

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

**ESTUDO DO CICLO DE VIDA DE UMA ESPÉCIE
SUBTROPICAL DE CHIRONOMIDAE (INSECTA:
DIPTERA) COM POTENCIAL USO NOS ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS**

IVAN VENÂNCIO DE OLIVEIRA NUNES

Janeiro de 2015.

Itajubá - MG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

IVAN VENÂNCIO DE OLIVEIRA NUNES

**ESTUDO DO CICLO DE VIDA DE UMA ESPÉCIE
SUBTROPICAL DE CHIRONOMIDAE (INSECTA:
DIPTERA) COM POTENCIAL USO NOS ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós –
Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos
como parte dos requisitos para obtenção do título de
mestre em Ciências do Meio Ambiente e Recursos
Hídricos.

Área de Concentração: Ecotoxicologia Aquática.

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Fonseca.

Janeiro de 2015.

Itajubá - MG

Nunes, Ivan Venâncio de Oliveira.

Estudo do Ciclo de Vida de uma Espécie Subtropical de Chironomidae (Insecta: Diptera) com Potencial Uso nos Ensaios Ecotoxicológicos. Ivan Venâncio de Oliveira Nunes - Itajubá: Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI / Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, 2015.

122 p.

Orientadora: Ana Lúcia Fonseca

Dissertação (Mestrado). UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá. Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, 2015.

1. *Chironomus sp.* 2. Ciclo de Vida. 3. Organismo Teste.
I. Fonseca, Ana Lúcia. II. Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI. III. Estudo do Ciclo de Vida de uma Espécie Subtropical de Chironomidae (Insecta: Diptera) com Potencial Uso nos Ensaios Ecotoxicológicos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

IVAN VENÂNCIO DE OLIVEIRA NUNES

**ESTUDO DO CICLO DE VIDA DE UMA ESPÉCIE
SUBTROPICAL DE CHIRONOMIDAE (INSECTA:
DIPTERA) COM POTENCIAL USO NOS ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS**

Dissertação aprovada por banca examinadora em 19 de janeiro de 2015,
conferindo ao autor o título de **Mestre em Ciências do Meio Ambiente e
Recursos Hídricos.**

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Ana Lúcia Fonseca (Orientadora);

Prof. Dr. Humberto Fonseca Mendes;

Prof. Dr. Sandro José de Andrade.

Dedico este trabalho aos meus pais, Casildo Benedito Nunes e Maria Lúcia de Oliveira Nunes e a minha irmã, Luciene Francine de Oliveira Nunes, por tornarem mais esse sonho possível de ser realizado.

A minha Orientadora Dra. Ana Lúcia Fonseca pela paciência, compreensão e colaboração nesta minha luta.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e deram forças em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço!

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças a cada dia para concluir mais essa etapa.

Agradeço aos professores Andreia Gomes e Roberto Junio que me incentivaram a continuar mesmo nos momentos mais difíceis da pesquisa.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Ana Lúcia Fonseca pelo apoio, colaboração e os ensinamentos que me proporcionou: Obrigado!

A CAPES, pela bolsa concedida, que possibilitou a minha dedicação exclusiva ao mestrado e a esse projeto de pesquisa.

Aos colegas do MEMARH e aos alunos da graduação em Engenharia Ambiental pelos momentos divertidos do mestrado. Em especial às colegas: Amanda Braga, Alessandra Rodrigues, Carol Machado, Jaqueline Borges, pelas conversas, dicas e incentivo e aluna Mariana Rangel pelo apoio na montagem dos ensaios.

Aos técnicos do IRN, principalmente a Elaine, João Victor pelos desabafos ouvidos e pela ajuda no projeto. Em especial gostaria de agradecer aos técnicos: Claudio e Osvaldinho, pela ajuda na montagem das gaiolas e pelos empréstimos dos materiais que o laboratório não tinha.

Agradeço aos Professores Luiz Carlos Pinho e Humberto Fonseca Mendes, pelo apoio e colaboração.

Agradeço a todos que me apoiaram e acreditaram na minha vitória.

“Mesmo que o futuro lhe pareça distante, ele
está começando neste exato momento”.

Mattie J. T. Stepanek.

RESUMO

Os organismos bentônicos são utilizados como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos por viverem parte do ciclo de vida no compartimento sedimento e terem contato com contaminantes conservativos. Protocolos elaborados pela USEPA (2000) e ASTM (2000) utilizam larvas de *Chironomus*, espécies *tentans* e *riparius*, respectivamente, com esta finalidade. No Brasil, estudos desenvolvidos por Fonseca e Rocha (2004) indicaram a espécie endêmica de *Chironomus xanthus*, como promissora. Porém, frente a grande biodiversidade dos trópicos faz-se necessário à busca de outras alternativas. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer as condições de cultivo em laboratório de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), de ocorrência subtropical, determinar os estágios larvais, por medições biométricas (biomassa corpórea, comprimento do corpo, comprimento ventral da cápsula cefálica e largura e comprimento da cápsula cefálica), bem como mensurar os valores de fecundidade, fertilidade e a porcentagem de eclosão para posterior aplicação nos testes ecotoxicológicos com as substâncias de referência (KCl e CdCl₂). A metodologia de cultivo seguiu a estabelecida por Fonseca e Rocha (2004). Para as medições biométricas, após a eclosão das larvas, diariamente foram coletadas 10 exemplares e fixados em solução de álcool 70 % e Glicerol (3:1) até a fase de emergência dos adultos. A mensuração dos dados biométricos foi realizada sob microscópio óptico com auxílio de ocular micrométrica e de paquímetro para as medidas do comprimento do corpo e tamanho da massa ovígera. Para obtenção da biomassa foram utilizadas 15 larvas/dia até a emergência dos adultos. Tal resultado mostrou o ganho médio diário de massa de cada estágio larval. A fecundidade, fertilidade e a porcentagem de eclosão foram obtidas através da metodologia estabelecida por Viveiros (2012). Os ensaios ecotoxicológicos tiveram a duração de 96h em todos os estágios larvais analisados, com exceção do primeiro estágio por ser planctônico, com o KCl. Tais resultados subsidiaram os ensaios com CdCl₂. O cálculo dos valores de CL50 (concentração letal média a 50% dos organismos) foi estimado pelo programa JSPEAR- Karber e a carta controle pela USEPA (2000). A duração do ciclo de vida da espécie foi de 15 a 16 dias (Ovo – adulto). O tamanho médio da massa ovígera foi de 16727µm ($\sigma = 6072$). A curva de crescimento obtida com valores do comprimento médio diário ventral da cápsula cefálica e comprimento médio diário do corpo em relação ao tempo apresentou 4 estágios bem diferenciados: estágio I (5 dias), estágio II (2 dias), estágio III (3 dias) e estágio IV (2 dias). Com relação à biomassa, para estágio I a massa corpórea média foi de 87,83µg ($\sigma = 39,27$), estágio II de 70,00 µg ($\sigma = 10,00$), estágio III 300,00µg ($\sigma = 3,33$) e estágio IV 761,22 µg ($\sigma = 25,14$). A fecundidade média foi de 437 ovos ($\sigma = 120$) e a fertilidade de 260 larvulas ($\sigma = 101$) com 58,63% de eclosão. Os valores médios de CL50 com o KCl foi de 4,19 g.L⁻¹ (3,21 a 5,18 g.L⁻¹) $\sigma = 0,49$ e Coeficiente de Variação (CV) de 11,76; 4,29 g.L⁻¹, (2,83 a 5,74 g.L⁻¹) $\sigma = 0,73$ e CV de 16,95 e de 2,90 g.L⁻¹ (1,35 a 4,45 g.L⁻¹) $\sigma = 0,78$ CV de 26,80 para os estágios II, III e IV respectivamente. Considerando o menor CV e o fato de que as larvas no estágio IV empulpam durante o teste, foi selecionado apenas o estágio II para ensaios com CdCl₂, que resultou em CL50 média de 0,61 mg.L⁻¹ (0,12 a 1,0 mg.L⁻¹) $\sigma = 0,24$). Comparando as porcentagens de eclosão obtidas no presente estudo com as obtidas por Viveiros (2012) para *Chironomus sancticaroli*, tais valores se mostraram mais promissores para *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014). Já os resultados dos ensaios com KCl foram similares aos obtidos por Fonseca (1997) com o *C. xanthus*. Os resultados obtidos no presente estudo permitem indicar o uso de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) nos ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimentos contaminados, após a devida descrição taxonômica.

Palavras-chave: *Chironomus sp*, Ciclo de Vida, Organismo-Teste.

ABSTRACT

Benthic organisms are used as test organisms in ecotoxicological assays because they live part of the life cycle in the sediment compartment and have contact with conservative contaminants. Protocols developed by USEPA (2000) and ASTM (2000) use *Chironomus* larvae, *tentans* and *riparius* respectively. In Brazil, studies carried out by Fonseca and Rocha (2004) indicated the endemic species of *Chironomus xanthus*, as promising. However, compared to the great biodiversity of the tropics it is necessary to search for other alternatives. In this sense, the present study aims first to establish the culture conditions in the laboratory of *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014). In this step were determined duration of the larval stages, by biometric measurements (body biomass, body length, length of ventral cephalic capsule and width and cephalic capsule length) and measure the values of fecundity, fertility and hatching rate, for further application in the ecotoxicological assays with reference substances (KCl and CdCl₂). The culture system was established following by Fonseca and Rocha (2004). For the biometric measurements, the larvae were collected daily after hatching 10 organisms and fixed in 70% alcohol and glycerol (3:1) until to emergence. The measurement of biometric data was performed under light microscope with the ocular micrometer and a caliper was used to the body length measures and size of the egg mass. For 15 larvae were used biomass / day until emergence, the result was used to calculate the average biomass for each larva. Fecundity, fertility and hatching rate were obtained according to Viveiros (2012). The duration of assays were 96 hours for KCl of all larval stages, except the first stage, because it is planktonic. These results allowed the tests with CdCl₂. The calculation of LC50 values (lethal concentration average 50% of organisms), was estimated by JSPEAR- Karber program and the control-chart by USEPA. (2000). The duration of the life cycle was 15-16 days (egg to adult). The average size of the egg mass was 16727µm ($\sigma = 6072$). The growth curve with values from the ventral daily average length of head capsule and body daily average length/time had 4 different stages: Stage I (5 days), stage II (2 days), stage III (3 days) and stage IV (2 days). With regard to biomass, for stage I the average body mass was 87,83µg ($\sigma = 39,27$), stage II 70,00 µg, ($\sigma = 10,00$), stage III 300,00µg ($\sigma = 3,33$) and stage IV 761,22 µg ($\sigma = 25,14$). The fecundity mean was 437 eggs, ($\sigma = 120$) and the fertility of 260 larvulas ($\sigma = 101$) with 58, 63% hatching. Mean LC50 values with KCl was 4,19 g.L⁻¹ (3,21 to 5,18 g.L⁻¹) $\sigma = 0,49$ and coefficient of variation (CV) 11,76; 4,29 g.L⁻¹ (2,83 to 5,74 g.L⁻¹ $\sigma = 0,73$) and CV of 16,95 and 2,90 g.L⁻¹ (1,35 to 4,45 g.L⁻¹ $\sigma = 0,78$) 26,80 CV for stages II, III and IV respectively. Considering the low CV and the larvae pupate in stage IV, was used the stage II for assays with CdCl₂. The results were the LC50 = 0,61 mg.L⁻¹ (0,12 to 1,0 mg.L⁻¹ $\sigma = 0,24$). Life cycle data obtained in the present study were similar to Viveiros (2012) with *Chironomus sancticaroli* and the bioassays with KCl for reference substance were similar to those obtained to Fonseca (1997) with *C. xanthus*. The results obtained in this study allows indicate the use of *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) in the ecotoxicological tests with contaminated sediment samples, after proper taxonomic description.

Keywords: *Chironomus sp*, Lyfe Cycle, Test–organism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de Chironomidae (sem escala).....	24
Figura 2 - Fêmea de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) capturada.	31
Figura 3 - Esquema do sistema aplicado no cultivo de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) (A). Sistema de cultivo implantado no laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Itajubá (B).....	32
Figura 4 - Ração Floculada de Peixes TetraMin® Tropical Flakes.	34
Figura 5 - <i>Selenastrum capricornutum</i> (A). Cultivo da alga no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI (B).	34
Figura 6 - Vista espacial do ponto de coleta da água (A). Comunidade Sol de Deus (B).....	35
Figura 7 - Vista espacial do ponto de coleta do sedimento (A). Local da coleta no Rio Lourenço Velho (B).....	36
Figura 8 – Quantificação das amostras de sedimento em triplicatas (A). Efervescência das amostras provocada pela adição de Peróxido de Hidrogênio (B). Sifonação do sobrenadante (C). Secagem das amostras em estufa à 105°C por 24 horas (D).	37
Figura 9 - Homogeneização das amostras (A). Retiradas das alíquotas de Argila (B). Lavagem das amostras de sedimento para retirada de Silte e Argila (C). Secagem do sedimento em estufa (D).	38
Figura 10 - Peneirador utilizado para separar as frações granulométricas pré – estabelecidas por Fonseca e Rocha (2004).	39
Figura 11 - Macho de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO,2014) (A). Fêmea de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO,2014) (B).	40
Figura 12 - Comprimento ventral da Cápsula cefálica (A). Largura da Cápsula cefálica (B). Comprimento da Cápsula cefálica (C).....	41
Figura 13 - Comprimento do corpo (A). Paquímetro utilizado na medição (B).	41
Figura 14 - Determinação da biomassa.	42
Figura 15 - Isolamento das pupas (A). Comprimento da Pupa (B). Comprimento do indivíduo adulto (C).....	43
Figura 16 - Massa ovígera aderida a bandeja.	44
Figura 17 - Desova após postura (A). Após 24 h (B). Após 48 h (C).	44
Figura 18 - Tamanho do ovo.	45
Figura 19 – Comprimento da desova (A). Fotografia da desova (B). Contagem manual dos	

ovos em Microsoft Paint® versão 2009 (ovos contados marcados em vermelho) (C). Incubadora de DBO utilizada na para manter as desovas por 48 horas (D). Contagem das larvas em luz intensa (E).	46
Figura 20 – Larvas de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) em coloração vermelho vivo.	51
Figura 21 - Curva de crescimento de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) obtida a partir do comprimento médio diário ventral da Cápsula cefálica em relação ao tempo, em condições laboratoriais (23°C, fotoperíodo: 12/12h).	53
Figura 22 - Curva de crescimento de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) obtida a partir do comprimento médio diário do corpo em relação ao tempo, em condições laboratoriais (23°C, fotoperíodo: 12/12h).	54
Figura 23 - Relação entre o comprimento médio diário ventral da cápsula cefálica e o comprimento médio diário do corpo de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014).	55
Figura 24 - Curva de crescimento de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) obtida a partir do comprimento médio diário ventral da Cápsula cefálica e da biomassa média diária em relação ao tempo, em condições laboratoriais (23°C, fotoperíodo: 12/12h).	62
Figura 25 - Relação entre a biomassa média diária e o comprimento médio diário do corpo de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014).	62
Figura 26 - Vista do 4º dente lateral do mento larval de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) (A). Vista do pente epifaríngeo larval de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) (B).	65
Figura 27 - Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) em larvas dos estágios II, III e IV.	86
Figura 28 - Recipientes acondicionados na bandeja para o teste de sensibilidade separados por concentração (A). Larvas expostas nas concentrações desejadas (B). Bandejas cobertas e com pano preto e colocadas em sala com temperatura controlada (C).	87
Figura 29 - Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de cádmio em larvas do estágio II.	89
Figura 30 - Carta Controle obtida para organismos do estágio II de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014), submetidos ao KCl.	91
Figura 31 - Carta Controle obtida para organismos do estágio III de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014), submetidos ao KCl.	91
Figura 32 - Carta Controle obtida para organismos do estágio IV de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014), submetidos ao KCl.	91

Figura 33 - Valores do teste de Tukey (ANOVA) $p < 0,01$	92
Figura 34 – Curva da concentração/resposta obtida para os organismos do estágio II de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO,2014), submetidos ao $CdCl_2$	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Materiais e métodos utilizados para mensurar as variáveis: pH, condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dureza ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}$) da água de cultivo de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014).	35
Quadro 2 - Materiais e métodos utilizados para mensurar as variáveis: pH, condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dureza ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}$) nos ensaios com as substâncias de referência KCl e CdCl_2	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações granulométricas do sedimento utilizado para cultivo da espécie <i>Chironomus xanthus</i> , Fonseca e Rocha (2004), com modificações na quantidade utilizada...33	33
Tabela 2 - Resultados das frações granulométricas obtidas das amostras de sedimento coletado no rio Lourenço Velho, Itajubá - MG.50	50
Tabela 3 – Valores máximo e mínimo (μm) dos comprimentos ventral e total da Cápsula cefálica, largura da Cápsula cefálica, comprimento do corpo das larvas de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) e tempos de duração dos estágios larvais, sob condições de cultivo em laboratório.....53	53
Tabela 4 - Valores comparativos do comprimento ventral da Cápsula cefálica (μm), Comprimento da Cápsula cefálica, largura da Cápsula cefálica e Comprimento do corpo, obtido por diferentes autores e espécies de Chironomidae, em cultivo laboratorial.56	56
Tabela 5 – Taxa de crescimento (r) entre os estágios larvais para as medições de comprimento médio ventral da Cápsula cefálica (C.C.), comprimento da Cápsula cefálica, largura da Cápsula cefálica e comprimento do corpo com seus respectivos desvios-padrão para <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014).60	60
Tabela 6 - Proporções de volumes para preparo das soluções – teste com KCl.....85	85
Tabela 7 - Proporções de volumes para preparo das soluções – teste com CdCl_289	89
Tabela 8 - Valores de CL_{50} – 96h g.L^{-1} KCl e análise estatística das variáveis descritivas (desvio padrão, média e coeficiente de variação) obtidas nos testes de sensibilidade ao KCl, para os estágios II, III e IV de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014).90	90
Tabela 9 - Diferença comparativa entre as médias de CL_{50} para os estágios larvais, II, III e IV obtidas nos ensaios de sensibilidade com KCl pelo teste de Tukey (ANOVA) $p < 0,01$92	92
Tabela 10 - Leitura e estatísticas descritivas das variáveis pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade (mS.cm^{-1}), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{.L}$) obtidas nos ensaios de toxicidade aguda com KCl.....93	93
Tabela 11 - Valores de CL_{50} – 96h mg.L^{-1} CdCl_2 e análise estatística das variáveis descritivas obtidas nos testes de sensibilidade, para os estágio II de <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO,2014).....96	96
Tabela 12 - Leitura e estatísticas descritivas das variáveis pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade (mS.cm^{-1}), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{.L}$) obtidas no ensaio de toxicidade aguda com CdCl_296	96

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Estimativa da porcentagem de Matéria Orgânica.....	36
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
CAPÍTULO 1 – ASPECTOS DO CICLO DE VIDA DE <i>Chironomus affinis xanthus</i> (INSECTA: DIPTERA: CHIRONOMIDAE)	20
1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
2 - OBJETIVOS.....	22
2.1 - GERAL.....	22
2.2 - ESPECÍFICOS.....	22
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 - CHIRONOMIDAE: ASPECTOS DO CICLO DE VIDA E BIOLOGIA.....	23
3.2 - ESTUDOS TAXONÔMICOS SOBRE CHIRONOMIDAE NO BRASIL	25
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 - COLETA DO ORGANISMO EM CAMPO, ISOLAMENTO, CULTIVO E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO	31
4.1.1 - Preparo do Alimento: Solução de Ração de Peixes e de Algas Clorofíceas	33
4.1.2 - Água de Cultivo	34
4.1.3 - Substrato de Cultivo	35
4.1.3.1 - Determinação do Percentual de Matéria Orgânica e Frações granulométricas	36
4.1.3.2 - Peneiramento	38
4.2 - PARÂMETROS DO CICLO DE VIDA DE <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) E DURAÇÃO DOS ESTÁGIOS LARVAIS EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS.....	39
4.2.1 - Determinação dos dados biométricos larvais	40
4.2.2 - Determinação da biomassa – Fase Larval	42
4.2.3 - Duração e Tamanho das Pupas e dos Indivíduos Adultos.....	43
4.3 - DURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA MASSA OVÍGERA, TAMANHO DA MASSA OVÍGERA, DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE FECUNDIDADE, FERTILIDADE E PORCENTAGEM DE ECLOSÃO	43
4.3.1 - Tamanho médio dos ovos.....	44
4.3.2 - Tamanho da massa ovígera, Determinação da Fecundidade, Fertilidade e Taxa de Eclosão	45
4.4 - CONFIRMAÇÃO TAXONÔMICA	47
4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 - COLETA DO ORGANISMO EM CAMPO, ISOLAMENTO, CULTIVO E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO	48
5.2 - PARÂMETROS DO CICLO DE VIDA DE <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) E DURAÇÃO DOS ESTÁGIOS LARVAIS EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS.....	52
5.3 - DURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA MASSA OVÍGERA, TAMANHO DA MASSA OVÍGERA, DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE FECUNDIDADE, FERTILIDADE E PORCENTAGEM DE ECLOSÃO	63
5.4 - CONFIRMAÇÃO TAXONÔMICA	65
6 - CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO I.....	71
ANEXO II	72
ANEXO III.....	73

CAPITULO 2 – SENSIBILIDADE DE <i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014) AS SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA: CLORETO DE POTÁSSIO E CLORETO DE CÁDMIO.....	74
2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	75
2 - OBJETIVOS.....	78
2.1 - GERAL.....	78
2.2 - ESPECÍFICOS.....	78
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	79
3.1 - ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA	79
3.2 - BIOINDICADORES	82
3.3 - SENSIBILIDADE A SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA	83
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
4.1 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CULTIVO POR MEIO DE ENSAIO DE SENSIBILIDADE COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl).....	85
4.2 - VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS MONITORADAS NOS ENSAIOS	88
4.3 - EFEITOS AGUDOS AO CLORETO DE CÁDMIO (CdCl₂).....	88
4.4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	89

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CULTIVO POR MEIO DE ENSAIO DE SENSIBILIDADE COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl).....	90
5.2 - VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS MONITORADAS NOS ENSAIOS	93
5.3 - EFEITOS AGUDOS AO CLORETO DE CÁDMIO (CdCl₂).....	95
6 - CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO I	105
ANEXO II	106
ANEXO III	108
ANEXO IV	109
ANEXO V	111
ANEXO VI	113
ANEXO VII	115
ANEXO VIII	117
ANEXO IX	119
ANEXO X	121

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são considerados como os maiores receptores de contaminantes, sejam por fontes pontuais tais como os efluentes domésticos e industriais, ou não pontuais, como águas de chuvas e lixiviados advindos de regiões agrícolas (IPEN, 2013).

