução 1 é composta por sulfato de cálcio diidratado (CaSO₄.2H₂O) e água destilada. A solução 2 é composta por cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O) e água destilada. Ambas as soluções são utilizadas para o ajuste de dureza da água de cultivo. As soluções são preparadas mensalmente no laboratório e armazenadas de acordo com a norma citada.

No dia posterior aos ajustes da água, são registrados os teores de oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza, antes de ser utilizada. Se os parâmetros estão de acordo com os valores estabelecidos, segue-se com a troca de solução dos recipientes contendo os organismos (às segundas e quintas-feiras).

Em uma mesa de luz são dispostos os aquários com a solução a ser trocada. Aos recipientes de vidro contendo água de cultivo nova são adicionados os alimentos composto (Apêndice E) e alga (*Raphidocelis subcapitata*, Apêndice F). Desta forma, os aquários de novos filhotes (idade 0-1) provenientes dos aquários de idade (1-2) são montados, garantindo-se o controle de idade da cultura. São registrados no recipiente a idade dos organismos, a data de montagem do aquário (quinta-feira), data da segunda troca (segunda-feira) e o nome dos responsáveis pela troca. A água descartada das trocas deve ser despejada em um balde com detergente, a fim de se evitar a introdução dessa espécie no ambiente através do efluente descartado.

A tabela abaixo mostra o resumo das condições de cultivo de *C. dubia* com modificações tomadas no mês de Novembro/2014 (número de organismos por recipiente e quantidade de alimento).

Resumo das condições de cultivo de *C. dubia*.

| Parâmetros | Condições de cultivo |
|-------------------------------------|--|
| Sistema | Semi-estático |
| Temperatura/ ambiente | 25 ± 1°C |
| Qualidade da luz | Luz fria, tipo led |
| Intensidade luminosa | 500 a 1000 lux |
| Fotoperíodo | 16 horas luz: 8 horas escuro |
| Tipo/ capacidade do recipiente | Béquer de 250 mL |
| Água de manutenção | Água mineral (Klarina, fonte Piedade-SP) reconstituída para dureza 40-48 mg CaCO ₃ /L e pH 7,2 a 7,8 |
| Aeração | Não |
| Troca de água | Segundas e quintas (trocas totais) |
| Número de organismos por recipiente | 16 |
| Número de recipientes/ cultura | 4 béqueres com juvenis (0-1 semana); 4 béqueres com adultos (1-2 semanas); 1 béquer com adultos – reserva (2-3 semanas); e 1 recipiente para filhotes reserva (0-1 semana) |
| Idade dos organismos | Conhecida |
| Tipo e quantidade de alimentos | 0,02 mL/organismo de alimento |

| | |
|--------------------------------------|--|
| ministrados | composto e <i>Raphidocelis subcapitata</i> (20×10^5 células/organismo) |
| Rodízio das culturas | Semanalmente, organismos com menos de 24h de vida são retirados das culturas com 7 dias de vida, descartando-se os organismos excedentes (filhotes). Os organismos com mais de 3 semanas são descartados e as idades são atualizadas semanalmente. |
| Controle de sensibilidade da cultura | Teste mensal com substância de referência (NaCl) |

Apêndice E

Procedimento Operacional Padrão (POP)

Preparo de alimento composto para cultivo de *Ceriodaphnia Dubia*

Para o preparo do alimento composto, são envolvidas três etapas: digestão da ração e armazenamento, preparo do fermento e preparo do composto.

1) Digestão da ração

Materiais:

- Frasco de vidro com capacidade para 3 litros com tampa;
- Aerador;
- Proveta (50 – 100 mL);
- Ração de peixe (TetraMin®);
- Água destilada (1L);
- Béquer de 100 mL;
- Filtro Melitta;

Procedimento: Adicionar cerca de 200 mL de água destilada no frasco de vidro. Pesar 5 g de ração para peixe TetraMin® em balança analítica. Acrescentar o restante de água (800 mL), tampar o recipiente e acoplar o aerador de modo que a mistura fique em constante agitação durante uma semana. Após esse período, a solução deve ser filtrada em filtro e armazenada em béquer para alimentação ou congelamento.

O conteúdo filtrado pode ser congelado (em formas de gelo ou em sacos plásticos limpos, com volume conhecido) e pode ser usado por até um mês.

Nota: etiquetar com data e nome do responsável.

2) Preparo do fermento

Materiais:

- Fermento biológico (tipo Dona Benta);
- Água destilada;
- Frasco para preparo;
- Filtro tipo Melitta.

Procedimento: Pesar em balança analítica 0,1 g de fermento biológico e adicionar esse conteúdo a 25 mL de água destilada em um recipiente de vidro. Agitar e filtrar a mistura.