O acúmulo e a persistência de contaminantes nos ambientes aquáticos, principalmente no compartimento sedimento, constituem uma ameaça à biota, uma vez que podem ser tóxicos, além da própria degradação do ecossistema (WHITE; RASMUSSEN, 1998; FLEEGER et al., 2003 apud PANTALEÃO, 2006).

De acordo com Silvério (1999) o sedimento de um sistema aquático é considerado um compartimento dinâmico, capaz de criar habitats favoráveis à permanência da biota bêntonica, visto que é constituído de matéria orgânica e de partículas de diferentes tamanhos granulométricos.

Um dos principais grupos de organismos vivos no sedimento são os macroinvertebrados bentônicos. Tais organismos apresentam ciclos de vida relativamente longos e em sua maioria são sesséis e detritívoros, dentre outras características. Por estas razões são recomendados como bioindicadores de qualidade de água, com ênfase para amostras de sedimentos contaminados (OLIVEIRA, 2009).

A comunidade de macroinvertebrados bentônicos de água doce é composta por organismos com tamanho superior a 0,5 mm, sendo visíveis a olho nu (PÉREZ, 1996). Ela é representada principalmente pelos Filos Arthropoda, Platyhelminthes, Nematoda, Anellida e Mollusca (KANNO, 2013). Dentro do filo Arthropoda, a Classe Insecta (Diptera, Ephemeroptera, Odonata, Hemiptera e Coleoptera) contém mais de 750.000 espécies descritas, sendo, portanto, o maior grupo de animais existentes no planeta (WETZEL, 1991).

Como componente da Classe Insecta, a família Chironomidae (Ordem Diptera) apresenta ampla distribuição geográfica (TRIVINHO - STRIXINO; STRIXINO, 1995) e seus representantes juntamente com os da classe Oligochaeta, constituem os grupos mais abundantes da comunidade bentônica (FONSECA; ROCHA, 2004). Os quironomídeos são compostos de organismos adaptáveis a muitos tipos de ambientes e apresenta uma grande riqueza de espécies (JANKE, 2009). Possuem papel importante na ciclagem de nutrientes e são importantes na dieta de pássaros e peixes de água doce (BAUDIN; NUCHO, 1992, FONSECA, 1997).

Tais organismos têm sido utilizados como organismos-teste nos ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimentos contaminados, como por exemplo: *Chironomus tentans* e *Chironomus riparius* com protocolos e procedimentos padrão estabelecidos pela USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2000 e ASTM (American Society for Testing and Materials), 2000 respectivamente (JANKE, 2009). No Brasil, a espécie *C. xanthus*, foi proposta por Fonseca e Rocha (2004) para uso como organismo-teste. Porém o mesmo ainda não possui protocolos ou procedimentos padrão para usos estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), que órgão responsável pela normalização técnica no Brasil.

Em face da grande biodiversidade nos trópicos e sub trópicos, faz-se necessário o estudo de outras espécies de ocorrência nestas regiões, visando avaliar sua sensibilidade, bem como aumentar a disponibilidade de organismos a serem utilizados em programas de biomonitoramento com abordagem ecotoxicológica.

Neste sentido, o presente trabalho inicialmente isolou uma espécie de *Chironomus*, estabeleceu as condições de cultivo em laboratório e obteve informações sobre o ciclo de vida do organismo. Com o auxílio do taxonomista Dr. Luiz Carlos Pinho a espécie isolada foi denominada de *Chironomus affinis xanthus*, pois esta se assemelha a espécie *Chironomus xanthus*, quando os indivíduos machos adultos são comparados, porém na fase larval existem características morfológicas no 4º dente lateral do mento e no pente epifaríngeo que a destingue da espécie de *C. xanthus*. Tais informações são apresentadas no primeiro capítulo da presente dissertação.

Posteriormente com intuito de avaliar sua potencialidade para uso em estudos ecotoxicológicos, foram realizados ensaios de efeito agudo com substâncias de referência. O conteúdo desta abordagem encontra-se no capítulo 2.

**CAPÍTULO 1 – ASPECTOS DO CICLO DE VIDA DE
Chironomus affinis xanthus (INSECTA: DIPTERA:
CHIRONOMIDAE)**

1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Chironomidae (Diptera) é o grupo mais abundante de insetos aquáticos de água doce, possuem ampla distribuição e alta densidade. Seus estágios larvais estão associados ao sedimento e a presença de macrófitas. Algumas espécies são tolerantes ao estresse ambiental podendo ocorrer em vários habitats diferentes, desde rios, lagos a grandes reservatórios. Existem espécies típicas de águas frias e outras de água quente. Podem ocorrer em habitats pobres em oxigênio ou bem oxigenados. Os indivíduos imaturos destes organismos representam um importante papel na cadeia alimentar, já que são fonte de alimento para peixes, aves e anfíbios (FONSECA; ROCHA, 2004; ZILLI et al., 2008; CANTEIRO; ABERTONI, 2011).

A variabilidade das condições ambientais onde os Chironomidae são encontrados é mais extensa do que qualquer outro grupo de insetos aquáticos. Essa amplitude ecológica está relacionada com as adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais desta família (CANTEIRO; ABERTONI, 2011). As larvas de Chironomidae participam da ciclagem de nutrientes e devido a sua abundância anual contribuem para a produtividade dos sistemas aquáticos (ZILLI et al. 2008). São organismos holometábolos, pois apresentam metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adulto).

Segundo Zilli e outros (2008) a identificação da espécie *Chironomus* é difícil já que muitos espécimes não podem ser separados por sua morfologia externa larval e os adultos mostram grande variação intraespecífica de caracteres morfológicos, sendo assim, recomenda-se uma análise das características de todo o ciclo de vida, juntamente com a análise cito-taxonômica de cromossomos, tendo como exemplo *Chironomus reissi* (CORREIA; TRIVINHO-STRIXINO; MICHAILOVA, 2005), *Chironomus plumosus* (BORIS; MICHAILOVA, 2008) e *Chironomus amissum sp.n.* (CORREIA; TRIVINHO-STRIXINO; MICHAILOVA, 2013), que já possuem cariótipos definidos.

O conhecimento do ciclo vida e seus atributos bionômicos tais como: duração do desenvolvimento larval, taxas de eclosão e de emergência são essenciais para compreender melhor a biologia e ecologia desta família, principalmente quando se pretende verificar a utilização destes organismos em bioensaios de toxicidade, já que estes organismos são amplamente utilizados como bioindicadores de condições ambientais.

2 - OBJETIVOS

2.1 - GERAL

- Cultivo em laboratório de uma espécie subtropical de *Chironomus* (Diptera: Chironomidae).

2.2 - ESPECÍFICOS

- Estabelecer a duração do ciclo de vida da espécie selecionada em condições laboratoriais;
- Conhecer os atributos bionômicos e reprodutivos, com ênfase na fecundidade e sobrevivência das larvas;
- Estabelecer as melhores condições de cultivo em laboratório para uso nos ensaios ecotoxicológicos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - CHIRONOMIDAE: ASPECTOS DO CICLO DE VIDA E BIOLOGIA

Em Chironomidae, o ciclo de vida inicia com a deposição dos ovos na água pelas fêmeas fertilizadas pelos machos, após o vôo de acasalamento (TRIVINHO-STRIXINO, 2011) (Figura 1).

As massas ovíferas podem ser cilíndricas, esféricas ou em fita. No interior dessa massa gelatinosa, o ovo inicia seu desenvolvimento embrionário que dura em média 40 horas a uma temperatura de 22 a 25°C (TRIVINHO STRIXINO, 2011).

As larvas de Chironomidae passam por cinco ecdises durante seu desenvolvimento, primeiro e segundo estágio, segundo e terceiro estágio, terceiro e quarto estágio, quarto estágio e pupa e por último, pupa e adulto (FONSECA, 1997; CANTEIRO; ABERTONI; 2011). Na fase larval, os organismos visam armazenar energia necessária para a fase adulta, que dura poucos dias e o organismo, na maioria das vezes, não se alimenta (FONSECA, 1997).

Os quironomídeos começam a construção de seus casulos, formados por seda e lodo e localizados a poucos centímetros do sedimento, a partir do segundo estágio larval, pois no primeiro estágio as larvas têm o hábito planctônico. Quando as larvas atingem o quarto estágio os organismos passam para o estágio de pupa que possui coloração vermelha escura, sendo esta a última fase antes de atingir a fase adulta, que é aérea (FONSECA; ROCHA, 2004).

De acordo com Trivinho-Strixino (2011)

“As larvas de Chironomidae possuem uma cabeça bem desenvolvida, não retrátil, com peças bucais mastigadoras; o corpo consistindo de 13 segmentos (3 torácicos e 10 abdominais); o primeiro segmento torácico e o último segmento abdominal carregam ventralmente pares de pseudópodos dotados de numerosas garras. Estas garras irão auxiliar na locomoção, na alimentação e na fixação da larva no interior do casulo. Em alguns grupos de águas correntes estas garras são mais fortes e auxiliam na fixação da larva à rocha. No último segmento abdominal estão localizadas dorsalmente duas projeções tubulares denominadas prócercos, contendo tufo de cerdas nas suas extremidades”.

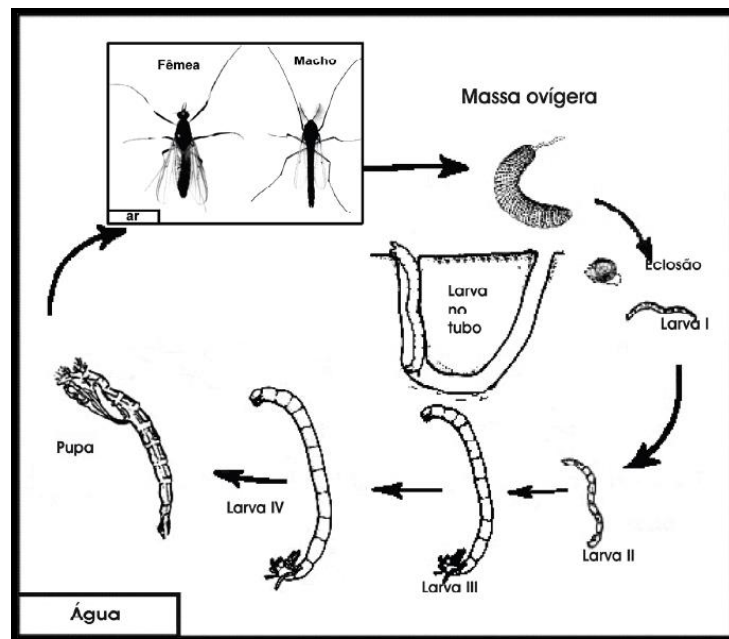


Figura 1 – Ciclo de vida de Chironomidae (sem escala). **Fonte:** Trivinho-Strixino, 2011.

A fase de pupa é relativamente curta, mais é neste ponto que a larva após a metamorfose e consequente ecdise muda para forma adulta (CANTEIRO; ABERTONI, 2011).

As pupas têm vida efêmera emergindo em poucos segundos, quando vêm à superfície da água e é neste momento e que estas se tornam mais vulneráveis à predação (TRIVINHO-STRIXINO, 2011). Os machos adultos geralmente formam bandos para atrair as fêmeas (CANTEIRO; ABERTONI, 2011) e ambos os adultos requerem apenas um abrigo para o acasalamento e posterior oviposição (FONSECA; ROCHA, 2004).

Como já mencionado os ovos ficam contidos numa massa gelatinosa que em contato com a água se expande e adquire diferentes formas de acordo com o táxon (TRIVINHO-STRIXINO, 2011). Segundo esta mesma autora, as fêmeas normalmente realizam uma única postura, mas de acordo com a estrutura dos ovariolos, outras massas ovígeras menores podem acontecer.

Os ovariolos de Chironomidae iniciam seu amadurecimento no 4º estágio larval e quando as fêmeas emergem, os ovócitos estão quase maduros. Espécies que habitam ambientes instáveis, como as zonas intertidais, podem apresentar os ovócitos já maduros ao emergirem as fêmeas (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Além de pequenas modificações morfológicas, é possível diferenciar os estágios larvais pelo tamanho da cabeça, ou por outras estruturas cefálicas (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

O crescimento deste grupo segue uma curva logística e é dependente da temperatura. No ambiente a fase larval pode durar desde poucos dias (7 dias em *Apedilum elachistus*), até semanas para (*Chironomus* e *Goeldichironomus*) e em regiões frias pode durar 1 ano ou até mais (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

3.2 - ESTUDOS TAXONÔMICOS SOBRE CHIRONOMIDAE NO BRASIL

Os Chironomidae pertencem à Classe Insecta, ordem Diptera, subordem Culicomorpha. A origem do nome provém do grego chir(o), que transmite a idéia de “mão”, já que os adultos tem o hábito de manter levantados os apêndices anteriores, como se fossem braços estendidos (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1999).

Segundo Mendes e Pinho (2008) os Chironomidae possuem uma ampla distribuição geográfica reunindo 11 subfamílias num total de 355 gêneros. Estimativas rudes dizem que o número de espécies desta família pode ser 10.000 ou 20.000, sendo mais de 4000 espécies viventes na água doce (FERRINGTON, 2008, apud CANTEIRO, 2008). Cinco destas subfamílias ocorrem no Brasil (MENDES; PINHO, 2014a).

Na região Neotropical, onde o Brasil está inserido, existem 109 gêneros e 1500 espécies (ASHE et al., 1987; FITTKAU; REISS, 1979 apud CANTEIRO, 2008), com 374 espécies registradas no Brasil, sendo 21 espécies do gênero *Chironomus* (MENDES; PINHO, 2014b).

Os primeiros estudos taxonômicos de Chironomidae no Brasil datam de 1940 pelo Dr. Sebastião José de Oliveira. Na década de 60 teve início os trabalhos na Amazônia pelo Dr. Ernest Joseff Fittkau e na década de 70 o grupo do Dr. Giovanni Strixino começa os seus estudos no Estado de São Paulo (CANTEIRO, 2008).

Posteriormente outros estudos foram realizados sobre os ciclos de vida e desenvolvimento de Chironomidae no Brasil, por exemplo: Trivinho-Strixino e Strixino (1982, 1989 e 1995), Strixino e Trivinho-Strixino (1985); Correia (2004); Corbi e Trivinho-Strixino (2006) (CANTEIRO; ALBERTONI, 2011) e Mendes e Pinho (2012, 2013 e 2014).

Embora já exista uma grande quantidade de trabalhos envolvendo os Chironomidae, estes apenas abrangem o “status” taxonômico de família ou subfamília e são considerados pouco abrangentes, principalmente no que diz respeito às formas imaturas (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006, MENDES; PINHO, 2008; CANTEIRO, 2008).

No Estado de Minas Gerais estão registradas 4 espécies de Chironomidae sendo elas: *Axarus froehlichii* (ANDERSEN; MENDES, 2002) *Chironomus xanthus* (REMPEL, 1939) *Goeldichironomus holoprasinus* (GOELDI, 1905) e *Nilothauma reissi* (SOPONIS, 1987) (MENDES; PINHO, 2008).

Segundo Mendes e Pinho (2014b) as principais espécies de Chironominae encontradas no Brasil estão listadas abaixo:

- Aedokritus* Roback, 1958;
Aedokritus coffeatus Trivinho-Strixino, 1997;
Aedokritus sartis Roback, 1960;
Aedokritus souzalopesi Oliveira; Messias, 1989;
Apedilum Townes, 1945;
Apedilum elachistum Townes, 1945;
Asheum Sublette; Sublette, 1983;
Asheum beckae Sublette; Sublette, 1964;
Axarus Roback, 1980;
Axarus corycus Mendes; Andersen, 2010;
Axarus froehlichii Andersen; Mendes, 2002;
Axarus villosus Mendes; Andersen, 2010;
Beardius Reiss; Sublette, 1985;
Beardius abbadi Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius arawak Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius bizzoii Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius bucephalus Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius cristhinae Trivinho-Strixino; Siqueira, 2007;
Beardius curticaudatus Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius dioi Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius fittkaii Pinho; Mendes; Andersen, 2009;
Beardius hirtidorsum Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius krenak Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius kumadueni Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius longicaudatus Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius mileneae Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius nebularius Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius neusae Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius novoairensis Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius parvus Reiss; Sublette, 1985;
Beardius phoenix Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius phytophilus Trivinho-Strixino; Strixino, 2000;
Beardius roquei Trivinho-Strixino; Siqueira, 2007;
Beardius sapiranga Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius tupinamba Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius urupeatan Pinho; Mendes; Andersen, 2009;
Beardius vanessae Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beardius xylophilus Trivinho-Strixino; Strixino, 2000;
Beardius yperoig Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Beckidia Sæther, 1979;
Caladomyia Säwedald, 1981;
Caladomyia adalberti Säwedald, 1981;
Caladomyia angelae Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia bruneola Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia canine Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia capaopreto Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia carolae Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia carolensis Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia castelnaui Säwedald, 1981;
Caladomyia comunis Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia curumim Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia erikae Reiff, 2000;
Caladomyia fittkaii Reiff, 2000;
Caladomyia friederi Trivinho-Strixino; Strixino, 2000;
Caladomyia hero Reiff, 2000;
Caladomyia hoefleri Reiff, 2000;
Caladomyia humboldti Säwedald, 1981;
Caladomyia jarágua Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia kapilei Trivinho-Strixino, 2012;
Caladomyia kraussi Säwedald, 1981;
Caladomyia mulleri Säwedald, 1981;
Caladomyia orellanai Reiff, 2000;
Caladomyia ortonii Säwedald, 1981;
Caladomyia poppigi Säwedald, 1981;
Caladomyia reissi Reiff, 2000;
Caladomyia riotarumensis Reiff, 2000;

- Caladomyia spixi* Säwedal, 1981;
Caladomyia tuberculata Reiss, 1972;
Caladomyia yara Trivinho-Strixino, 2012;
Chironomus Meigen, 1803;
Chironomus amissum Correia; Trivinho-Strixino;
 Michailova, 2013;
Chironomus antonioi Correia; Trivinho-Strixino, 2007;
Chironomus atripennis Rempel, 1939;
Chironomus brasiliensis Wiedemann, 1928 *nomen dubium*;
Chironomus calligraphus Goeldi, 1905;
Chironomus columbiensis Wülker; Sublette; Morath ;
 Martin, 1989;
Chironomus detriticola Correia; Trivinho-Strixino, 2007;
Chironomus ferrugineus Macquart, 1838 *nomen dubium*;
Chironomus fittkaui Correia; Trivinho-Strixino, 2007;
Chironomus gigas Reiss, 1974;
Chironomus inquinatus Correia; Trivinho-Strixino;
 Michailova, 2006;
Chironomus latistylus Reiss, 1974;
Chironomus oliveirai Correia; Trivinho-Strixino, 2007;
Chironomus paragigas Reiss, 1974;
Chironomus reissi Correia; Trivinho-Strixino;
 Michailova, 2005.
Chironomus stigmaterus Say, 1823;
Chironomus strenzkei Fittkau, 1968;
Chironomus trilobatus Rempel, 1939 *nomen dubium*;
Chironomus trimaculatus Macquart, 1838 *nomen dubium*;
Chironomus xanthus Rempel, 1939;
Cladopelma Kieffer, 1921;
Cladopelma forcipis Rempel, 1939;
Cladotanytarsus Kieffer, 1921;
Constempellina Brundin, 1947
Cryptochironomus Kieffer, 1918;
Cryptochironomus brasiliensis Silva; Trivinho-Strixino;
 Oliveira, 2010;
Cryptochironomus mantiqueira Silva; Trivinho-Strixino;
 Oliveira, 2010;
Cryptochironomus reshchikovi Silva; Trivinho-Strixino;
 Oliveira, 2010;
Cryptotendipes Lenz, 1941;
Cyphomella Sæther, 1977;
Demicryptochironomus Lenz, 1941;
Dicrotendipes Kieffer, 1913;
Dicrotendipes amazonicus Epler, 1988;
Dicrotendipes dasylabidus Epler, 1988;
Dicrotendipes demissus Epler, 1988;
Dicrotendipes fittkaui Epler, 1988;
Dicrotendipes paradasylabidus Epler, 1988;
Dicrotendipes paterjohni Epler, 1988;
Dicrotendipes radinovskiyi Epler, 1988;
Dicrotendipes reissi Epler, 1988;
Dicrotendipes sinoposus Epler, 1988;
Dicrotendipes soccus Epler, 1988;
Dicrotendipes tritonus Kieffer, 1916;
Einfeldia Kieffer, 1924;
Endochironomus Kieffer, 1918;
Endotribelos Grodhaus, 1987;
Endotribelos albatum Sublette; Sasa, 1994;
Endotribelos calophylli Roque; Trivinho-Strixino, 2008;
Endotribelos euterpe Roque; Trivinho-Strixino, 2008;
Endotribelos ficus Roque; Trivinho-Strixino, 2008;
Endotribelos grodhausi Sublette; Sasa, 1994;
Endotribelos talaumae Roque; Trivinho-Strixino, 2008;
Fissimentum Cranston; Nolte, 1996;
Fissimentum desiccatum Cranston; Nolte, 1996;
Fissimentum fordlandense Pinho; Froehlich, 2011;
Fissimentum guairense Pinho; Froehlich, 2011;
Fissimentum mateusi Pinho; Froehlich, 2011;
Gillotia Kieffer, 1921;
Glyptotendipes Kieffer, 1913;
Goeldichironomus Fittkau, 1965;
Goeldichironomus amazonicus Fittkau, 1968;
Goeldichironomus fluctuans Reiss, 1974;
Goeldichironomus holoprasinus Goeldi, 1905;
Goeldichironomus luridus Trivinho-Strixino;
 Strixino, 2005;
Goeldichironomus maculatus Trivinho-Strixino;
 Strixino, 1991;
Goeldichironomus natans Reiss, 1974;
Goeldichironomus neofulvus Rempel, 1939 *nomen dubium*;

- Goeldichironomus neopictus* Trivinho-Strixino; Strixino, 1998;
- Goeldichironomus petiolicola* Trivinho-Strixino; Strixino, 2005;
- Goeldichironomus pictus* Reiss, 1974;
- Goeldichironomus serratus* Reiss, 1974;
- Goeldichironomus xiborena* Reiss, 1974;
- Harnischia* Kieffer, 1921;
- Hyporhygma* Reiss, 1982;
- Kiefferulus* Goetghebuer, 1922;
- Lauterborniella* Thienemann; Bause, 1913;
- Manoa* Fittkau, 1963;
- Manoa obscura* Fittkau, 1963;
- Microchironomus* Kieffer, 1918;
- Micropsectra* Kieffer, 1909;
- Microtendipes* Kieffer, 1915;
- Nandeva* Wiedenbrug; Reiss; Fittkau, 1998;
- Nandeva gaucha* Wiedenbrug; Reiss; Fittkau, 1998;
- Nandeva latiloba* Sæther; Roque, 2004;
- Nandeva tropica* Wiedenbrug; Reiss; Fittkau, 1998;
- Nandeva strixinorum* Sæther; Roque, 2004;
- Nandeva verruculata* Andersen; Sæther; Contreras-Ramos, 2011;
- Nilothauma* Kieffer, 1920;
- Nilothauma amazonense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma aripuanense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma calori* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma complicatum* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma fazzariense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma fittkai* Sponis, 1987;
- Nilothauma involucrem* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma jaráguense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma longissimum* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma matogrossense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma amazonense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma reissi* Sponis, 1987;
- Nilothauma roquei* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma sooretamense* Mendes; Andersen, 2009;
- Nilothauma zitoi* Mendes; Andersen, 2009;
- Omisus* Townes, 1945;
- Oukuriella* Epler, 1986;
- Oukuriella albistyla* Epler, 1986;
- Oukuriella antonioi* Fusari; Roque; Hamada, 2008;
- Oukuriella baiana* Fusari; Roque; Hamada, 2013;
- Oukuriella digita* Fusari; Roque; Hamada, 2013;
- Oukuriella epleri* Messias; Fittkau, 1997;
- Oukuriella fasciata* Epler, 1986;
- Oukuriella froehlichii* Fusari; Bellodi; Lamas, 2014;
- Oukuriella gracilis* Messias; Oliveira; Fittkau, 2000;
- Oukuriella intermedia* Messias; Fittkau; Oliveira, 2000;
- Oukuriella jatai* Trivinho-Strixino; Messias, 2005;
- Oukuriella matogrossensis* Fusari; Roque; Hamada, 2013;
- Oukuriella minima* Fusari; Roque; Hamada, 2013;
- Oukuriella oliveirai* Messias; Fittkau, 1997;
- Oukuriella pesae* Fusari; Roque; Hamada, 2009;
- Oukuriella pinhoi* Fusari; Roque; Hamada, 2013;
- Oukuriella reissi* Messias, 2000;
- Oukuriella rimamplusa* Fusari; Roque; Hamada, 2013;
- Oukuriella sublettei* Messias; Oliveira, 1999;
- Parachironomus* Lenz, 1921;
- Parachironomus apalai* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus atroari* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus camajura* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus cayapo* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus guarani* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus longistilus* Paggi, 1977;
- Parachironomus lupus* Trivinho-Strixino, Silva; Roque, 2010;
- Parachironomus manaos* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus matapi* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus mirim* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus supparilis* Edwards, 1931;
- Parachironomus ticuna* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus tirio* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus waika* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Parachironomus yanomani* Spies; Fittkau; Reiss, 1994;
- Paracladopelma* Harnisch, 1923;
- Paralauterborniella* Lenz, 1941;
- Paratanytarsus* Thienemann; Bause, 1913;
- Paratanytarsus corbii* Trivinho-Strixino, 2010;
- Paratanytarsus silentii* Trivinho-Strixino, 2010;

- Paratendipes* Kieffer, 1911;
Pelomus Reiss, 1990;
Pelomus notabilis Reiss, 1990;
Pelomus psammophilus Trivinho-Strixino; Strixino, 2008;
Pelomus secundus Reiss, 1990;
Pelomus sophiae Trivinho-Strixino; Silva, 2011;
Pelomus tertius Reiss, 1990;
Phaenopsectra Kieffer, 1921;
Polypedilum Kieffer, 1912 ;
Polypedilum amataura Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum aparai Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum apiaka Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum arara Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum aripuana Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum arua Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum aruakan Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum asurini Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum atroari Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum bakairi Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum baniva Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum branquinho Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum canoeiro Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum carib Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum carijona Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum chiriguano Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum cocama Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum curticaudatum Rempel, 1939;
Polypedilum feridae Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum ge Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum guarani Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum irapirapi Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum jawaperi Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum juruna Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum kaingangi Pinho; Mendes; Andersen, 2013;
Polypedilum kajapo Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum kamajura Bidawid; Kafka, 1996;
Polypedilum karaja Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum karyana Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum kaxuyana Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum kuikuro Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum marauia Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum marcondesi Pinho; Mendes, 2010;
Polypedilum mehinaku Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum mundurucu Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum nahukuwa Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum okueima Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum paulusi Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum purus Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum sabbuhi Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum salavoni Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum salwiti Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum solimoes Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum tirio Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum trombetas Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum tupi Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum txicao Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum wayana Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum xamatari Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum xavante Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum xiborena Bidawid-Kafka, 1996;
Polypedilum yanomami Bidawid; Fittkau, 1996;
Polypedilum yavalapiti Bidawid; Fittkau, 1996;
Pseudochironomus Malloch, 1915;
Rheotanytarsus Thienemann; Bause in Bause, 1913;
Rheotanytarsus pantanalensis Andersen; Kyerematen, 2001;
Riethia Kieffer, 1917 ;
Riethia truncatocaudata Edwards, 1931;
Riethia manauara Neubern; Trivinho-Strixino; Silva, 2011;
Robackia Sæther, 1977;
Saetheria Jackson, 1977;
Skutzia Reiss, 1985;
Skutzia bahiensis Reiss, 1985;
Stempellina Thienemann; Bause in Bause, 1913;
Stempellinella Brundin, 1947;
Stempellina cururui Säwedäl, 1984;
Stempellina tarumai Säwedäl, 1984;
Stempellinella chambiensis Goetghebuer, 1935;
Stempellinella lamellata Ekrem, 2007;
Stenochironomus Kieffer, 1919;
Stenochironomus aculeatus Borkent, 1984 ;

- Stenochironomus albidorsalis* Borkent, 1984;
Stenochironomus atlanticus Pinho; Mendes, 2005;
Stenochironomus bacronis Borkent, 1984;
Stenochironomus fittkai Borkent, 1984;
Stenochironomus impendens Borkent, 1984;
Stenochironomus jubatus Borkent, 1984;
Stenochironomus licinus Borkent, 1984;
Stenochironomus maikae Andersen; Mendes; Pinho, 2008;
Stenochironomus messias Reis; Serpa-Filho; Ferreira-Keppler, 2013;
Stenochironomus nudipupa Borkent, 1984;
Stenochironomus oliveirai Reis; Serpa-Filho; Ferreira-Keppler, 2013;
Stenochironomus palliaculeatus Borkent, 1984;
Stenochironomus pectinatus Borkent, 1984;
Stenochironomus prolatus Borkent, 1984;
Stenochironomus reissi Borkent, 1984;
Stenochironomus roquei Dantas; Hamada; Mendes, 2010;
Stenochironomus sebastiao Andersen; Mendes; Pinho, 2008;
Stenochironomus triannulatus Borkent, 1984;
Stenochironomus vatius Borkent, 1984;
Stenochironomus zonarius Borkent, 1984;
Stictochironomus Kieffer, 1919;
Sublettea Roback, 1975;
Synendotendipes Grodhaus, 1987;
Tanytarsus van der Wulp, 1874;
Tanytarsus alfredoi Sanseverino; Trivinho-Strixino, 2010;
Tanytarsus amazonicus Sanseverino; Fittkau, 2006;
Tanytarsus branquini Fittkau; Reiss, 1973;
Tanytarsus caipira Trivinho-Strixino; Strixino, 2007;
Tanytarsus cuieirensis Fittkau; Reiss, 1973;
Tanytarsus cururui Fittkau; Reiss, 1973;
Tanytarsus digitatus Sanseverino; Fittkau, 2006;
Tanytarsus fastigatus Reiss, 1972;
Tanytarsus fittkai Sanseverino; Trivinho-Strixino, 2010;
Tanytarsus friburgensis Sanseverino; Fittkau, 2006;
Tanytarsus giovannii Sanseverino; Trivinho-Strixino, 2010;
Tanytarsus hastatus Sublette; Sasa, 1994;
Tanytarsus impar Trivinho-Strixino; Strixino, 2004;
Tanytarsus jacaretingensis Sanseverino; Fittkau, 2006;
Tanytarsus lenyae Sanseverino; Trivinho-Strixino, 2010;
Tanytarsus ligulatus Reiss, 1972;
Tanytarsus magnus Trivinho-Strixino; Strixino, 2004;
Tanytarsus marauia Sanseverino; Wiedenbrug; Fittkau 2003;
Tanytarsus monospinosus Ekrem; Reiss, 1999;
Tanytarsus obiriciae Trivinho-Strixino; Sonoda, 2006;
Tanytarsus oligotrichus Rempel, 1939 *nomen dubium*;
Tanytarsus revolta Sanseverino; Wiedenbrug; Fittkau, 2003;
Tanytarsus rhabdomantis Trivinho-Strixino; Strixino, 1991;
Tanytarsus riopreto Fittkau; Reiss, 1973;
Tanytarsus tumultuarius Ekrem; Reiss, 1999 ;
Tanytarsus waika Sanseverino; Wiedenbrug ;Fittkau, 2003;
Tanytarsus xingu Sanseverino;Wiedenbrug; Fittkau, 2003;
Tapajos Trivinho-Strixino; Silva; Oliveira, 2013;
Tribelos Townes, 1945;
Xenochironomus Kieffer, 1921;
Xenochironomus alaidae Fusari; Roque; Hamada, 2013;
Xenochironomus amazonensis Fusari; Roque; Hamada, 2013;
Xenochironomus ceciliae Roque; Trivinho-Strixino, 2005;
Xenochironomus grini Fusari; Roque; Hamada, 2013;
Xenochironomus martini Fusari; Roque; Hamada, 2013;
Xenochironomus mendesi Fusari; Roque; Hamada, 2013;
Xenochironomus xenolabis Kieffer, 1916;
Xestochironomus Sublette; Wirth, 1972;
Xestochironomus dickinsoni Pinho; Souza, 2013;
Xestochironomus virgoferreae Pinho; Souza, 2013;
Zavrelia Kieffer, 1913;
Zavreliella Kieffer, 1920;
Zavreliella acuta Reiss, 1990;
Zavreliella brauni Reiss, 1990;
Zavreliella curta Reiss, 1990;
Zavreliella fittkai Reiss, 1990;
Zavreliella furcata Reiss, 1990;
Zavreliella junki Reiss, 1990;
Zavreliella lata Reiss, 1990;
Zavreliella levis Reiss, 1990;
Zavreliella lobata Reiss, 1990;
Zavreliella longiseta Reiss, 1990;
Zavreliella molesta Reiss, 1990;
Zavreliella verrucosa Reiss, 1990.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - COLETA DO ORGANISMO EM CAMPO, ISOLAMENTO, CULTIVO E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

A captura do organismo ocorreu no campus da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) numa parede localizada na parte externa dos banheiros do NEST (Núcleo de Excelência em Geração Termelétrica e Distribuída), próximo a uma caixa de esgoto.

Com o auxílio de um tubo Falcon de 50 mL, uma fêmea ovada de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) foi capturada e transportada até o laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Recursos Naturais (IRN) da Universidade (Figura 2).



Figura 2 - Fêmea de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) capturada.

No laboratório esta fêmea foi transferida para uma gaiola de nylon, com uma bandeja de polietileno contendo apenas água de cultivo na parte inferior, com intuito de que a mesma realizasse a postura dos ovos.

Sendo assim, quando se detectou a desova aderida à bandeja, esta foi transferida, com auxílio de pipeta de Pasteur adaptada, para um béquer de 1 litro, contendo: 500 mL de água de cultivo e 5 mL da solução de algas clorofíceas. Este béquer foi então coberto com um vidro de relógio e mantido em sala climatizada com variação de temperatura entre 23 a 26°C, sem aeração, com temperatura da água em torno de 22 a 23°C e fotoperíodo de 12h até a eclosão das larvas e posterior abandono da bainha mucilagínosa. Este procedimento serviu para obtenção dos indivíduos jovens. Posteriormente foram montados os cultivos, segundo a metodologia estabelecida por Fonseca e Rocha (2004), com modificações. Este método foi escolhido pelo fato de já ser utilizado no cultivo de *Chironomus xanthus* no laboratório de

Ecotoxicologia Aquática da UNIFEI.

Após a eclosão, cerca de 150 larvas recém-eclodidas foram quantificadas, com auxílio de um estereomicroscópio e de uma pipeta Pasteur adaptada, e transferidas para 3 bandejas plásticas (42 cm de comprimento por 28 cm de largura e 7 cm de altura), contendo: 500g de areia lavada inicialmente em água corrente, finalizada com água destilada e esterilizada em forno mufla a 550°C por 2h, para eliminação da matéria orgânica, nas proporções granulométricas estabelecidas na Tabela 1 e 4 litros de água de cultivo.

Como alimento foram adicionados a cada bandeja 20 ml (0,005 ml.L⁻¹) da solução de algas clorofíceas (10⁵ cels.mL⁻¹) e 80 mL (0,02 ml.L⁻¹) da solução de ração de peixes floculada TetraMin® Tropical Flakes nas proporções de 0,002 mg.mL de sólidos totais (ST) e 0,002 mg.mL de sólidos voláteis (SV). É importante salientar que a solução de algas clorofíceas foi oferecida apenas no primeiro dia de cultivo, por ser o primeiro estágio larval de hábito planctônico. Posteriormente, a cada dois dias, foi adicionado às bandejas apenas 80 mL (0,02 ml.L⁻¹) da solução de ração de peixes até a emergência dos adultos. Estas bandejas foram mantidas sob aeração contínua e branda, com temperatura da água em torno de 23°C (+/-0,5°C), monitoradas por termômetro flutuante para aquário e cobertas por gaiolas de nylon (48 cm de comprimento por 34 cm de largura e 38 cm de altura). Tal sistema tem a finalidade de reter os adultos ao final do desenvolvimento larval. Todo o sistema foi mantido em sala climatizada com temperatura variando de 23 a 26 °C e fotoperíodo de 12 horas com luminosidade em torno de 645 a 670 lux (9.03 a 9.38 fótons) (Figura 3).

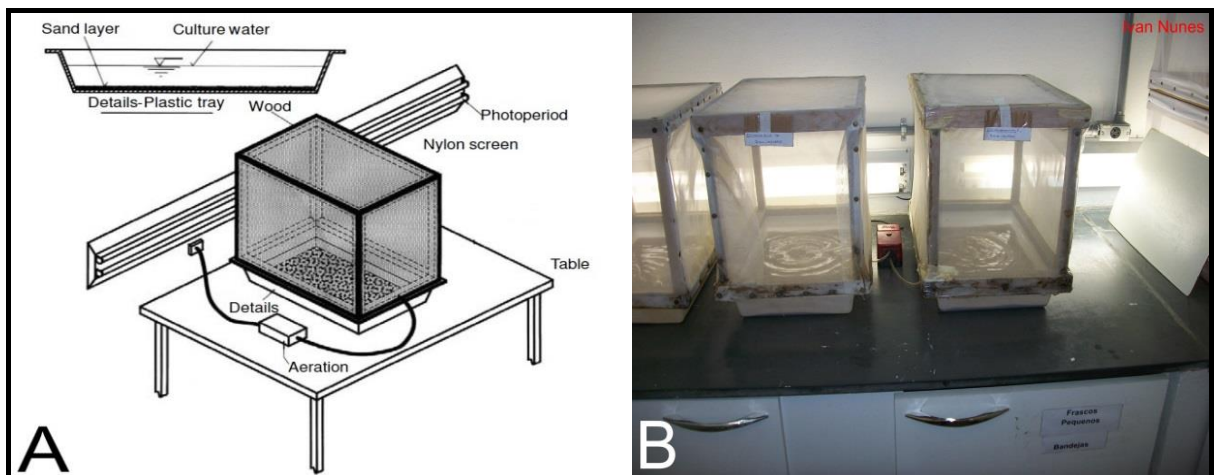


Figura 3 - Esquema do sistema aplicado no cultivo de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014). **Fonte:** Fonseca e Rocha (2004) (A). Sistema de cultivo implantado no laboratório de Ecotoxicologia Aquática da Universidade Federal de Itajubá (B).

Tabela 1 - Frações granulométricas do sedimento utilizado para cultivo da espécie *Chironomus xanthus*, Fonseca e Rocha (2004), com modificações na quantidade utilizada.

Peneira (mm)	Porcentagem (%)	Quantidade em (g)
1,000	1,0	5
0,500	8,0	40
0,250	50	250
0,106	40	200
0,053	0,5	2,5
Silte e Argila	0,5	2,5

Com o auxílio de uma esponja estéril e de um pequeno puçá para aquário, as laterais das bandejas e a superfície da água eram limpas a cada dois dias, sendo retirados restos de alimento, excesso de algas e organismos mortos.

Quando o cultivo atinja 16 ou 17 dias de idade, eram retiradas algumas desovas de mesma idade para montagem de um novo cultivo, seguindo o mesmo procedimento para obtenção dos indivíduos jovens já descrito.

Após 20 dias ou depois da morte de todos os adultos, as culturas eram descartadas e o sistema desmontado. A areia era lavada primeiramente em água corrente para retirada de todo resíduo de matéria orgânica, finalizada com água destilada e esterilizada novamente em forno mufla a 550°C por 2 horas para uma nova reutilização. Já as bandejas eram lavadas com detergente neutro (pH 7,0) e muita água corrente. Todo este procedimento está resumido no anexo I deste capítulo.

4.1.1 - Preparo do Alimento: Solução de Ração de Peixes e de Algas Clorofíceas

A ração floculada de peixes TetraMin® Tropical Flakes é um suplemento alimentar para peixes tropicais composto de arroz integral, etoxiquin, extrato de levedura, farelo de aveia, farelo de soja, farinha de algas marinhas, farinha de camarão, farinha de peixe, fosfato de cálcio, glúten de trigo hidrolisado, lecitina de soja, levedura inativa, óleo de peixe refinado, óleo de soja refinado, proteína de batata, sorbitol, vitamina C, premix vitamínico e corantes (Figura 4).