3) Preparo do alimento composto

Procedimento: Descongelar 25 mL de ração digerida e misturar com o fermento filtrado em água (item 2). Armazenar o alimento na geladeira em frasco de vidro identificado e usar em até 7 dias.

Apêndice F

Procedimento Operacional Padrão (POP)

Cultivo de *Raphidocelis subcapitata* em meio de cultura líquido para alimento de *C. dubia* e *H. azteca*

O cultivo de *Raphidocelis subcapitata* é dividido entre a etapa de preparo do meio líquido e a etapa pós inoculação com células separadas, para o crescimento no meio sob condições controladas. Todo o procedimento é realizado de acordo com a norma ABNT NBR 12648 - 2011. A manutenção das culturas de *P. subcaptata* deve ser feita através do preparo de um específico composto de nutrientes selecionados para o desenvolvimento das algas, denominado de meio oligo.

Repique de algas em incubadora após o inóculo



Meio oligo:

São preparadas sete soluções necessárias para o meio de cultura líquido.

Materiais:

- 4 frascos com capacidade de 100 mL;
- 3 frascos com capacidade de 1000 mL;
- Água destilada (cerca de 3,5 L);
- Béquer de 50 mL;
- Espátula de metal;

- Balança analítica;
- Reagentes abaixo especificados.

A figura a seguir mostra os reagentes, proporções e preparo das 7 soluções necessárias para o meio de cultura líquido.

Reagentes e preparo das soluções necessárias para o meio de cultura líquido

| Solução | Reagente | Quantidade mg | Preparo |
|---------|---|---------------|---|
| 1 | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 4 000 | Dissolver e completar para 100 mL com água processada |
| 2 | KNO_3 | 10 000 | Dissolver e completar para 100 mL com água processada |
| 3 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 3 000 | Dissolver e completar para 100 mL com água processada |
| 4 | K_2HPO_4 | 4 000 | Dissolver e completar para 100 mL com água processada |
| 5 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 30 | Dissolver e completar para 1 000 mL com água processada |
| | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 60 | |
| | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 60 | |
| | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 60 | |
| | $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 60 | |
| | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 60 | |
| 6 | $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1 625 | Dissolver e completar para 1 000 mL com água processada |
| | $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 625 | |
| | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 625 | |
| 7 | NaHCO_3 | 15 000 | Dissolver e completar para 1 000 mL com água processada |

Essas soluções têm prazo de validade de até 6 meses e devem ser armazenadas em geladeira, ao abrigo de luz, em frascos âmbar. As soluções 5 e 6 podem ser congeladas por no máximo 6 meses.

Procedimento:

Para preparar o meio oligo, deve-se inicialmente colocar 500 mL de água deionizada em um vidro de 1 L. Em seguida, adiciona-se 1 mL de cada uma das soluções 1, 2, 3 e 4 (na sequência), 0,5 mL das soluções 5 e 6 e, por fim, mais 1 mL da solução 7. Essa solução deve ser completada até 1000 mL de água deionizada. Ajusta-se o pH do meio entre 6,0 e 8,0 com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH). Por último, a solução deve ficar sob agitação durante uma hora. Por fim, autoclava-se o meio por 15 min a 121 °C (as autoclaves contém instruções para tal procedimento) e, após resfriamento, o repique pode ser realizado.

Repique da cultura:

- Materiais:
- Pipeta de 10 mL;
- Solução de meio líquido autoclavada;
- Vidraria para maximização da cultura (erlenmeyers de 250 mL);
- Bico de Bunsen;
- Respiradores (mangueiras, pipetas ou respiradores e bomba de ar);
- Tampões de algodão envoltos por gase;
- Filme plástico;
- Álcool 70%;
- Papel toalha.

Primeiramente, a bancada deve ser previamente limpa com álcool 70% (v/v). Utilizando uma pipeta autoclavada e com o bico de Bunsen aceso, deve-se aproximar a boca dos erlenmeyers para inocular a solução de alga (respeitando a proporção que a norma anteriormente citada se refere, de 10 mL de alga por litro de meio de cultura) e coloca-se um respirador autoclavado tomando cuidado para que não haja contato com materiais não higienizados ou algum tipo de contaminação.

O sistema é disposto em incubadora com luz constante a uma temperatura entre 23 e 27 °C até que o meio apresente coloração de verde intenso (cerca de 3 a 5 dias após inoculação), que mostra a fase exponencial de crescimento da cultura. O

meio é retirado da incubadora e é armazenado em geladeira para posterior contagem de células em microscópio, o que permite maior controle sobre a cultura.