O preparo desta solução consistiu na pesagem de 5g da ração e transferência desta quantia para o copo do liquidificador juntamente com um litro de água destilada. Essa mistura foi processada por 1 minuto e transferida para frasco de polipropileno e mantida sob-refrigeração. Vale ressaltar que a validade desta solução era de uma semana e que sua homogeneização na hora do trato é imprescindível, já que a solução tende a decantar.



Figura 4 - Ração Floculada de Peixes TetraMin® Tropical Flakes.

As proporções da solução em sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV) foram quantificados conforme NBR 10.664 (1989).

Já a alga utilizada como suplemento alimentar somente para o primeiro estágio larval foi a *Selenastrum capricornutum* (Figura 5 - A), esta alga clorofícea, unicelular, de água doce é mantida e cultivada em laboratório (Figura 5 - B) segundo NBR 12.713 (2009) e NBR 13.373 (2010) e oferecida como principal alimento para *Daphnia spp.* e *Ceriodaphnia spp.* A concentração celular oferecida aos organismos foi de 10^5 cels.mL⁻¹, quantificada com auxílio de hemacitômetro Neubauer.

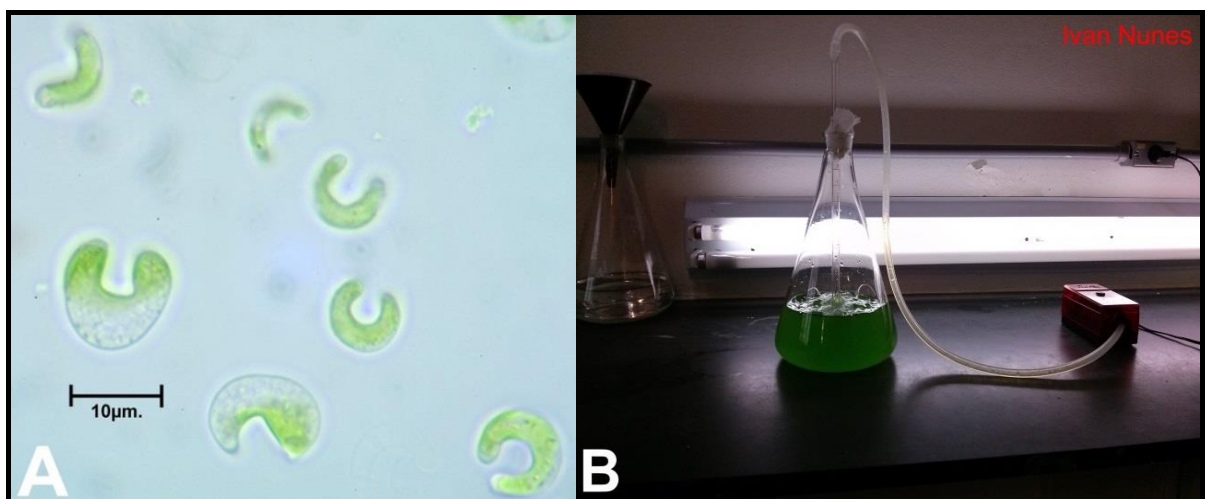


Figura 5 - *Selenastrum capricornutum*. Fonte: <http://algalweb.net/plankton.htm> (A). Cultivo da alga no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI (B).

4.1.2 - Água de Cultivo

A água utilizada no cultivo destes organismos provém de uma fonte natural localizada na comunidade Sol de Deus, sob as coordenadas geográficas: 22 26' 37.77026"S e 45 25'

16.04277"O, no bairro Santa Rosa, em Itajubá-MG (Figura 6). Esta fonte foi escolhida, pelo fato de possuir características físicas e químicas padrões para o cultivo de micro crustáceos (NBR 12.713, 2009 e NBR 13.373, 2010) e para o cultivo de *Chironomus sancticaroli* (Viveiros, 2012). Além disso, esta fonte é considerada livre de contaminantes, por ser mais afastada do meio urbano. Essas variáveis físicas e químicas foram mensuradas seguindo as metodologias descritas no quadro 1.

Quadro 1 – Materiais e métodos utilizados para mensurar as variáveis: pH, condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dureza ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}$) da água de cultivo de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

Variável	Equipamento	Marca	Modelo	Método
pH	Potenciômetro de pH	Digimed®	DM - 20	–
Condutividade	Condutivímetro	Alfa Mare®	mCa 150	–
Oxigênio Dissolvido	Multiparâmetros	InoLab®	Terminal Level 3	–
Dureza	–	–	–	Titulométrico (APHA, 2005).



Figura 6 - Vista espacial do ponto de coleta da água. **Fonte:** Google Earth (A). Comunidade Sol de Deus (B).

4.1.3 - Substrato de Cultivo

Com relação ao substrato de cultivo para *Chironomus* pode – se adotar a areia (ASTM, 2000; USEPA, 2000; FONSECA; ROCHA, 2004;) ou o papel toalha deixado de molho em água por vários dias (ASTM, 2000; USEPA, 2000).

Para este trabalho optou – se por utilizar um substrato proveniente da própria região, isento de contaminantes e com características de sedimento arenoso.

Para tanto, o mesmo foi coletado as margens do rio Lourenço Velho no Bairro do Rio Manso em Itajubá – MG. Sob as coordenadas geográficas: 22 22' 10.70562"S e 45 20'

16.61350"O (Figura 7) e transportado até Laboratório de Solos do Instituto de Recursos Naturais da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) para as quantificações do percentual de matéria orgânica e frações granulométricas.

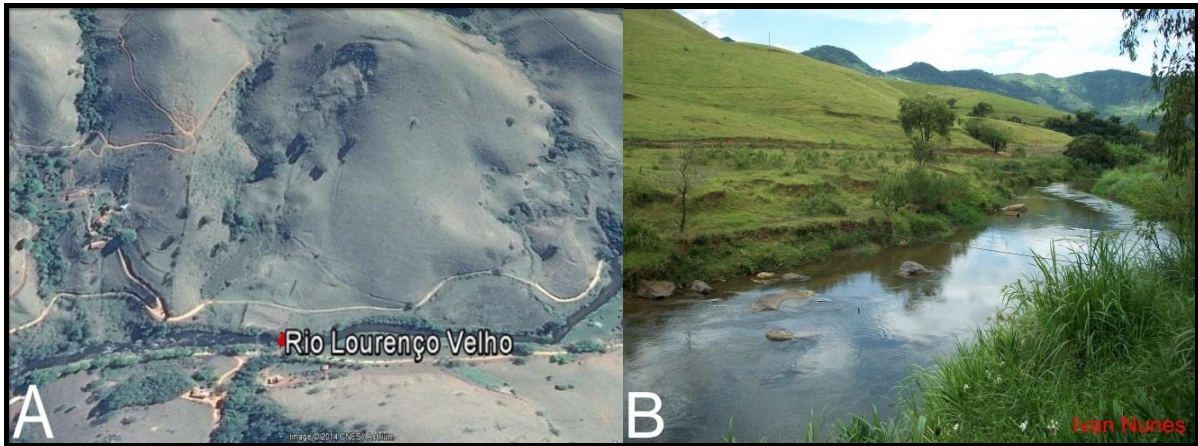


Figura 7 - Vista espacial do ponto de coleta do sedimento. **Fonte:** Google Earth (A). Local da coleta no Rio Lourenço Velho (B).

4.1.3.1 - Determinação do Percentual de Matéria Orgânica e Frações granulométricas

Todo o sedimento coletado foi previamente seco em estufa a 100°C por 24 horas para eliminação da umidade.

Para a determinação do percentual de matéria orgânica por digestão, foi feita uma junção das metodologias de Fonseca (1997) e do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA, 2013). As principais etapas deste processo podem ser visualizadas na Figura 8.

A matéria orgânica foi determinada pela diferença entre o peso inicial (P0 – frasco vazio) e final (P1 – após digestão) multiplicado por 100% (Equação 1).

$$\%MO = (P_1 - P_0) * 100$$

Equação 1 – Estimativa da porcentagem de Matéria Orgânica.

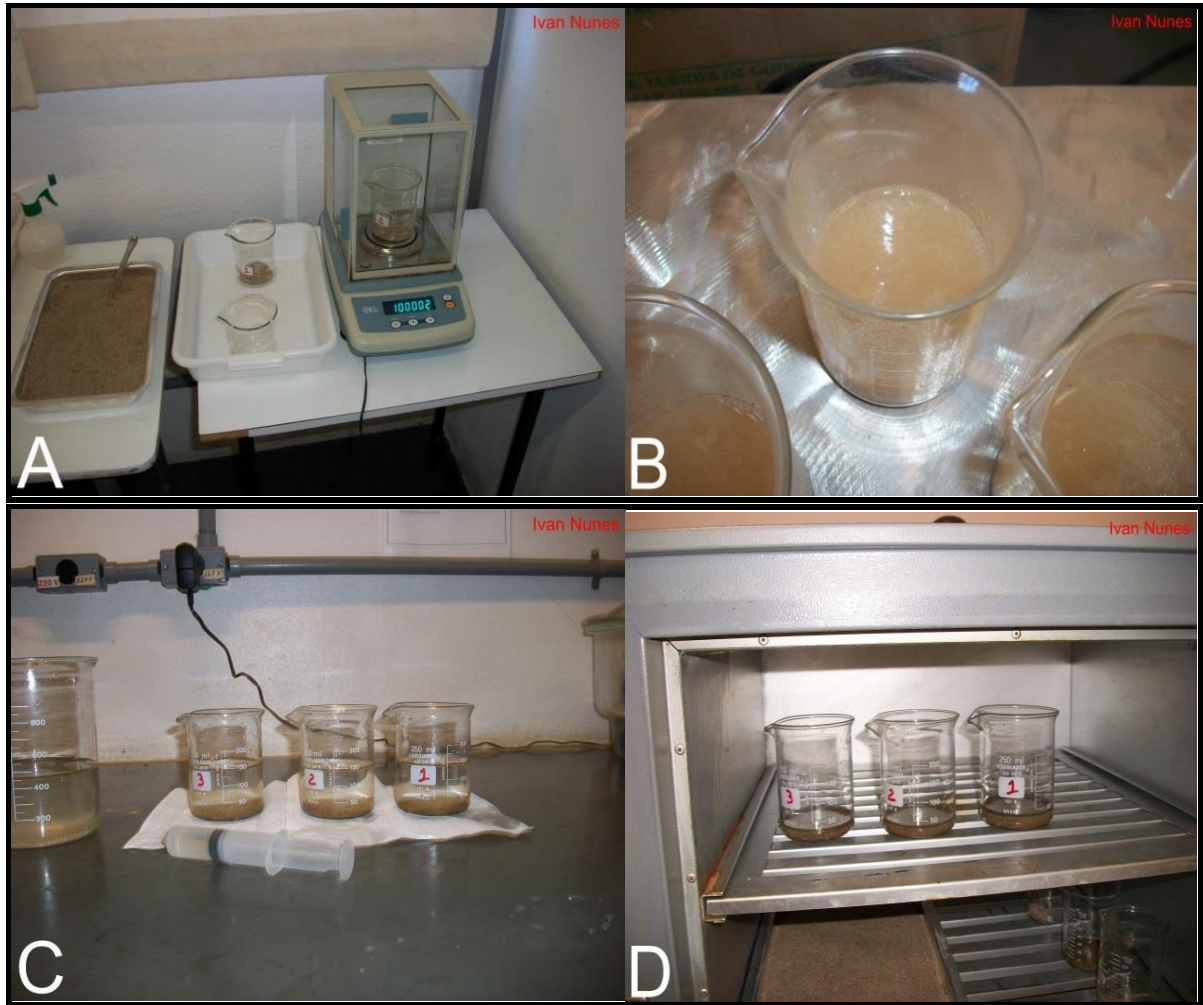


Figura 8 – Quantificação das amostras de sedimento em triplicatas (A). Efervescência das amostras provocada pela adição de Peróxido de Hidrogênio (B). Sifonação do sobrenadante (C). Secagem das amostras em estufa à 105°C por 24 horas (D).

As frações granulométricas foram determinadas conforme o método da pipeta descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Solos) (2012). As principais etapas deste procedimento podem ser visualizadas na Figura 9.

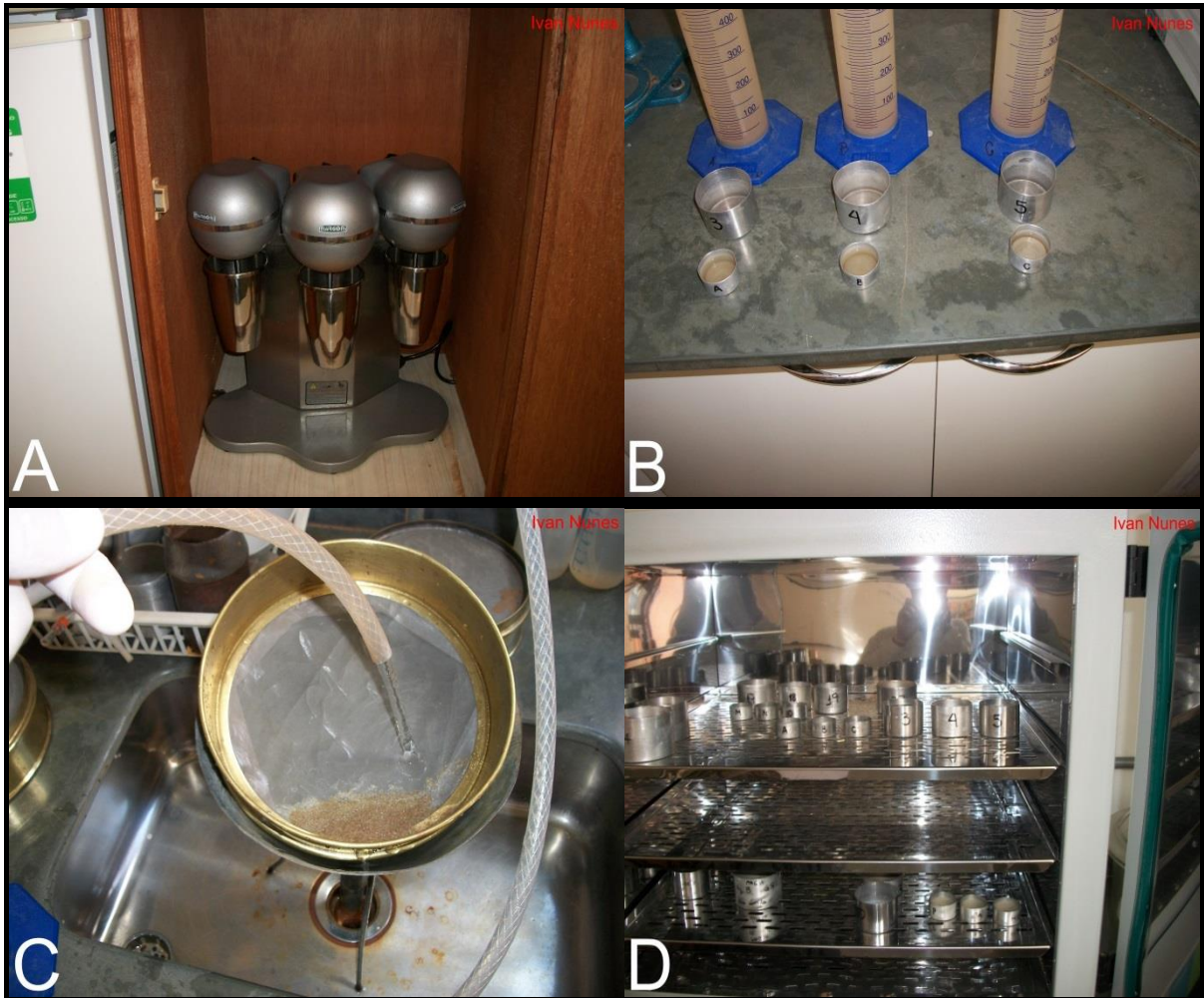


Figura 9 - Homogenização da amostras (A). Retiradas das aliquotas de Argila (B). Lavagem das amostras de sedimento para retirada de Silte e Argila (C). Secagem do sedimento em estufa (D).

4.1.3.2 - Peneiramento

Após as determinações do teor de matéria orgânica e das frações granulométricas, todo sedimento coletado no campo, previamente seco, foi peneirado com auxílio de um peneirador mecânico nas granulometrias 1,000 mm, 0,500 mm, 0,250 mm, 0,106 mm e 0,053 mm, Silte e argila. (Figura 10). O conteúdo proveniente deste peneiramento foi transferido para potes plásticos, separados pela fração granulométrica, para que posteriormente fosse montado o substrato o de cultivo conforme mencionado na tabela 1 do item 4.1.



Figura 10 - Peneirador utilizado para separar as frações granulométricas pré – estabelecidas por Fonseca e Rocha (2004).

4.2 - PARÂMETROS DO CICLO DE VIDA DE *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) E DURAÇÃO DOS ESTÁGIOS LARVAIS EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

Com intuito de estabelecer a duração do ciclo de vida da espécie previamente isolada e cultivada em laboratório, diariamente, logo após a eclosão, foram retirados 10 larvas de cada bandeja de cultivo. Estes organismos foram transferidos para frascos âmbar de 15 mL devidamente identificados (Espécie, Data) e fixados em solução de álcool 70 % e Glicerol (3:1). Este processo foi realizado até a fase de pupa.

Posteriormente 10 destas larvas/dia foram utilizadas para confecção de lâminas permanentes imersas em Euparal (EPLER, 2001) com a finalidade de realizar as medições biométricas.

Tal metodologia consiste basicamente da inserção das larvas em solução de hidróxido de potássio (KOH) á 10% em temperatura ambiente por um período de 12h com intuito de digerir o tecido muscular interior e deixar as porções esclerotizadas do exoesqueleto das larvas, incluindo o corpo.

Em seguida foi realizado o processo de desidratação (água destilada/5min, neutralização do KOH através da inserção em ácido acético/5min e por fim propanol (95%)/5min). É importante ressaltar que devido ao tamanho de algumas larvas e por não

serem facilmente visíveis, foi utilizado esteromicroscópio com iluminação de baixo e/ou luz diascópia.

Na etapa seguinte algumas gotas de Euparal foram colocadas sobre uma lâmina e com auxílio de pinça fina, as larvas foram transferidas e organizadas, e uma lamínula foi colocada sobre a lâmina e pressionada bem levemente. Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa de secagem por 24 horas à 55°C.

As larvas restantes nas bandejas de cultivo foram suficientes para emergência dos indivíduos adultos (machos e fêmeas), permitindo assim o acasalamento e produção de novas desovas, as quais foram utilizadas em novos cultivos (Figura 11).

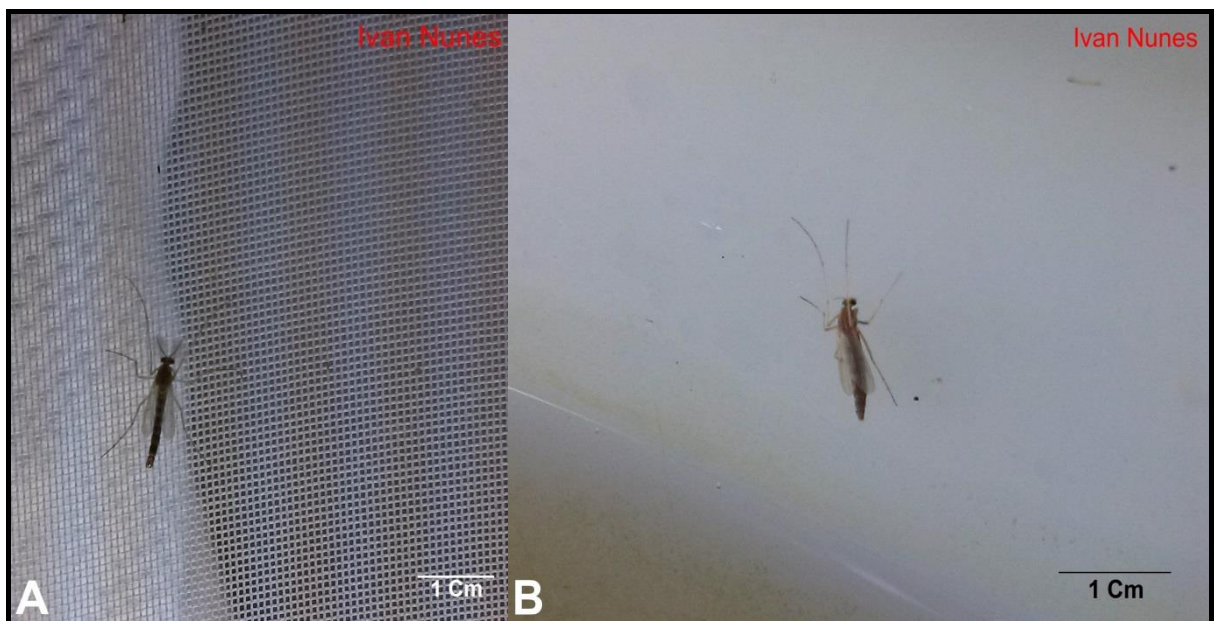


Figura 11 - Macho de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO,2014) (A). Fêmea de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO,2014) (B).

4.2.1 - Determinação dos dados biométricos larvais

Para a caracterização dos estágios larvais, foram medidos o comprimento ventral da cápsula cefálica (μm) (ápice do dente mediano até a região pós-occipital) (Figura 12 - A) a largura (μm) (Figura 12 - B) e o comprimento total da Cápsula cefálica (μm) (Figura 12 - C) das larvas contidas nas lâminas permanentes (n=36).

A mensuração desses dados biométricos foi realizada sob microscópio óptico com auxílio de ocular micrométrica no aumento de 20 x.

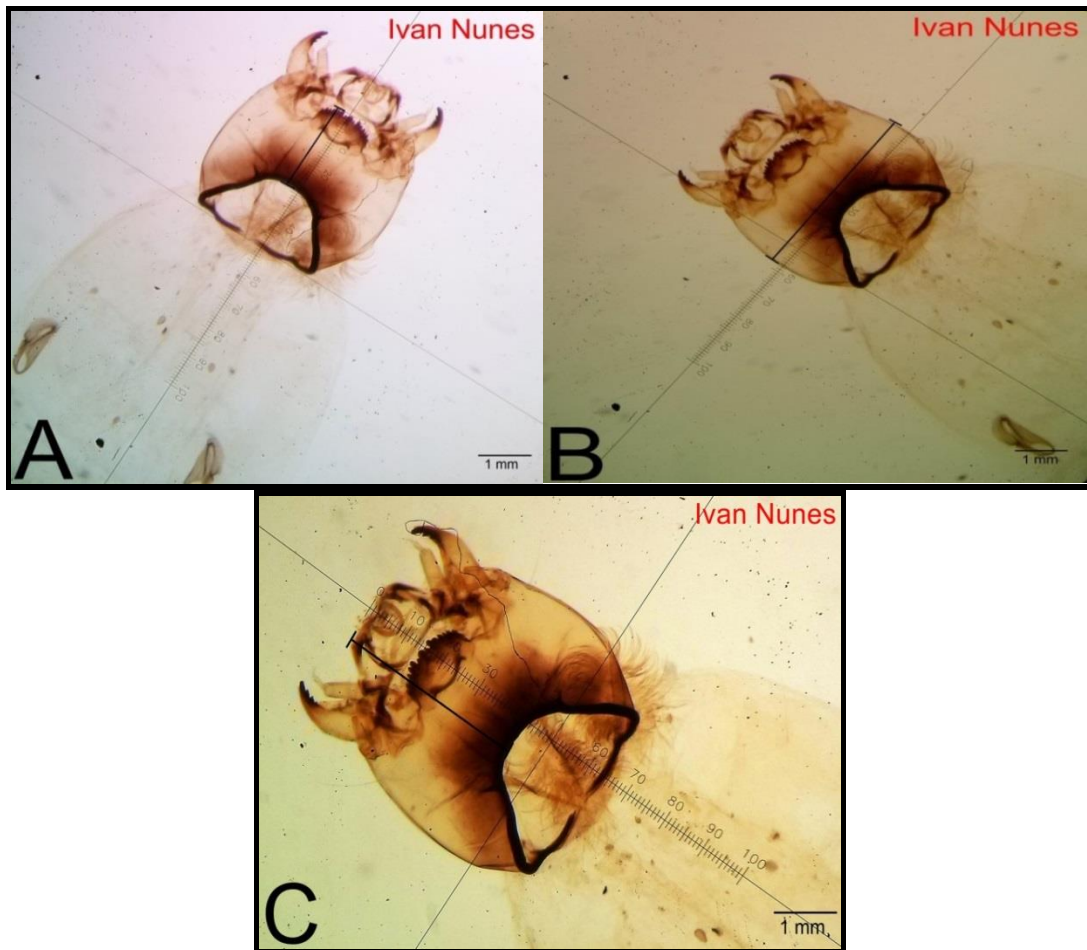


Figura 12 - Comprimento ventral da Cápsula cefálica (A). Largura da Cápsula cefálica (B). Comprimento da Cápsula cefálica (C).

Para as medidas do comprimento do corpo (μm) (primeiro segmento torácico e a região do prócerco, localizada no final do último segmento abdominal) foi utilizado um paquímetro (Figura 13).

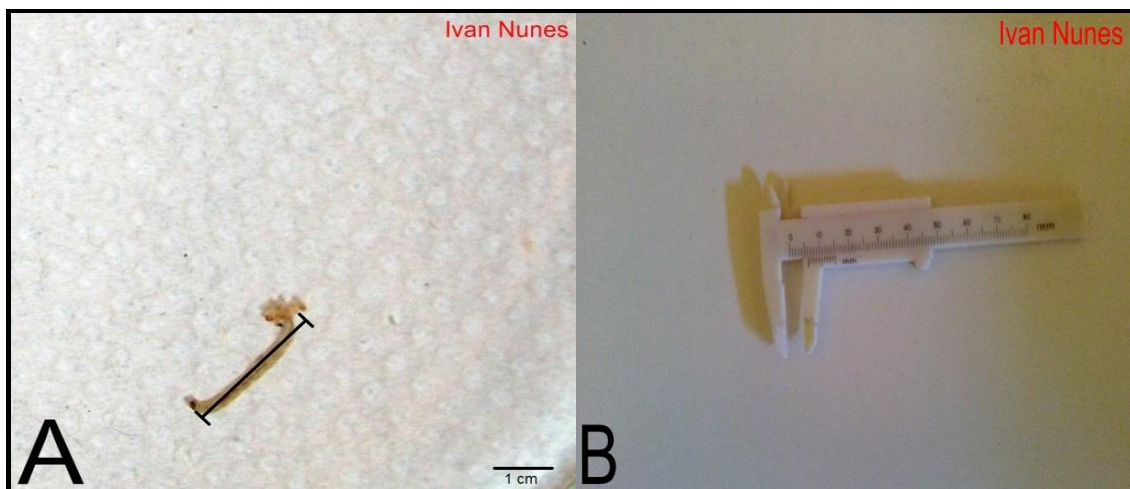


Figura 13 - Comprimento do corpo (A). Paquímetro utilizado na medição (B).

A regra de Dyar (1890) foi aplicada para determinar a razão de crescimento (r). Segundo esta regra, r_1 é a média de crescimento do segundo estágio dividida pela média de crescimento do primeiro; r_2 é a média de crescimento do terceiro estágio dividida pela média de crescimento do segundo e r_3 é a média de crescimento do quarto estágio dividida pela média de crescimento do terceiro estágio. Essa regra tem sido utilizada em artrópodes em geral e em diversos estudos sobre o ciclo de vida de Chironomidae para se estabelecer a duração dos estágios larvais (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006).

4.2.2 - Determinação da biomassa – Fase Larval

Para a determinação da biomassa diária (μg) dos diferentes estágios larvais, foram retiradas 15 larvas/dia provenientes das três bandejas de cultivo até a fase de pupa. (5 exemplares de cada bandeja/dia). As larvas foram lavadas com água destilada, com auxílio de uma peneira de $60\mu\text{m}$ e inseridas em mini cadinhos de 10 mL previamente esterilizados a 600°C em forno mufla por 1 hora, esfriado em dessecador com sílica e inicialmente pesados (P_0) em balança analítica (0,001g) (Figura 14).

Em seguida, os indivíduos foram desidratados em estufa a 60°C por 24h, para obtenção do peso seco. Logo após este processo, os mini cadinhos foram esfriados e pesados novamente (P_1). A diferença ($P_1 - P_0$) foi dividida pelo número de larvas inseridas no mini cadinhos (15 exemplares). O resultado serviu para mensurar o ganho médio diário de massa de cada larva.



Figura 14 - Determinação da biomassa.

4.2.3 - Duração e Tamanho das Pupas e dos Indivíduos Adultos

O tempo de duração das pupas foi mensurado assim que as mesmas surgiram nas bandejas de cultivo. 20 exemplares foram coletados e colocados individualmente em potes plásticos de 300 mL com tampa e 50 mL de água de cultivo pré aerada (Figura 15 – A). Este sistema foi mantido sob fotoperíodo de 12 horas e observado o momento da emergência dos indivíduos adultos.

Cerca de 25 pupas e 52 indivíduos adultos (machos (n=26) e fêmeas (n=26)) provenientes das bandejas de cultivo foram coletados e fixados na solução de álcool 70 % e Glicerol (3:1), para posterior mensuração, com auxílio de um paquímetro, do tamanho médio das pupas (μm) (Figura 15 - B) e dos adultos (μm) (machos e fêmeas) (Figura 15 - C).

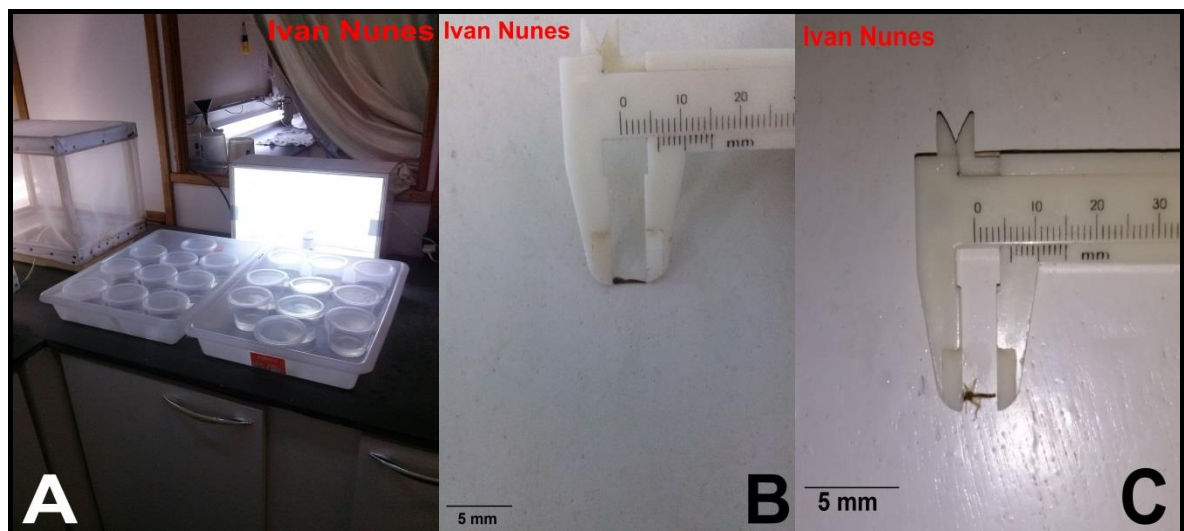


Figura 15 - Isolamento das pupas (A). Comprimento da Pupa (B). Comprimento do indivíduo adulto (C).

4.3 - DURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA MASSA OVÍGERA, TAMANHO DA MASSA OVÍGERA, DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE FECUNDIDADE, FERTILIDADE E PORCENTAGEM DE ECLOSÃO

A determinação do tempo de desenvolvimento embrionário teve início logo após a oviposição (Figura 16), quando as massas ovígeras (n=20) foram coletadas das bandejas de cultivo e inseridas em placas de Petri contendo água de cultivo. Estas desovas foram então fotografadas sob esteromicroscópio com auxílio de uma câmera digital. Posteriormente essas desovas foram colocadas em uma incubadora para DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à 23,5°C e novamente fotografadas decorridas 24h e 48h. A figura 17 ilustra este procedimento.



Figura 16 - Massa ovígera aderida a bandeja.

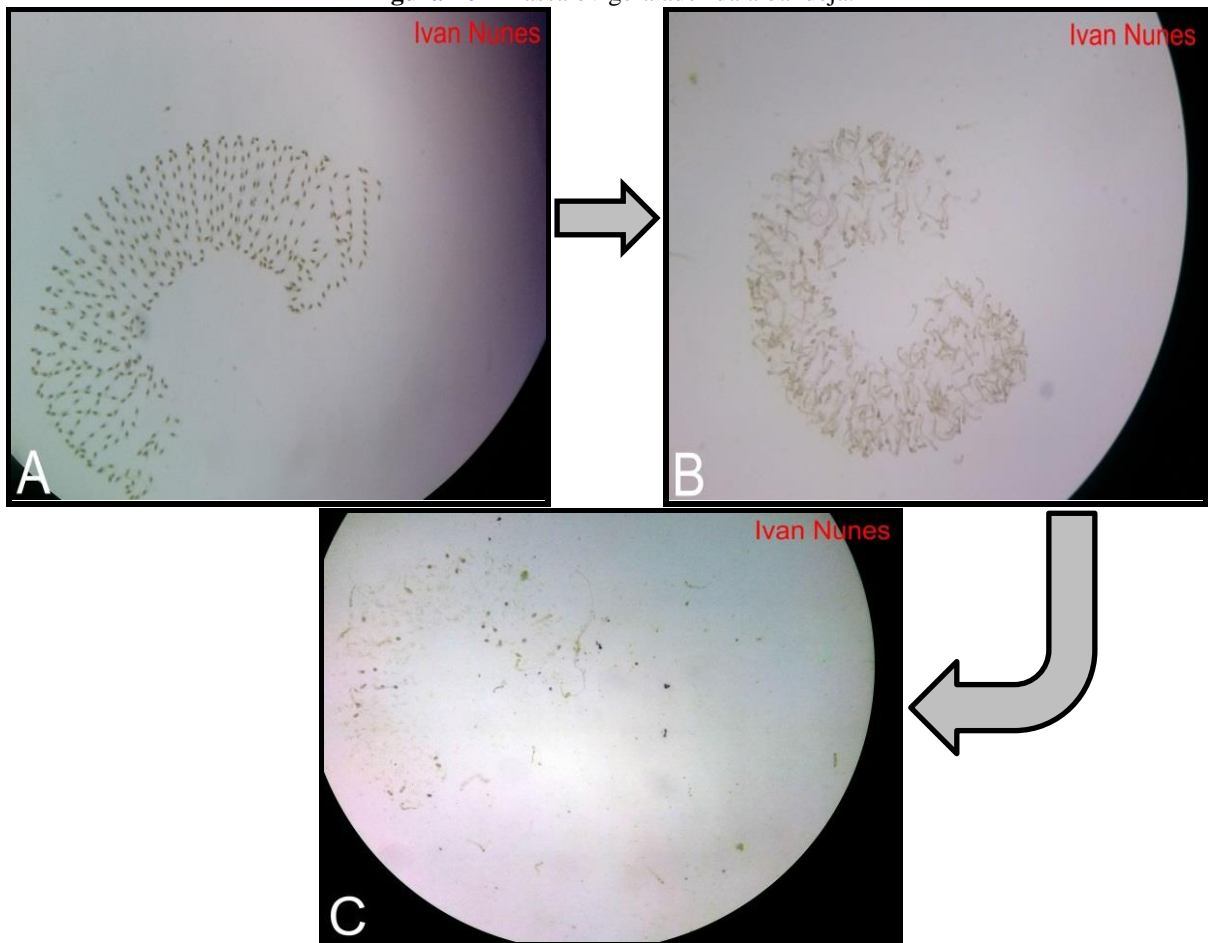


Figura 17 - Desova após postura (A). Após 24 h (B). Após 48 h (C).

4.3.1 - Tamanho médio dos ovos

Algumas desovas ($n=5$) foram retiradas das bandejas e montadas em lâminas permanentes imersas em Euparal (EPLER, 2001), para posterior mensuração do tamanho médio (μm) dos ovos ($n=10$). Para isto utilizou-se um microscópio óptico com auxílio de ocular micrométrica no aumento de 20x como mostra figura 18.



Figura 18 - Tamanho do ovo.

4.3.2 - Tamanho da massa ovígera, Determinação da Fecundidade, Fertilidade e Taxa de Eclosão

Para tais determinações, foram montadas cinco bandejas de cultivo, monitoradas regularmente até a emergência dos adultos. Assim que observou - se os primeiros indivíduos adultos, iniciou-se a observação duas vezes ao dia (7 horas da manhã e 19 horas da noite) com intuito de detectar as primeiras massas ovígeras (primeira desova) proveniente da nuvem de mosquitos formada em cada sistema. Foram retiradas ao todo 22 desovas, provenientes das cinco bandejas de cultivo. Estas desovas foram então inseridas sob lâminas de vidro e cuidadosamente esticadas para que, com auxílio de um paquímetro fosse medido o tamanho (μm) das mesmas.

Para se determinar a fecundidade, fertilidade e a porcentagem de eclosão utilizou-se a metodologia proposta por Viveiros (2012) com modificações. Tais análises foram realizadas com auxílio de imagens fotográficas.

Com o auxílio de uma lamínula, a desova, já inserida em uma lâmina, foi manipulada para reduzir a sobreposição das fileiras de ovos e levadas ao microscópio para obtenção da imagem fotográfica digital no aumento óptico de 4x, sem aumento digital da câmera. As imagens obtidas foram então visualizadas no software Microsoft Paint® 2009 para a contagem manual do número de ovos, no qual corresponde a estimativa da fecundidade.

Em seguida a desova foi colocada em uma placa de Petri, contendo 10 mL de água de cultivo e 3 gotas da solução de algas clorofíceas e transferida para uma incubadora de DBO à 23,5°C por 48h. Este período foi adequado para a eclosão dos ovos e liberação das larvas. Após este período foi realizado a contagem manual das larvulas sobre luz intensa com auxílio de uma pipeta Pasteur adaptada. O número de larvas obtido representou a fertilidade

e/ou o número de ovos férteis. Este mesmo procedimento (Figura 20) foi realizado nas 22 desovas obtidas.

Os dados de fecundidade (número de ovos produzidos) e fertilidade (número de larvas eclodidas) foram utilizados para o cálculo da porcentagem de eclosão no período de 48h. No anexo II estão os dados biométricos de tamanho, fertilidade, fecundidade e a porcentagem de eclosão de cada desova.

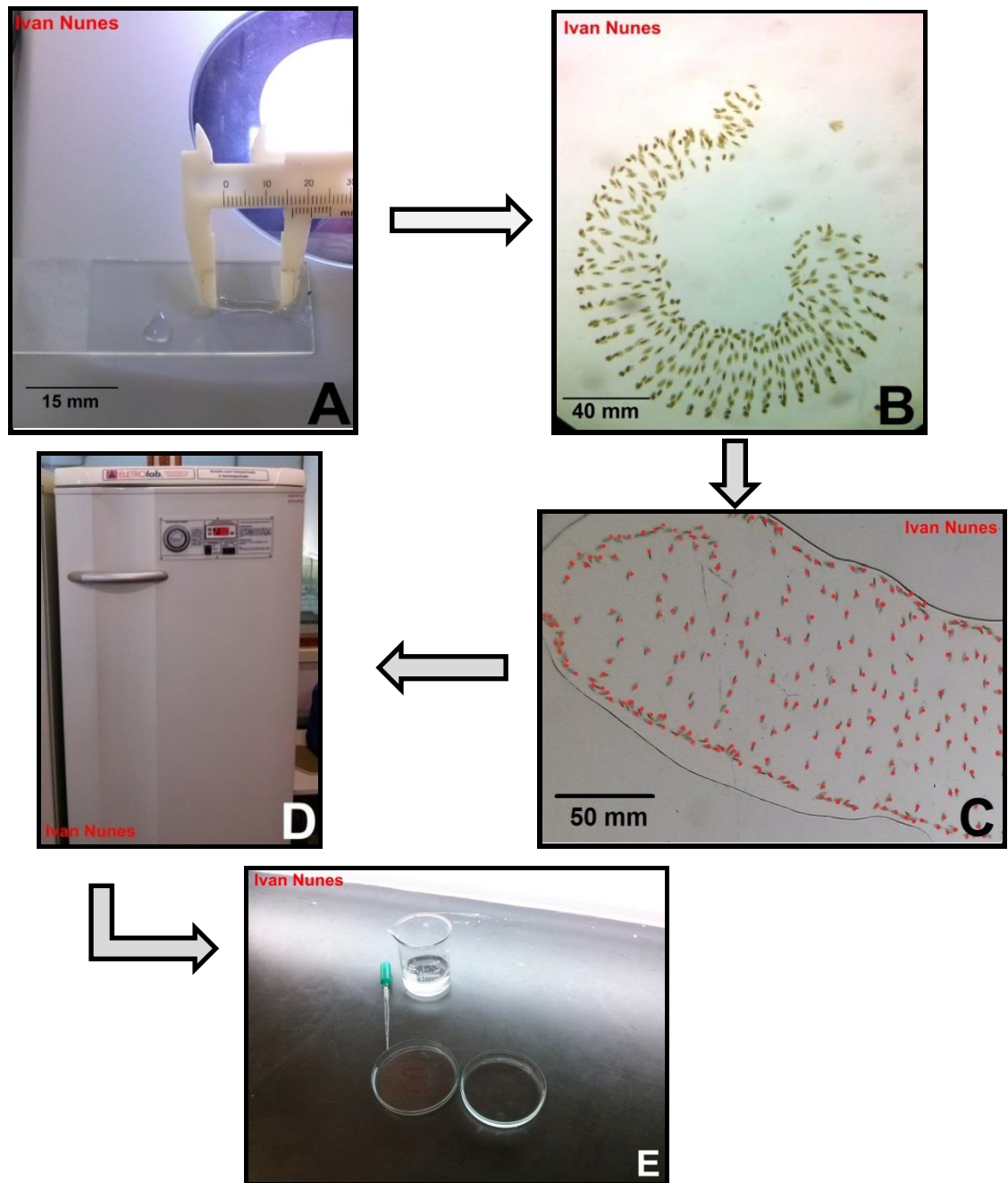


Figura 19 – Comprimento da desova (A). Fotografia da desova (B). Contagem manual dos ovos em Microsoft Paint® versão 2009 (ovos contados marcados em vermelho) (C). Incubadora de DBO utilizada na para manter as desovas por 48 horas (D). Contagem das larvas em luz intensa (E).