Contagem de células:

1) Preparo da lâmina

Materiais:

- Câmara Sedgewick para contagem;
- Lamínula;
- Amostra de alga;
- Água deionizada;
- Pipeta graduada (2 mL);
- Solução de lugol;
- Micropipeta.

Procedimento: Colocar na parte interna da lâmina uma pequena quantidade da amostra de alga do meio líquido (volume conhecido) com auxílio de micropipeta. Adicionar água deionizada de modo a completar 1 mL do conteúdo da lâmina, tomando-se o cuidado para não perder a amostra e manter o material homogêneo na lâmina. Adicionar 2 gotas de do fixador lugol e colocar a lamínula sobre a amostra. Deixar o conjunto em repouso por cerca de 1 hora para a decantação do material a ser quantificado.

2) Contagem das células

Ligar o microscópio óptico e ajustar o foco. Realizar a contagem do número de células para cerca de 10 quadrados espessados da câmara Sedgewick, de modo a obter uma amostragem para ser retirada a média ao final.

3) Cálculo do número de células

O cálculo da quantidade de células é feito a partir da seguinte equação:

$$Q = M \times A \times D$$

Onde:

Q = Quantidade de células de *P. subcapitata* por mL de solução;

M = Média do número de células/mm² da câmara de Sedgewick Rafter cell;

A = Área total da câmara;

D = Diluição utilizada para a contagem;

Exemplo:

Média do número de células/mm² = foram contabilizadas 369 células em 10 (dez) quadrados da câmara de Sedgewick Rafter cell escolhidos de forma aleatória.

Portanto, a média é igual a: 36,9 cél/mm²

Área total da câmara = 1000mm²

Diluição utilizada para a contagem = A diluição feita a partir de 0,1mL de solução (controle, no caso) para 0,9mL de água deionizada é de 10x (1/0,1 = 10).

Portanto, temos:

$$Q = 36,9 \times 1000 \times 10 = 3,69 \times 10^5 \text{ células/mL}$$

A seguir são apresentadas, em resumo, as condições de cultivo da *Raphidocelis subcapitata* no laboratório de Biologia da Unesp-Sorocaba.

Resumo das condições de cultivo de *Raphidocelis subcapitata* como fonte de alimento para organismos aquáticos

| Parâmetros | Condições de cultivo |
|--------------------------------|---|
| Sistema | Semi-estático |
| Temperatura/ ambiente | 25 ± 1°C |
| Qualidade da luz | Luz fria, tipo led |
| Intensidade luminosa | 1000 a 2000 lux |
| Fotoperíodo | 24h luz (contínua) |
| Tipo/ capacidade do recipiente | Frascos de vidro (1L) e erlenmeyers (125 e 250 mL) |
| Água para preparo do meio | Água ultra pura (Synergy® UV, resistividade máxima de 18,2 MΩ.cm a 25° C) |
| Aeração | Sim, forte |
| Inóculo | Da própria cultura, utilizando volumes entre 10 e 20 mL para cada inóculo |
| Meio de cultura | Oligo |
| Duração/ validade da cultura | 30 dias |
| Período de preparo (repique) | De 3 a 7 dias |
| Controles semanais | Semanalmente, são preparados novos meios Oligo e são inoculadas células (de no máximo 30 dias) para o repique; autoclavagem de vidrarias e dos meios preparados |
| Controles diários | Temperatura e aeração |

Apêndice G

Procedimento Operacional Padrão (POP)

Preparo de água reconstituída para cultivo de *Hyalella azteca* e *Ceriodaphnia dubia*

Obs: Toda vidraria e material utilizado neste procedimento deve ser próprio da pesquisa. Não utilizar material comum do laboratório.

1) Limpeza do aquário

- **Toda semana** deve-se realizar a **lavagem do aquário** (segunda-feira).
- Para isso, deve-se retirar a água contida nele, com auxílio de béquer, e levá-lo até a pia. Utilizar bucha própria e detergente para vidraria (não usar detergente comum) para sua lavagem. Se necessário, utilizar uma mangueira para ajudar na lavagem.
- Remover muito bem o detergente das paredes e fundo do aquário. Se necessário, passar álcool 70% no seu interior e deixar secar após a lavagem.
- Retornar o aquário vazio no local de origem. Acoplar o filtro “rede zooplâncton” ao aquário.
- Utilizar mangueira e encher o aquário com água de torneira, passando a água pelo filtro, ou água mineral, dependendo da cultura. Ou utilizar potes grandes e muito limpos para encher com água.
- Retornar as bombas de aeração ao aquário. Deixar o aquário meio tampado (levemente aberto) para que o cloro presente na água evapore.