4.4 - CONFIRMAÇÃO TAXONÔMICA

Exemplares de larvas, pupas, exúvias e indivíduos adultos foram coletados após fortalecimento das condições de cultivo em laboratório e fixados em álcool 70%. Posteriormente estes organismos foram encaminhados aos taxonomistas de insetos aquáticos, Prof. Dr. Humberto Fonseca Mendes da Universidade Federal de Alfenas e Prof. Dr. Luiz Carlos de Pinho da Universidade Federal de Santa Catarina para identificação e confirmação da espécie isolada.

4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico para confirmação de cada estágio larval e confecção das curvas de crescimento a partir dos dados dos valores médios diários do comprimento ventral da cápsula cefálica e do comprimento do corpo de cada estágio em relação ao tempo (dias) foi realizado aplicando o teste One Way ANOVA, com Pós Teste de Tukey através do software BioEstat® 5.0 (2012) e uma regressão linear realizada com auxílio do software Microsoft Excel® (2010).

Para os resultados da biomassa foi aplicada uma regressão exponencial realizada com auxílio do software Microsoft Excel® (2010).

O programa computacional BioEstat® 5.0 (2012) também foi utilizado para os cálculos das variáveis: média, desvio padrão e coeficiente de variação.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - COLETA DO ORGANISMO EM CAMPO, ISOLAMENTO, CULTIVO E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

A metodologia aplicada na captura do organismo, mesmo que inadequada e/ou inapropriada, já que para este tipo de coleta são utilizadas redes entomológicas (Organismos Adultos), surber (Larvas), armadilhas ou substratos artificiais (Adultos e Larvas), dentre outras, garantiu a captura do organismo pretendido e seu isolamento em laboratório.

Segundo Corbi e Trivinho-Strixino (2006) algumas espécies de *Chironomus* têm exigências fisiológicas bem definidas e, portanto, a sua reprodução em laboratório é mais difícil. Entre essas exigências se destacam a presença de tronco como substrato, altos teores de oxigênio dissolvido, circulação da água constante e exigências alimentares pouco conhecidas.

O sistema de cultivo, método desenvolvido por Fonseca e Rocha (2004) empregado no cultivo de *Chironomus xanthus* e adotada no presente trabalho também se mostrou eficaz, uma vez que, garantiu a sobrevivência das larvas, emergência dos adultos, cópula e posterior produção de novas desovas.

O tipo e a quantidade de alimento (20 mL da solução de algas clorofíceas no primeiro dia de cultivo e 80 mL solução de ração de peixes floculada TetraMin® Tropical Flakes a cada dois dias) fornecidos a espécie de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) também se mostrou eficaz, uma vez que garantiu a nutrição e bom desenvolvimento metabólico das larvas. A escolha deste alimento se deve ao fato de ser utilizado em sistemas de cultivos de outros organismos como o *C. tentans* USEPA (2000).

A escolha do alimento pelas larvas de Chironomidae pode ser baseada em vários fatores, tais como: o tamanho das partículas, o grau de digestibilidade e o valor nutricional (ANJOS; TAKEDA, 2009).

Os Chironomidae têm diferentes hábitos alimentares tais como: algas, microrganismos, restos de madeira e outros invertebrados. Sendo assim, a introdução de outro complemento alimentar é necessário. A alga verde é uma importante fonte de alimento na dieta de Chironomidae, além disso, microrganismos como: bactérias, fungos e protozoários podem ser utilizados como alimentos por estes organismos ou podem transformar resíduos em formas mais nutricionais e comestíveis (FONSECA; ROCHA, 2004).

A intensidade luminosa aplicada no presente trabalho também está de acordo com o

padrão estabelecido pela USEPA (2000), ASTM (2000) que recomenda o valor de aproximadamente 100 a 1000 lux. O tamanho da Gaiola também foi satisfatório.

De acordo com Strixino (1980) citado por Fonseca e Rocha (2004) para o sucesso do cultivo alguns fatores devem ser levados em consideração:

- a) Quantidades adequadas de alimentos;
- b) Oxigenação da água suficiente, de modo a evitar intensa fermentação;
- c) Densidade de larvas adequada ao dimensionamento do recipiente;
- d) Gaiola dimensionada adequadamente, de modo a permitir que o enxame de adultos possa se acasalar e realizar a ovoposição.

Com relação aos parâmetros de qualidade de água utilizada no cultivo de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) os resultados obtidos foram: pH de 7,13 ($\sigma = 0,11$), dureza de 32,5 mg CaCO₃.L ($\sigma = 3,54$), condutividade 90 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ ($\sigma = 10$) e oxigênio dissolvido 6,01 mg.L⁻¹ ($\sigma = 0,09$). Tais valores obtidos em triplicata estão em conformidade e/ou próximos aos padrões estabelecidos pela NBR 12.713 (2009) e NBR 13.373 (2010), as quais são normas indicadas para o cultivo de cladoceros utilizados em ensaios ecotoxicológicos, em que o valor de pH deve estar entre 7,0 a 7,6, dureza 40 a 48 mg CaCO₃.L e por Viveiros (2012) para o cultivo de *Chironomus sancticaroli*, onde o oxigênio dissolvido deve ser maior (>) que 5,0 mg.L⁻¹ e a condutividade entre 72 a 212 $\mu\text{S.cm}^{-1}$.

A estimativa destes parâmetros faz-se necessária antes do início do cultivo uma vez que o pH é um fator limitante à colonização dos ecossistemas aquáticos pelos diferentes organismos devido à modificação na osmorregulação (THIENEMANN, 1918 apud. ESTEVES, 2011).

Além disso, variações no pH podem afetar a afinidade da hemoglobina, presente no corpo de em alguns organismos como: *Moina* e *Chironomus*, com o oxigênio por meio do efeito Bohr em que o aumento da acidez estimula a liberação do oxigênio (STOCKMANN, 2010). Segundo este mesmo autor a hemoglobina presente na hemolinfa é responsável por carregar o oxigênio e transportar o dióxido de carbono e os íons de hidrogênio, além de ser uma proteína alostérica sensíveis às modificações do metabolismo.

Já o valor de dureza da água, está relacionado com a manutenção do exoesqueleto de alguns organismos aquáticos como: *Moina* e os *Chironomus*, que é formado por quitina e outras proteínas (ROTTMANN et al., 2003 apud STOCKMANN, 2010).

A condutividade elétrica que é a capacidade da água em conduzir a corrente elétrica devido à concentração dos íons H⁺ e OH⁻ presentes, será maior em meios de maior concentração iônica (ESTEVES, 2011). A condutividade pode afetar o processo de

osmorregulação, atuando diretamente nos processos de permeabilidade da membrana celular, interferindo, portanto, no transporte iônico intra e extracelular. Porém o gênero *Chironomus* consegue sobreviver em locais com alta condutividade elétrica. Silva e outros (2011) evidenciaram em seu trabalho a maior prevalência do gênero *Chironomus* em locais com alta condutividade, influenciada pelo excesso de matéria orgânica ionizável e dissolvida na água.

Um dos gases mais importantes na dinâmica e na caracterização de ecossistemas aquáticos é o oxigênio (GUIMARÃES et al., 2004). De acordo com Trivinho–Strixino (2011) o oxigênio dissolvido é o principal fator que garante a cor da hemoglobina larval, além de determinar a distribuição dos Chironomidae nos lagos e garantir a existência das larvas.

A temperatura da água em torno de 23°C (+/-0,5°C) também se mostrou apropriada, pois garantiu o bom desenvolvimento das larvas. Segundo Trivinho-Strixino (2011) o crescimento destes organismos é dependente da temperatura.

O sedimento coletado e utilizado como substrato no presente trabalho foi submetido apenas às análises granulométricas e percentual de matéria orgânica, uma vez que o local escolhido foi considerado isento de contaminação, por estar em uma área distante do meio urbano e, portanto, não foi necessário a análise de contaminantes (metais e organoclorados), porém recomenda-se que esta análise seja realizada em amostras de sedimentos de origem desconhecida.

Os resultados das análises que comprovam que o sedimento coletado possui mais areia, quando comparado ao silte e a argila, com porcentagem muito baixa de matéria orgânica, estão demonstrado na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Resultados das frações granulométricas obtidas das amostras de sedimento coletado no rio Lourenço Velho, Itajubá - MG.

Frações Granulométricas	Porcentagem (%)
Matéria Orgânica	0,0027
Areia	79,3
Argila	1,50
Silte	19,2

Sabe-se que o sedimento é o compartimento que reflete todos os processos que ocorrem nos sistemas aquáticos e sua composição deve indicar o estado trófico do ambiente.

De acordo com Naumann (1930) citado por Esteves (2011) o sedimento encontrado em lagos oligotróficos, existentes em regiões temperadas, é caracterizado pelo baixo teor de matéria orgânica e baixa concentração de nutrientes. Já nos lagos mesotróficos e nos lagos eutróficos, o teor de matéria orgânica e a concentração de nutrientes aumenta consideravelmente. Desta maneira pode-se dizer que o sedimento coletado as margens do Rio

Lourenço Velho é um sedimento oligotrófico devido à baixa porcentagem de matéria orgânica, menos de 1%.

Já a coloração das larvas, observada diariamente, mostra que o sedimento utilizado também apresenta um baixo teor de oxigênio dissolvido, já que as larvas apresentavam uma coloração vermelho vivo (Figura 20). Trivinho-Strixino (2011) mencionam que as larvas de *Chironomus* quase sempre estão associadas a sedimentos ricos em detritos orgânicos, mais pobres em oxigênio dissolvido e que a cor vermelho vivo e/ou intenso é observada em organismos que vivem em sedimentos eutróficos.

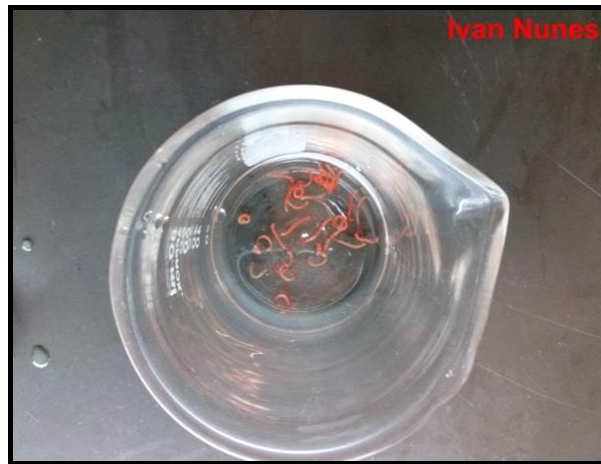


Figura 20 – Larvas de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) em coloração vermelho vivo.

A composição granulométrica do sedimento também pode nos fornecer informações sobre a capacidade de adsorção do mesmo. De acordo com Burton (2002), sedimentos arenosos favorecem a disponibilização de poluentes para a coluna d'água. Já sedimentos onde a granulometria de silte e argila é maior, têm menor capacidade de adsorção e maior capacidade de retenção de poluentes já que apresentam maior área superficial em relação ao volume.

Amaral (2014) também acrescenta que o alto teor de areia indica pouca afinidade de minerais pelo sedimento e que esta condição associada a altos teores de matéria inorgânica e a acidez do sedimento, favorecem a liberação de minerais para a coluna d'água. Portanto, o sedimento coletado pode ser considerado um sedimento com pouca capacidade de adsorção de contaminantes.

Além disso, sabe-se que algumas espécies de Chironomidae, durante seu estágio larval, são construtoras de tubos arenosos (TRIVINHO-STRIXINO, 2011). Portanto, sedimentos arenosos permitem uma maior adequação para a manutenção e desenvolvimento destes organismos, o que foi constatado no presente trabalho.

Segundo Fonseca e Rocha (2004) a montagem do substrato arenoso com maior quantidade de partículas entre 250 e 106 μ m facilita o organismo na construção dos casulos. De acordo com os mesmos autores, algumas espécies de quironomídeos costumam construir casulos no substrato em que vivem formados por partículas do próprio substrato reunidos por uma secreção semelhante a fios de seda, o qual é liberado pelas glândulas salivares.

Partindo da premissa, que este organismo cultivado em laboratório tenha por finalidade a aplicação em ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento contaminado, o uso de um substrato de cultivo constituído de um sedimento arenoso é o mais recomendável. Uma vez que o cultivo em laboratório deve ter como prioridade, deixar o ambiente artificial o mais próximo do natural, onde vivem estes organismos, para que as larvas, que posteriormente serão utilizadas nestes ensaios, não sintam diferença capaz de causar alguma alteração fisiológica ou metabólica no organismo gerando um resultado falso-positivo.

Mesmo não sendo realizadas as análises de contaminantes (metais e organoclorados) necessárias para comprovar que o sedimento está isento de contaminação, podemos dizer que o sedimento utilizado como substrato de cultivo no presente trabalho está livre de contaminações químicas, uma vez que o mesmo não causou nenhum dano metabólico ou fisiológico aparente nas larvas.

5.2 - PARÂMETROS DO CICLO DE VIDA DE *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) E DURAÇÃO DOS ESTÁGIOS LARVAIS EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

A duração de todo período larval para as condições de cultivo estabelecidas em laboratório foi de 12 dias (eclosão até o estágio de pupa). Este resultado foi determinado por meio das medições biométricas das larvas, com exceção da biomassa, conforme tabela 3. No entanto apenas os dados do comprimento ventral da cápsula cefálica e comprimento do corpo foram utilizados para estimar os estágios larvais a serem utilizados nos ensaios ecotoxicológicos (Capítulo – 2). No Anexo III estão os gráficos com os resultados brutos em relação ao tempo de cada dado bionômico.

Tabela 3 – Valores máximo e mínimo (μm) dos comprimentos ventral e total da Cápsula cefálica, largura da Cápsula cefálica, comprimento do corpo das larvas de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) e tempos de duração dos estágios larvais, sob condições de cultivo em laboratório.

Estágio	Compr. Ventral da C. C. (μm) (n = 91)	Compr. da C. C. (μm) (n = 88)	Larg. da C. C. (μm) (n = 87)	Comp. Corpo (μm) (n = 105)	Tempo (Dias)
I	58 – 88 ($\sigma = 11,94$)	84 – 148 ($\sigma = 25,82$)	106 – 192 ($\sigma = 35,00$)	668 – 2650 ($\sigma = 776,81$)	5
II	167 – 196 ($\sigma = 32,19$)	247 – 284 ($\sigma = 52,94$)	326 – 396 ($\sigma = 83,66$)	4000 – 4550 ($\sigma = 572,96$)	2
III	258 – 276 ($\sigma = 23,74$)	394 – 405 ($\sigma = 36,38$)	524 – 553 ($\sigma = 50,66$)	6550 – 9350 ($\sigma = 1412,28$)	3
IV	284 – 285 ($\sigma = 13,27$)	423 – 435 ($\sigma = 21,50$)	557 – 569 ($\sigma = 32,88$)	9950 – 10250 ($\sigma = 1209,61$)	2

Legenda: C.C. = Cápsula Cefálica

O gráfico da curva de crescimento obtida com valores médios diários do comprimento ventral da cápsula cefálica em relação ao tempo teve um alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9056$). O modelo de regressão que melhor se adaptou foi o linear ($y = 26,682x - 1,1818$) onde y = comprimento médio diário ventral da cápsula cefálica (μm) e x = tempo (dias) (Figura 21). Neste gráfico foi possível observar os 4 estágios larvais bem distintos, comprovados estatisticamente pelo teste One Way ANOVA com Pós Teste de Tukey, ($F = 567,28$, $P < 0,0001$). Neste teste foi possível observar que todos os estágios larvais são diferentes entre si com exceção dos estágios III e IV onde a diferença não foi significativa devido ao crescimento ter sido relativamente pequeno.

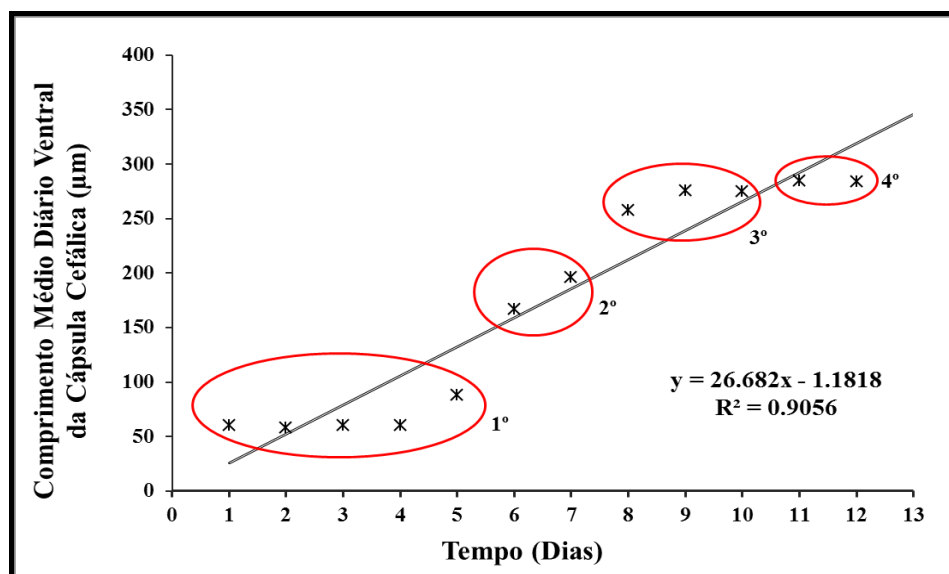


Figura 21 - Curva de crescimento de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) obtida a partir do comprimento médio diário ventral da Cápsula cefálica em relação ao tempo, em condições laboratoriais (23°C , fotoperíodo: 12/12h).

O resultado obtido com os valores médios diários do comprimento do corpo com relação ao tempo (dias) obteve um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9593$. O modelo de regressão que melhor se adaptou a estes dados foi o linear ($y = 1017,1x - 1607,8$) onde y = comprimento médio diário do corpo (μm) e x = tempo (dias) (Figura 22). Nestes dados também foi possível observar os 4 estágios larvais bem distintos. O valor do teste One Way ANOVA com Pós Teste de Tukey ($F= 259,01$, $p < 0,0001$), também apresenta um resultado significativamente diferente para todos os estágios.

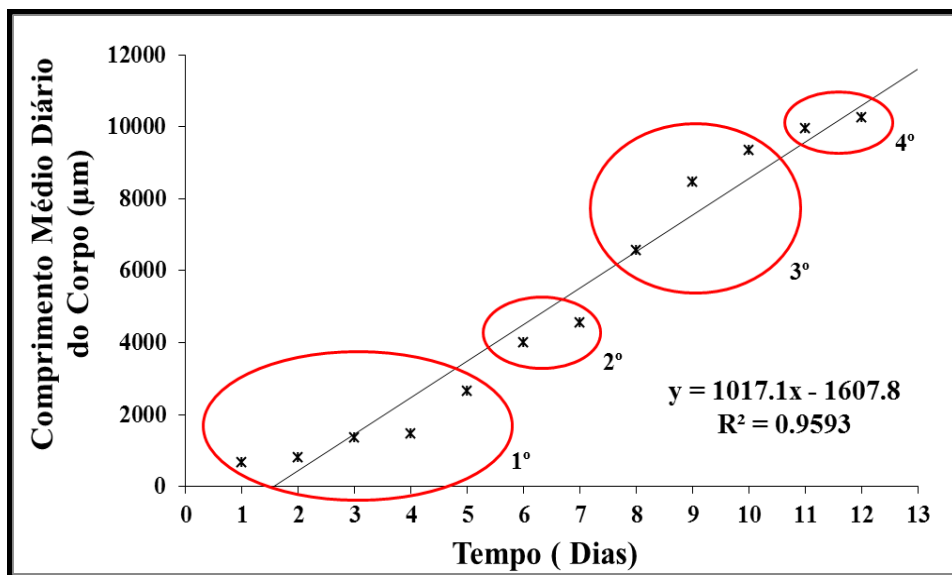


Figura 22 - Curva de crescimento de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) obtida a partir do comprimento médio diário do corpo em relação ao tempo, em condições laboratoriais (23°C, fotoperíodo: 12/12h).

A figura 23 mostra os resultados referentes à curva de crescimento obtida com a correlação entre os valores do comprimento médio diário ventral da cápsula cefálica e os valores do comprimento médio diário do corpo. O modelo de regressão que melhor se ajustou foi o linear ($y = 0,0262x + 41,039$), onde y = comprimento médio diário ventral da cápsula cefálica (μm) e x = comprimento médio diário do corpo. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de: 0,9419.

A curva de crescimento assíntota obtida mostra uma primeira fase de baixo incremento para o estágio I, seguida por um aumento rápido correspondente aos estágios II, III e finalmente, chegando a uma assíntota que correspondeu ao último estágio larval.

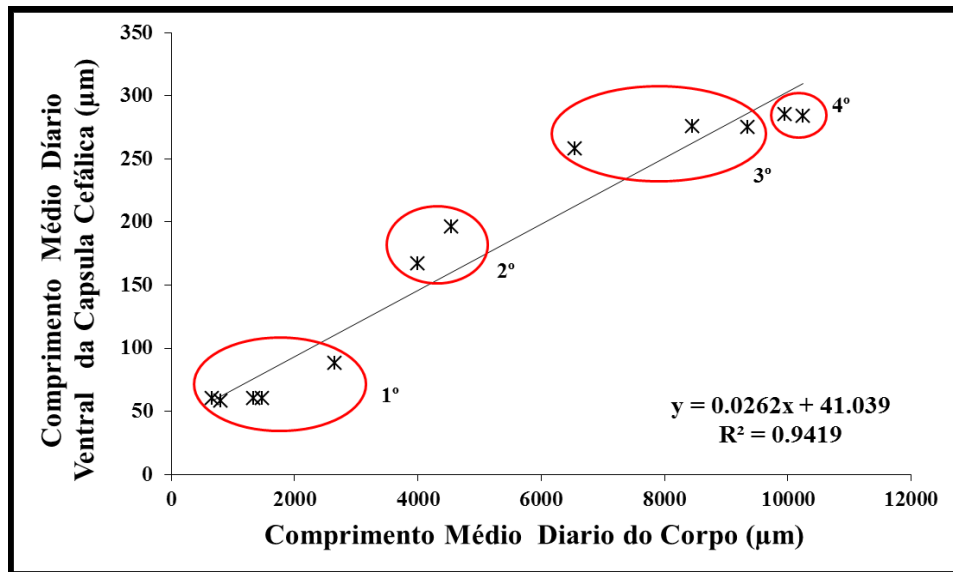


Figura 23 - Relação entre o comprimento médio diário ventral da cápsula cefálica e o comprimento médio diário do corpo de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

Cada espécie tem um tempo diferente de desenvolvimento para cada estágio larval, dependendo das condições laboratoriais, ou mesmo da própria fisiologia dos organismos (CANTEIRO; ABERTONI, 2011).

Alguns autores utilizaram os dados biométricos obtidos em seus trabalhos para estimar a duração dos estágios larvais de algumas espécies neotropicais de: *Chironomus tentans* (ASTM, 2000), *Chironomus xanthus* (FONSECA; ROCHA, 2004), *Goeldichironomus luridus* e *Goeldichironomus maculatus* (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006), *Chironomus calligraphus* (ZILLI et al., 2008), *Goeldichironomus holoprasinus* (ZILLI et al., 2009) e *Chironomus calligraphus* (CANTEIRO; ALBERTONI, 2011). Os resultados obtidos pelos autores com tais espécies estão demonstrados na Tabela 4, juntamente com as respectivas condições laboratoriais de cultivo. O objetivo destes autores, além das informações bionômicas, foi gerar subsídios para bioensaios ecotoxicológicos com as larvas.

Dos seis organismos citados acima, 3 são utilizados em ensaios ecotoxicológicos (Capítulo – 2): *C. tentans*, *C. xanthus* e *C. calligraphus*. O *C. tentans* já possui um protocolo estabelecido pela USEPA, enquanto os outros dois, *C. xanthus* e *C. calligraphus*, apesar de já serem utilizados em trabalhos de avaliação ecotoxicológica com amostras de sedimento contaminado no Brasil e na Argentina ainda não possuem protocolos.

Em estudos desta natureza dois pontos devem ser levados em consideração: a qualidade e quantidade de alimento e os valores de temperatura que influenciam a sobrevivência e a reprodução das espécies em cultivo. Tais resultados permitem a utilização destas espécies em diferentes abordagens, incluindo a ecotoxicológica (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006; TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

Tabela 4 - Valores comparativos do comprimento ventral da Cápsula cefálica (μm), Comprimento da Cápsula cefálica, largura da Cápsula cefálica e Comprimento do corpo, obtido por diferentes autores e espécies de Chironomidae, em cultivo laboratorial.

Organismo	Condições Laboratoriais	Estágio I		Estágio II		Estágio III		Estágio IV		Autores
		Comp. Ventral C.C (μm)	Tempo (Dias)	Comp. Ventral C.C (μm)	Tempo (Dias)	Comp. Ventral C.C (μm)	Tempo (Dias)	Comp. Ventral C.C (μm)	Tempo (Dias)	
<i>G.luridus</i>	Tetramim®	60 - 63	3	90 - 98	2	150 - 165	3	225 - 270	10	CORBI; TRIVINHO- STRIXINO, 2006.
<i>G.maculatus</i>	21 - 26 °C	60 - 64	6	76 - 142	3	180 - 201	5	225 - 300	14	
<i>C. calligraphus</i>	Alcon basic®/ <i>Spirulina</i> e <i>ad libitum</i> seca 25 °C	66,3 ($\sigma=12,2$)	3 \pm 2	102,2 ($\sigma=4,1$)	4 \pm 1	159 ($\sigma=24,6$)	4 \pm 3	249,2 ($\sigma=29,6$)	8 \pm 2	CANTEIRO; ALBERTONI, 2011.
<i>Chironomus aff. xanthus.</i>	Tetramim® 23 °C	58 - 88	5	167 - 196	2	258 - 276	3	284 - 285	2	Presente Trabalho.
		Comp. C.C (μm)	Tempo (Dias)	Comp. C.C (μm)	Tempo (Dias)	Comp. C.C (μm)	Tempo (Dias)	Comp. C.C (μm)	Tempo (Dias)	
<i>C. xanthus</i>	Tetramim® 23°C	88 - 94	4	157 - 159	2	260 - 270	2	430 - 460	5	FONSECA; ROCHA, 2004.
<i>Chironomus aff. xanthus.</i>	Tetramim® 23°C	106 - 192	5	326 - 396	2	524 - 553	3	557 - 569	2	Presente Trabalho.

Legenda: C. C. = Cápsula Cefálica.
Continua pg. 57.

Continuação Tabela 4.

Organismo	Condições Laboratoriais	Estágio I		Estágio II		Estágio III		Estágio IV		Autores
		Largura (µm)	Tempo (Dias)	Largura (µm)	Tempo (Dias)	Largura (µm)	Tempo (Dias)	Largura (µm)	Tempo (Dias)	
<i>C. tentans</i>	Tetramim® 23°C	90 - 130	1 a 4,4	180 - 230	4,4 a 8,5	330 - 450	8,5 - 12,5	630 - 710	12,5	ASTM, 2000.
<i>C. xanthus</i>	Tetramim® 23°C	80 - 100	4	150 - 170	2	240 - 280	2	380 - 490	5	FONSECA; ROCHA, 2004.
<i>C. calligraphus</i>	Tetramim® 22,5 - 31°C	115,2 (±6,9)	5	182,2 (±10,8)	3	295,3 (±19,1)	6	472,8 (±30,9)	10	ZILLI et al., 2008.
<i>G. holoparasinus</i>	Tetramim® 18 - 31°C	96,4 (±6,61)	2,5	170,8 (±6,96)	3	273,9 (±13,70)	3,5	427,4 (±29,93)	6,5	ZILLI et al., 2009.
<i>Chironomus aff. xanthus.</i>	Tetramim® 23°C	106 - 192	5	326 - 396	2	524 - 553	3	557 - 569	2	Presente trabalho.
		Comp. Corpo (µm)	Tempo (Dias)	Comp. Corpo (µm)	Tempo (Dias)	Comp. Corpo (µm)	Tempo (Dias)	Comp. Corpo (µm)	Tempo (Dias)	
<i>C. xanthus</i>	Tetramim® 23°C	820 - 1570	4	2870 - 4310	2	5120 - 6600	2	9370 - 15100	5	FONSECA; ROCHA, 2004. CORBI;
<i>G. luridus</i>	Tetramim®	510 - 975	3	1750 - 1800	2	2100 - 3450	3	3750 - 5080	10	TRIVINHO-
<i>G. maculatus</i>	21 - 26 °C	900 - 1688	6	1750 - 5980	3	2490 - 6330	5	4410 - 9459	14	STRIXINO, 2006.
<i>G. holoparasinus</i>	Tetramim® 18 - 31°C	640,9 (±224,83)	2,5	1869,8 (±529,25)	3	3099,4 (±1047,41)	3,5	5720,3 (±898,78)	6,5	ZILLI et al., 2009.
<i>C. calligraphus</i>	Alcon basic®/ <i>Spirulina e ad libitum</i> seca 22,5 - 31°C	612,8 (σ=229,3)	3	993,5 (σ=72,2)	4	1324,6 (σ=160,6)	4	4258,1 (σ=1744,7)	8	CANTEIRO; ALBERTONI, 2011.
<i>Chironomus aff. xanthus</i>	Tetramim® 23°C	668 - 2650	5	4000 - 4550	2	6550 - 9350	3	9950 - 10250	2	Presente Trabalho.

Legenda: C.C.= Cápsula Cefálica

Comparando os dados, podemos observar que o primeiro estágio de *C. calligraphus* (ZILLI et al., 2008; CANTEIRO; ALBERTONI, 2011) apresentaram o mesmo tempo de duração para o primeiro estágio de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) para os dados biométricos de largura da Cápsula cefálica e comprimento ventral, mesmo com alimento diferente.

Já o 2º e 3º estágio de *G. luridus* (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2006) e o 2º estágio de *C. xanthus* (FONSECA; ROCHA, 2004) foram idênticos em termos de duração aos obtidos no presente trabalho com *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

Nenhum dos dados biométricos obtidos com *G. holoparasinus* e *G. maculatus* em termos de duração foram iguais aos obtidos com *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014). Assim como, nenhuns dados biométricos do 4º estágio larval dos referidos organismos citados na tabela 4 foi igual ou semelhante em termos de duração. Todos os autores obtiveram um tempo de duração bem superior ao registrado no presente trabalho. De acordo com Canteiro e Albertoni (2011) o tempo mais elevado neste estágio é devido à agregação de energia para o indivíduo que será gasta no processo de acasalamento.

Com exceção dos métodos de cultivo utilizados por ASTM (2000) e Fonseca e Rocha (2004) nenhum dos outros autores utilizaram algum tipo substrato no cultivo nos organismos, sendo os mesmos, cultivados apenas em água aerada. Isso pode ter prejudicado o desenvolvimento metabólico das larvas, pois segundo Trivinho-Strixino (2011) as larvas de Chironomidae, em ambientes dulciaquícolas, são colonizadoras do sedimento ou vegetação aquática.

Segundo Trivinho-Strixino e Strixino (1982) a temperatura constante 25 °C pode acelerar o desenvolvimento das larvas e emergência dos adultos. Canteiro e Albertoni (2011) dizem que alguns estudos têm demonstrado que a taxa de crescimento das larvas é aumentada a temperaturas mais altas.

Muitos fatores, tais como a filogenia, a disponibilidade de recursos, a temperatura, estabilidade de habitat entre outros pode determinar e afetar o desenvolvimento de insetos. A curta duração do ciclo de vida garante um crescimento populacional bem visível (ZILLI et al., 2008).

Além disso, fatores como: alimento e a disponibilidade de espaço físico também podem afetar no desenvolvimento larval (CARTER, 1980; HOOPER et al., 2003 apud CANTEIRO; ALBERTONI, 2011).

O ciclo de vida considerado o mais curto encontrado foi o de *Chironomus strenzkei* (FITTKAU, 1968), que durou 12 dias, seguido por *C. xanthus* (STRIXINO e TRIVINHO-

STRIXINO, 1985) e *C. calligraphus* (ZILLI et al., 2008) que dura 15 dias. O Ciclo de vida mais longo foi registrado por Butler (1982) no Alaska para *Chironomus sp.* onde o ciclo dura 7 anos.

Os valores médios de r (Dyar) obtidos (Tabela 5) foram semelhantes para as medições do comprimento ventral cápsula cefálica e comprimento total da Cápsula cefálica (1,78 μm e 1,75 μm). Já os valores médios da taxa de crescimento (r) para a largura da Cápsula cefálica e comprimento do corpo apresentaram uma variabilidade tendo como médias: 1,82 μm e 1,95 μm . Levando-se em consideração as médias obtidas em cada dado biométrico analisado, o valor da taxa de crescimento média para *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) foi 1,82 μm ($\sigma = 0,088$).

Tabela 5 – Taxa de crescimento (r) entre os estágios larvais para as medições de comprimento médio ventral da Cápsula cefálica (C.C.), comprimento da Cápsula cefálica, largura da Cápsula cefálica e comprimento do corpo com seus respectivos desvios-padrão para *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

Estágio	Comp. Ventral C. C. (μm) (DP)	n	r	Comp. C. C. (μm) (DP)	n	r	Larg. C. C. (μm) (DP)	n	r	Comp. Corpo (μm) (DP)	n	r
I	65,20 (σ =11,20)	25		100,00 (σ =25,81)	25		124,40 (σ =35,00)	25		1579,71 (σ =776,81)	35	
			2,81			2,68			2,92			2,71
II	183,13 (σ =32,19)	16		268,13 (σ =52,94)	16		363,75 (σ =83,65)	16		4275,00 (σ =572,96)	20	
			1,47			1,50			1,48			1,90
III	269,31 (σ =23,74)	29		401,85 (σ =36,37)	27		537,60 (σ =49,94)	25		8416,67 (σ =1412,28)	30	
			1,06			1,75			1,05			1,24
IV	284,76 (σ =13,37)	21		429,00 (σ =21,49)	20		562,82 (σ =32,88)	21		10100,00 (σ =1209,61)	20	
Média (r)			1,78			1,75			1,82			1,95

Legenda: C.C.= Cápsula Cefálica

O valor de r (Dyar) obtido por Zilli e outros (2008) para *Chironomus calligraphus* para a largura cápsula cefálica e do comprimento do corpo foi menor ($1,60 \mu\text{m} \pm 0,02$) que os obtidos no presente trabalho.

Corbi e Trivinho-Strixino (2006) também obtiveram valores menores de r (Dyar) para *Goeldichironomus maculatus* $1,75 \mu\text{m}$ e *Goeldichironomus luridus* $1,62 \mu\text{m}$ para os valores de comprimento da cápsula cefálica e do comprimento do corpo. Para *C. xanthus* o valor de r foi de $1,70 (\pm 0,032)$ (TRIVINHO-STRIXINO; STRIXINO, 1982). Já para Zilli e outros (2009) com *Goeldichironomus holoprasinus* obteve resultados menores para as medições largura e comprimento ventral da cápsula cefálica ($1,65 \mu\text{m}$ e $1,63 \mu\text{m}$), no entanto um valor maior para o parâmetro comprimento do corpo ($2,14 \mu\text{m}$).

O uso do r (Dyar) é muito importante para os organismos bentônicos e para os insetos onde o primeiro estágio é menos provável de serem encontrados e muito das vezes deve ser feito por estimativa (ZILLI et al., 2008).

O presente trabalho também avaliou o ganho de biomassa diária das fases larvais de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014). O valor encontrado para o estágio I foi de 87,83µg ($\sigma = 39,27$), para o estágio II de 70,00 µg, ($\sigma = 10,00$), estágio III 300,00µg ($\sigma = 3,33$) e estágio IV 761,22 µg ($\sigma = 25,14$).

A figura 24 mostra os dados da curva de crescimento obtida através da correlação entre os valores médios da biomassa diária em relação ao tempo, que teve um alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8822$), sendo o modelo de regressão exponencial o que melhor se adaptou ($y = 19,172 e^{0,3162x}$) onde: y = biomassa média diária (µg) e x = tempo (dias). Nesta figura também foi inserido a correlação entre o comprimento médio diário do corpo em relação ao tempo. Dessa forma é possível observar que durante a primeira fase larval, de 5 dias de duração, o ganho de massa e o crescimento corpóreo seguem praticamente similares durante os primeiros 4 dias. No quinto dia é possível observar um aumento no comprimento do corpo e queda na massa corpórea. Isto se deve à troca de estágio larval (do I –II) no qual exige um maior consumo de energia para este processo.

No segundo estágio larval (entre o 6º e o 7º dias), observa-se um aumento no tamanho do corpo e uma perda de massa corpórea referente à troca de estágio e consequente ecdise. Outros dois fatores que também ajudam a entender esta perda na massa corpórea neste estágio, está relacionado à troca de hábito alimentar do organismo, que deixa a fase planctônica, onde se alimentava de bactérias e inicia sua alimentação por nutrientes contidos e/ou aderidos ao sedimento (FONSECA; ROCHA, 2004; ALMEIDA, 2007). Outro fator está ligado a produção dos casulos/tubo que se inicia nesta fase. Ambos os fatores necessitam de uma grande quantidade de energia (ALMEIDA, 2007).

Na fase seguinte o organismo tende a crescer e armazenar grande quantidade de massa corpórea, tendo um ápice no 10º dia do ciclo de vida. Este ganho de biomassa é necessário, uma vez que no 4º estágio do organismo terá um gasto energético devido à transformação para o estágio de pupa.

Segundo Almeida (2007), que avaliou o balanço energético cumulativo de *C. xanthus*, organismos com alta eficiência de assimilação é uma característica de organismos detritívoros, principalmente organismos que estão em fase larval, pois estes devem acumular energia para as drásticas transformações ocorridas na fase de pupa (metamorfose). Almeida (2007) encontrou um declínio de 35 % na biomassa da fase 4 para a biomassa da fase pupa.

Zilli e outros (2008) mencionam que a fase de transição entre larva e pupa exige uma grande quantidade de energia adicional, devido às mudanças que ocorrem nesta etapa (metamorfose).

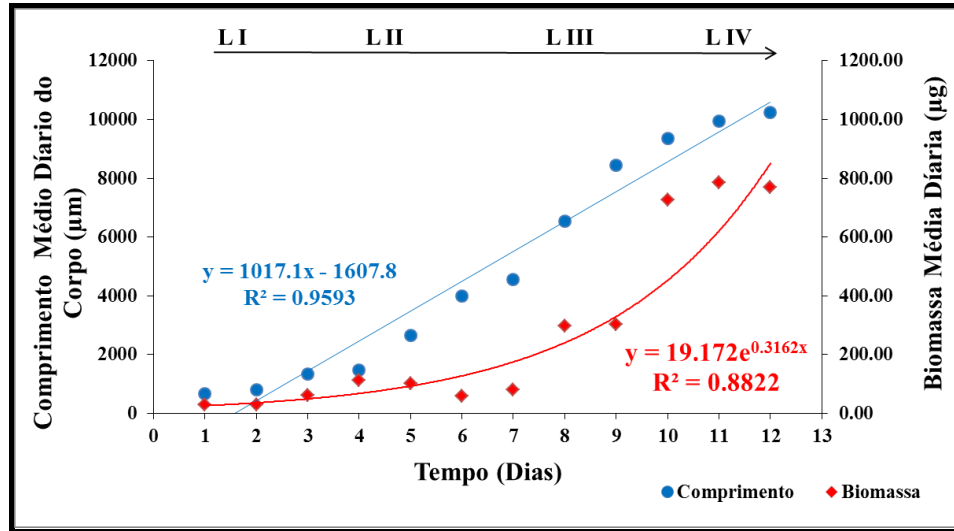


Figura 24 - Curva de crescimento de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) obtida a partir do comprimento médio diário ventral da Cápsula cefálica e da biomassa média diária em relação ao tempo, em condições laboratoriais (23°C, fotoperíodo: 12/12h).

A relação entre a biomassa média diária e o comprimento médio diário do corpo também seguiu um modelo de regressão exponencial ($y = 32,526 e^{0,0003x}$, onde: y = biomassa média diária (μg) e x = comprimento do corpo) e o coeficiente de determinação obtido (R^2) foi de: 0,886 (Figura 25).