Notas:

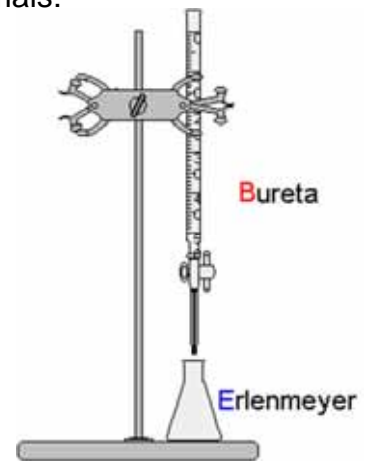
- Lavar juntamente o aerador (a ponta) da bomba de aeração e o caninho. Mensalmente, deve-se deixar pelo menos 1 dia de molho em água sanitária (hipoclorito de sódio) e detergente.

- Quando não precisar lavar o aquário, verificar se há água suficiente para a troca da cultura. Se necessário, encher com mais água de torneira utilizando o filtro “rede zooplâncton”.
- Ao final, anotar o nome e data da lavagem na ficha de controle.

2) Medição da dureza

- Levar o “kit de dureza” à capela. São os seguintes materiais:

- Proveta de 100 mL;
- Espátula de metal;
- Eriocromo;
- Béquer de plástico;
- Pipeta de 2 mL;
- NH_4Cl (Cloreto de amônio, na geladeira);
- Solução de EDTA (na geladeira);
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Bureta e suporte.



- Para medir a dureza, recolher **100 mL da água** do aquário medida na proveta.
- Colocar a água da proveta no erlenmeyer e adicionar **1,5 mL de solução de NH_4Cl** com auxílio da pipeta.
- Com a espátula de metal, recolher uma **quantidade mínima** de eriocromo e adicionar à solução no erlenmeyer, de modo que fique levemente **rosa**.
- Completar a bureta com o EDTA utilizando béquer, abrindo a válvula para retirar o excesso (com o béquer em baixo) e ajustar o menisco na marca 0 mL.
- Como na figura, titular a solução do erlenmeyer, mexendo-o e gotejando aos poucos o EDTA da bureta.
- Assim que a solução passar para a cor **roxa/azul** (ponto de virada), fechar a válvula e anotar o valor registrado na bureta, em mL.
- O valor multiplicado por 10 representa a dureza em **mg CaCO_3/L** .
- A dureza deve estar entre **40 e 48 mg CaCO_3/L** . Se estiver abaixo ou acima desses valores, utilizar o procedimento descrito em **3)**.

Notas:

- A **medição e ajuste da dureza** deve ser feita **toda semana** (de preferência de terça-feira), antes da troca de água dos organismos *Hyaella azteca* na quarta-feira. Além da dureza, o pH também deve ser medido, utilizando-se o pHmetro próprio*.
- Ao final, anotar o nome e data de medição e ajuste na ficha de controle.

* Para a medição do pH, utilizar o aparelho próprio de medição (pHmetro da pesquisa). O valor deve estar entre **7 e 7,6**. Caso esteja abaixo de 7, utilizar solução de NaOH e gotear aos poucos diretamente no aquário. Se o pH estiver acima de 7,6, utilizar solução de HCl para ajustar, gotejando no aquário.

Após 15 minutos, medir novamente o pH e ajustar novamente, se necessário.

Anotar o nome e data de medição e ajuste do pH na ficha de controle.

3) Manutenção da água - Ajuste de dureza

Abaixo de 40 mg CaCO₃/L

- Para o ajuste da dureza são necessários os seguintes materiais:
 - Solução 1;
 - Solução 2;
 - Régua ou fita métrica;
 - Calculadora;
 - Proveta de 100 mL.
- O valor encontrado da dureza medida deve ser subtraído de 44 (dureza ideal).
- Com o valor (x) encontrado, multiplica-se por 0,5 e pelo volume do aquário a ser ajustado (em litros) – medir a altura da coluna de água com régua, lembrando que o volume encontrado em cm³ dividido por 1.000 corresponde ao valor em litros – conforme a equação:

$$y = x \cdot 0,5 \cdot \text{volume (L)}$$

- O valor y encontrado corresponde à quantidade em mL de SOLUÇÃO 1 que deve ser adicionada ao aquário.
- O valor $y/2$ (metade de y) corresponde à quantidade em mL de SOLUÇÃO 2 que deve ser adicionada ao aquário.
- Utilizar a proveta graduada para a medição antes de despejar no aquário.

Acima de 50 mg CaCO₃/L

- Para o ajuste da dureza acima de 50, deve-se adicionar água de torneira com a rede/filtro correspondente.

O volume de água a ser adicionado é calculado segundo a equação:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

- Onde:
 - C_1 é a concentração atual da dureza acima de 50;
 - V_1 é o volume de água no aquário;
 - C_2 é a dureza ideal (44);
 - V_2 é o volume que o aquário teria para obter a dureza 44.
- Após determinado o valor de V_2 , o volume de água a ser adicionado ao aquário corresponde a $V_2 - V_1$.

Apêndice H

Procedimento Operacional Padrão (POP)

Preparo de soluções para medição e ajuste de dureza

1) EDTA

- Pesar em balança analítica **3,723g de EDTA** (ácido etilenodiamino tetraacético) e colocar em **1L de água destilada**, em balão volumétrico de 1L.
- **Misturar bem** até que a solução fique homogênea e armazenar em frasco âmbar.
- Manter sob refrigeração entre 4 e 10°C.

2) NH₄Cl

- Pesar **16,9g de NH₄Cl** (cloreto de amônio) em balança analítica;
- **Na capela**, dissolver o **NH₄Cl** em 143 mL de NH₄OH (hidróxido de amônio), tomando-se cuidado com a volatilização e odor da reação;
- Estocar em frasco tampado e manter sob refrigeração entre 4 e 10°C.

3) SOLUÇÃO 1

- Pesar **3g de Sulfato de Cálcio Dihidratado** (CaSO₄.2H₂O) e completar um balão volumétrico de 2L com água destilada.
- Acrescentar uma pulga magnética e colocar o balão em **agitação e brando aquecimento** até que a solução se dissolva (cerca de **24h**).
- Estocar em frasco âmbar e em temperatura ambiente.

4) SOLUÇÃO 2

- Adicionar a um balão volumétrico de 2L:
 - **0,4g de KCl** (Cloreto de Potássio);
 - **9,6g de NaHCO₃** (bicarbonato de sódio);
 - **12,2g de MgSO₄.7H₂O** (Sulfato de Magnésio Heptahidratado).

- Completar o volume até o menisco de **2L com água destilada**.
- Agitar bem e armazenar em frasco âmbar.
- Manter sob refrigeração entre 4 e 10°C.

Anexo A

Composição dos materiais utilizados como matéria orgânica para os sedimentos formulados

1) Ração TetraMin®

Composição: Farinha de peixe, leveduras, farinha de camarão, lecitina de soja, glúten de trigo, proteína de batata, farelo de aveia, farelo de soja, farinha de algas marinhas, óleo de soja degomado, óleo de peixe refinado, premix vitamínico, arroz integral, corante, sorbitol.

Constituintes analíticos:

- Proteína bruta: 47,0%
- Óleos e gorduras totais: 10,0%
- Teor de fibras: 3,0%
- Teor de umidade: 6,0%

Aditivos: Vitaminas, pró-vitaminas e substâncias quimicamente bem definidas de efeito semelhante, vitamina A 37600 IU/kg, vitamina D3 200 IU/kg.

Elementos traço:

- E5 Manganês 96 mg/kg
- E6 Zinco 57 mg/kg
- E1 Ferro 37 mg/g
- E3 Cobalto 0,7 mg/kg
- Antioxidantes

2) Ração Sera® para ciclídeos (Cichlid Sticks)

Composição: Farinha de peixe, amido de milho, glúten de trigo, farinha de trigo, gérmen de trigo, levedura de cerveja, óleo de peixe, farinha de gammarus, farinha de mexilhão de concha verde, alho.

Constituintes analíticos:

- Proteína bruta: 41,9%
- Gorduras totais: 7,0%
- Teor de fibras: 1,6%
- Teor de cinzas: 4,6%
- Teor de umidade: 4,2%

Aditivos por kg: Vitamina A 30000 IU, Vitamina B1 30 mg, Vitamina B2 90 mg, Vitamina C 550 mg, Vitamina D3 1500 IU, Vitamina E 60 mg.

Anexo B

Preparação do reagente molibdanovanadato (Roteiro de laboratório – Química Ambiental, Unesp/Sorocaba)

- a) Solução A: Dissolver 25 g de molibdato de amônio em 300 mL de água destilada;
- b) Solução B: Dissolver 1,25 g de metavanadato de amônio em 300 mL de água deionizada, aquecendo a mistura até completa dissolução do sal. Espera-se o resfriamento da solução e, então, são adicionados 330 mL de HCl concentrado.
- c) Espera-se o resfriamento da Solução B até a temperatura ambiente. À solução B é adicionada a Solução A, devendo-se misturar e diluir para volume final de 1 L.