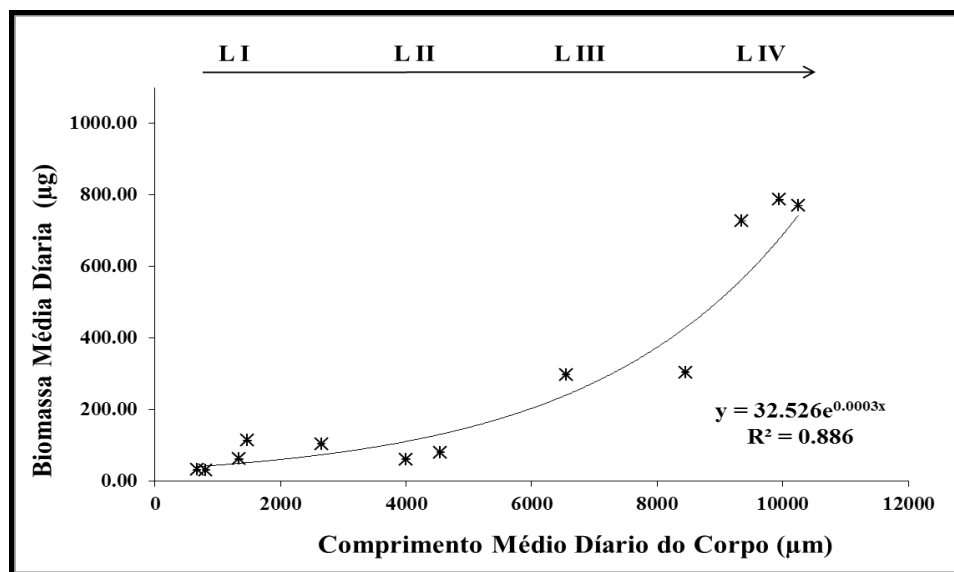


Figura 25 - Relação entre a biomassa média diária e o comprimento médio diário do corpo de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

Estudos como estes podem servir de subsídio aos bioensaios, fornecendo informações essenciais sobre efeitos sub letais não identificados quando organismos são expostos a contaminantes que afetam a biomassa dos mesmos (ALMEIDA, 2007). Além disso, estes estudos podem viabilizar o cultivo destas larvas em laboratório para serem usadas como alimento para peixes (RECH, 2011).

Com relação ao estágio de pupa, este durou cerca de 24 horas e o tamanho das pupas

foi de 6580 μm ($\sigma = 400$). A fase de pupa começa ainda no casulo, posteriormente estas larvas nadam até a superfície e lá permanecem até o momento do surgimento do adulto. Para *Chironomus calligraphus* (ZILLI et al., 2008) a fase de pupa durou cerca de $10 \pm 2,4$ dias. Já para *Goeldichironomus holoprasinus* (ZILLI et al., 2009) a fase de pupa durou em média de 4,5 dias.

Sobre os indivíduos adultos, os machos de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) mediram em média 5462 μm ($\sigma = 398$) e as fêmeas 5288 μm ($\sigma = 322$), ambos sobrevivem em média 6 a 7 dias.

Segundo Trivinho-Strixino (2011) pouco alimento pode reduzir a sobrevivência dos organismos adultos, principalmente as fêmeas, que ficam menores e menos fecundas. Além disso, as baixas temperaturas também pode reduzir a sobrevivência dos organismos adultos, porém produzem fêmeas maiores e mais fecundas.

Avaliar o balanço adequado entre a quantidade de alimento e a temperatura pode resultar em um potencial reprodutivo mais elevado, o que é muito importante quando se pretende cultivar estes organismos em laboratório.

5.3 - DURAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA MASSA OVÍGERA, TAMANHO DA MASSA OVÍGERA, DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE FECUNDIDADE, FERTILIDADE E PORCENTAGEM DE ECLOSÃO

A fase embrionária durou 48 horas a uma temperatura de incubação de 23,5°C. Este mesmo tempo foi registrado por Corbi e Trivinho-Strixino (2006) para *Goeldichironomus luridus* e *Goeldichironomus maculatus*.

Para *C. sancticaroli* o período de incubação foi de 72 horas (Viveiros 2012) e de 44 a 48 horas para *C. xanthus* (FONSECA; ROCHA, 2004). Já Zilli e outros (2008) encontraram um período de incubação de 3 dias para *C. calligraphus* e de apenas 36 horas para *C. holoprasinus* (ZILLI et. al., 2009).

Estas diferenças no período de incubação são consequências de estratégias adaptativas em relação ao clima dos habitats destes organismos (ZILLI et al., 2009), ou seja, em climas mais frios o período de incubação é maior do que clima mais quentes.

Segundo Sander (2000) mencionado em Corbi e Trivinho-Strixino (2006) logo após a ovoposição, os ovos passam por um período de desenvolvimento que é comum ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, na qual o embrião sofre uma série de divisões nucleares.

De acordo com Tokeshi (1995) citado por Canteiro e Albertoni (2011), o desenvolvimento dos ovos de Chironomidae parece acontecer em um tempo relativamente curto, dentro de alguns dias a um mês, e de ser positivamente relacionado com a temperatura.

O tamanho médio da massa ovígera de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) nas condições de cultivo estabelecida foi de $16727\mu\text{m}$ ($\sigma = 6072$) e ovo em torno de $178\mu\text{m}$ ($\sigma = 9,80$). O formato da massa ovígera é helicoidal. Este resultado foi maior quando comparado com os valores obtidos por Canteiro e Albertoni (2011) com *Chironomus calligraphus* em que a massa ovígera mediu $9000 \pm 1000 \mu\text{m}$ e ovo $160,3 \pm 17,7\mu\text{m}$.

Segundo Nolte (1993) as massas ovígeras de Chironomidae são compostas por uma massa gelatinosa que protege os ovos e em contato com a água incha. O formato dessa massa é uma característica de alguns grupos de Chironomidae.

De acordo com Fonseca e Rocha (2004) essa massa ovígera fica pendurada por um pedúnculo logo abaixo da superfície da água e é composta de hidratos de carbono, além de ser um importante suporte para as larvas na fase de dispersão.

A fecundidade média observada foi de 437 ovos ($\sigma = 120$) e a fertilidade de 260 larvulas ($\sigma = 101$) resultando em 58,63% de eclosão. No entanto, Zilli e outros (2008) registraram valores menores para *C.calligraphus* (369-374 - número de ovos por massa). Já Trivinho-Strixino e Strixino (1982) e Fonseca e Rocha (2004) com *C. xanthus* obtiveram uma gama maior (500 a 1045 ovos) e (500 a 600 ovos) respectivamente. Viveiros (2012) para *Chironomus sancticaroli*, obteve uma taxa de fecundidade de 530 ovos e fertilidade 225 larvulas, resultando em uma taxa de eclosão média de 42%, taxa está menor comparada à encontrada no presente trabalho.

Corbi e Trivinho-Strixino (2006) para *G. maculatus* e *G. luridus* obtiveram valores maiores, entre 780 e 600 respectivamente e Zilli e outros. (2009) com *G. holoprasinus* apresentaram uma massa de ovos menor, com média de 382 ± 10 ovos. Todas estas variações podem ser reflexos das diferentes condições de cultivo, ou tão pouco pelo próprio metabolismo nos organismos.

De acordo com Nolte (1993), as variações intraespecíficas na quantidade de ovos são comuns nos Chironomidae, e pode haver uma relação proporcional entre tempo de desenvolvimento do aparelho ovipositor feminino na fase larval e o número de ovos na postura, sendo assim, uma fêmea mais desenvolvida pode produzir mais ovos.

5.4 - CONFIRMAÇÃO TAXONÔMICA

Analisando as larvas de *Chironomus* enviadas para taxonomista Dr. Luiz Carlos Pinho, o pesquisador descobriu que o 4º dente lateral desta espécie é maior que o 5º dente (Figura 27 - A), e que o formato e o número de dentes do pente epifaríngeo também é diferente (Figuras 27 - B). Tais características diferenciam esta espécie da de *C. xanthus* em sua fase larval, porém não são características indicativas de outra espécie já descrita. Sendo assim, a sugestão dada pelo taxonomista foi de nomear esta espécie como: *Chirononus affinis xanthus*, já que a espécie mencionada é relacionada, mais não idêntica a *C. xanthus*, sendo necessária uma análise cito-taxônomica para que se possa diferenciá-las ou mesmo agrupá-las.

Vale ressaltar que, pelo fato do Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI manter em cultivo permanente a espécie de *C. xanthus*, para uso nos ensaios ecotoxicológicos, foi estabelecido uma parceria científica com o professor Dr. Luiz Carlos Pinho, de modo a contribuir com esta informação. Foi enviado ao professor todo o material de cultivo das duas espécies.

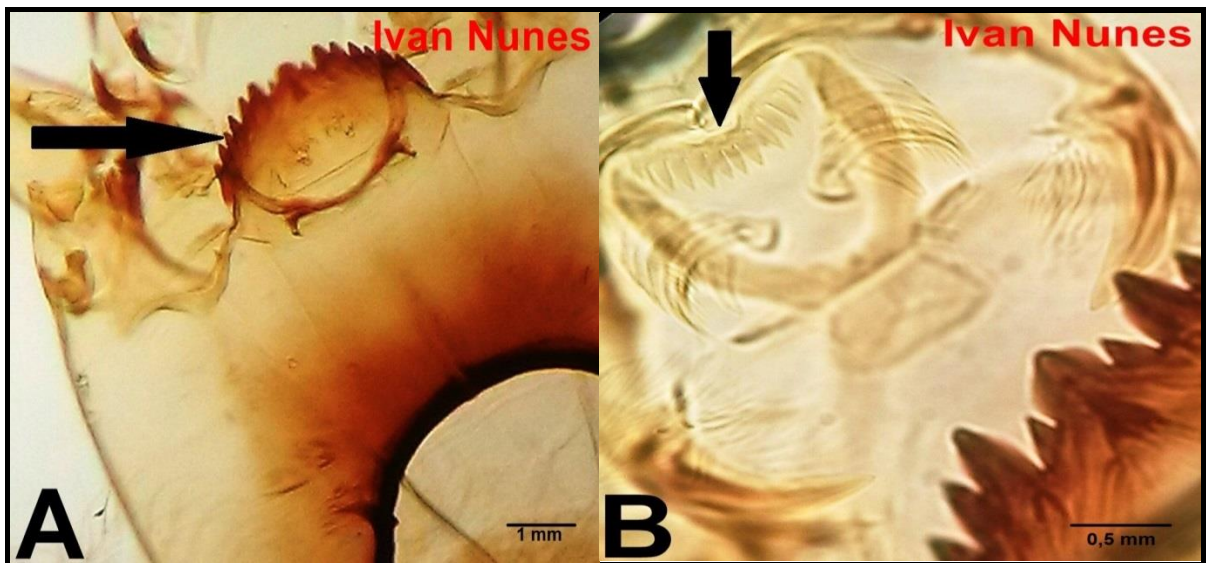


Figura 26 - Vista do 4º dente lateral do mento larval de *Chirononus affinis xanthus* (PINHO, 2014) (A). Vista do pente epifaríngeo larval de *Chirononus affinis xanthus* (PINHO, 2014) (B).

6 - CONCLUSÕES

As condições de cultivo adotadas para a espécie de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) indicaram o uso potencial deste organismo nos ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimento contaminadas pelas seguintes razões: Alta fertilidade, alta fecundidade e um ciclo de vida relativamente curto (15 a 16 dias (Ovo – adulto)).

O organismo também se adaptou as condições impostas, principalmente ao substrato utilizado, que se mostrou apropriado para este tipo de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. A. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios.** 2007. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)-Universidade de São Paulo, São Paulo 2007.
- AMARAL, A. A.; PIRES, S. C.; FERRARI, J. L. Qualidade da Água e do Sedimento de Fundo de alguns Córregos do Município de Castelo, Estado do Espírito Santo. **Revista Agro@mbinete On-Line**, Boa Vista v. 8, n. 2, p. 194-203, 2014.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Philadelphia. 2000 .
- ANJOS, A. F.; TAKEDA, A. M. Análise da dieta das larvas de 4º estágio de *Cricotopus* sp. (Diptera:Chironomidae), em diferentes substratos artificiais e fases hídricas, no trecho superior do rio Paraná. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 371-377, 2009.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21ª ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10664**: Águas – Determinação de resíduos (sólidos) – Método Gravimétrico. Rio de Janeiro, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp.* Rio de Janeiro, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2009.
- BAUDIN, J. P.; NUCHO, R.. Co accumulation from sediment and planktonic algae by midge larvae *Chironomus luridus*. **Environmental Pollution**, v. 76, p. 333-140, 1992.
- BORIS, D.K.; MICHAILOVA, P. V. Cytotaxonomic Characteristic of Four Species of *plumosus*. Group in Genus *Chironomus* Meigen 1803 (Diptera: Chironomidae) from Bulgaria and Poland. **Acta Zoologica Bulgaria**. v.2, p. 49 – 60, 2008.
- BURTON Jr., G. A. Sediment quality criteria in use around the world. **Limnology**, v. 3, p. 65-75, 2002.
- BUTLER M.G. A 7-year life cycle of two *Chironomus* species in arctic Alaskan tundra ponds (Diptera: Chironomidae). **Canadian Journal of Zoology**. v.60, p. 58-70, 1982.
- CANTEIRO, R. C.S.A. **Ciclo de Vida de *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera, Chironomidade).** 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais)-Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.
- CANTEIRO, R. C. S. A.; ALBERTONI, E. E. Growth of Immature *Chironomus calligraphus* (Diptera, Chironomidade) in Laboratory Conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1279 – 1286, 2011.
- CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. Ciclo de Vida de duas Espécies de *Goeldichironomus* (Diptera, Chironomidade). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 72-75, 2006.

- CORREIA, L.C.S.; TRIVINHO-STRIXINO, S; MICHAILOVA, P. A new species of *Chironomus* Meigen, 1803 (Diptera, Chironomidae) from the southeast of Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 40, n. 1, p. 29 – 38, 2005.
- CORREIA, L.C.S.; TRIVINHO-STRIXINO, S; MICHAILOVA, P. *Chironomus amissum* sp. n. (Diptera, Chironomidae) from southeastern Brazil. **Biota Neotropical**, v. 13, n. 4, p. 133-138, 2013.
- DYAR, H. G.; RHINEBECK, N.Y. The number of molts of Lepidopterous larvae. **Psyche**, v.5, p. 420–422, 1890.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 2 ed rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 225p.
- EPLER J. H. **Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina**. NC Dept Environ Nat Res, Raleigh, 2001. 526p.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FITTKAU, E. J. *Chironomus Strenzkei* n. sp. (Chironomidae, Dipt.), ein neues Laboratoriumsteir. **Zeitschrift für Morphologie der Tiere**, v. 63, p. 239-250, 1968.
- FONSECA, A. L., ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera, Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 16, n. 2, p. 153-161, 2004.
- FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba /SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 1997. 222 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- GUIMARÃES, E. S.; LACAVA, P. M.; MAGALHÃES, N. P. Avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia similis* na água captada no Rio Paraíba do Sul e processada na Estação de Tratamento de Água do município de Jacareí - SP – Brasil. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 124-130, 2004.
- INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Análise Granulométrica - Dispersão Total. Disponível em: http://ppbio.inpa.gov.br/sites/default/files/Analise_granulometrica.pdf
>Acesso 24 de MAI de 2013.
- IPEN – INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES. Disponível em: <<http://www.ipen.br/sitio/?idc=388>>. Acesso em 01 NOV. 2013.
- JANKE, H. **Avaliação ecotoxicológica da adição de nitrato em sedimentos eutrofizados da represa ibirité (Betim – MG): experimentos em microcosmos**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP**. 2004. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas)-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- KANNO, R. H. N.; BARRILI, G. H. C.; NEGREIROS, N. F. Composição de Macroinvertebrados Bentônicos do Córrego Bela Vista, Araçatuba-SP. **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 9, n. 3, p. 138 – 149, 2013.
- MENDES, H. F.; PINHO, L. C. Diptera: Chironomidae. 2006. <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/chironomidae/chiroin dex.htm> *In*: Levantamento e biologia

de Insecta e Oligochaeta aquáticos de sistemas lóticos do Estado de São Paulo, <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce>. [Atualização: Setembro 2008 (em construção)].

MENDES, H. F.; PINHO, L. C. Chironomidae: Checklist of the Brazilian Chironomidae species. 2014. Disponível em: < <https://sites.google.com/site/brazilianchironomids/list> >. Acesso em 27 DEZ. 2014 (a).

MENDES, H. F.; PINHO, L. C. Taxonomy of Chironomidae (Insecta: Diptera) in Braz. 2014. Disponível em: < <https://sites.google.com/site/brazilianchironomids/home> >. Acesso em 27 jan. 2014 (b).

NOLTE, U. Egg masses of Chironomidae (Diptera). A review including new observations and preliminary key. **Entomologica Scandinavica Supplement**. v. 43, p. 1-75, 1993.

OLIVEIRA, P. C.R. **Comunidade de Macroinvertebrados Bentônicos e Qualidade da Água e do Sedimento das Bacias Hidrográficas dos Rios Lavapés, Capivara, Araquá e Pardo, Município de Botucatu (SP) e Região**. 2009. 202 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

PANTALEÃO, S. M. **Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água e sedimento do Rio Japarutuba (Sergipe)**. 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica)-Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2006.

PÉREZ, G. R. **Guía para el estudio de los macroinvertebrados acuáticos del Departamento de Antioquia**. Universidad de Antioquia. Medellín - Colombia. 1996.

RECH, K. C. **Desenvolvimento da Criação de Larvas de Chironomus sp. (Diptera) e Brachiura Sowerbyi (Annelida) para Alimentação de Peixes de Água Doce**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

RUPPERT, E; BARNES, R.D. **Zoologia de Invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Rocca, 1996.

SILVA, N.A. **Caracterização e Mapeamento da fauna macrobentônica da plataforma continental entre Porto e Aveiro – qualidade ecológica do sistema**. 2011. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Ambiente e Território)- Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2011.

SILVA, F. L.; BOCHINI, G. L.; MOREIRA, D. C.; PEREIRA, J. G.; RUIZ, S. S.; TALAMONI, J. L. B.; KNOLL, F. R. O Uso da Condutividade Elétrica e da Fauna Chironomidae na Avaliação da Qualidade das Águas do Ribeirão dos Peixes, Dois Corregos, SP. Disponível em :< www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/285a.pdf> Acesso em: 21 NOV. 2014.

SILVÉRIO, P. F. **Participação, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados a organismos bentônicos em sedimentos**. 1999. 78 f. Tese (Mestrado em Química Analítica)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

STOCKMANN, C. **A Influência do pH e da Dureza sobre a Inibição do Ciclo de Vida do Microcrustáceo *Moina micrura* (Kurz, 1874) em um Tanque de Decantação**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino; Strixino, (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 26, p.183-189, 1982.

TRIVINHO-STRIXINO, S., STRIXINO, G. **Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo**. Guia de identificação e diagnose dos gêneros. Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade de São Carlos. São Carlos, 1995.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Insetos Dípteros: Quironomídeos. In: Joly, C.A.; Bicudo, CEM. (orgs.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX, 4º Invertebrados de água doce / D. Ismael; W.C. Valenti; T. Matsumura-Tundisi; O. Rocha. São Paulo: FAPESP, p.141-148, 1999.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Larvas de Chironomidae - Guia de Identificação**. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Hidrobiologia, Laboratório de Entomologia Aquática. São Carlos, 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **USEPA/600/R-94/064**: Methods for measuring toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, 2000.

VIVEIROS, W. **Chironomus Sancticaroli – do Cultivo em Laboratório ao Ensaios Ecotoxicológicos com Amostras Ambientais de Sedimento**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais)-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2ª ed. São Paulo: RIMA, 2006. 464 p.

ZILLI, F.L.; MONTALTO, L.; PAGGI, A. C.; MARCHESE, M. R. Biometry and Life Cycle of *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera, Chironomidae) in Laboratory Conditions. **Interciência**, v. 33, n. 10, p. 767-770, 2008.

ZILLI, F.; MARCHESE, M.; PAGGI, A. Life Cycle of *Goeldichiromus holoprasinus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) in Laboratory. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 472 – 476, 2009.

WETZEL, R.A., LIKENS, G.E.; **Limnological Analyses**. 2ª ed. New York: Springer, 1991. 391 p.

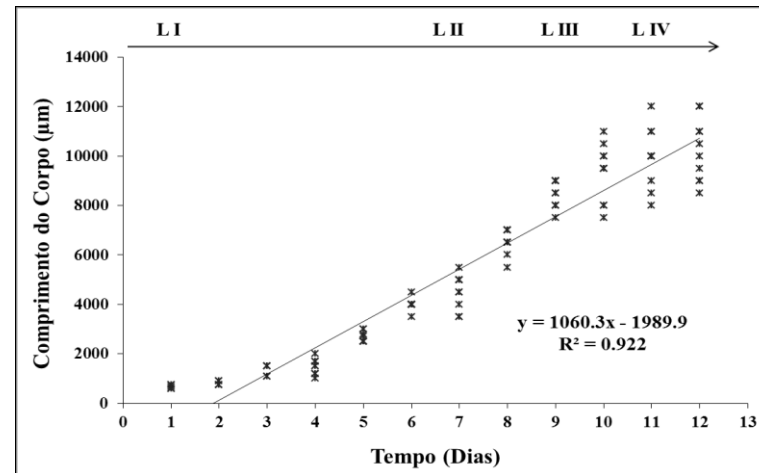
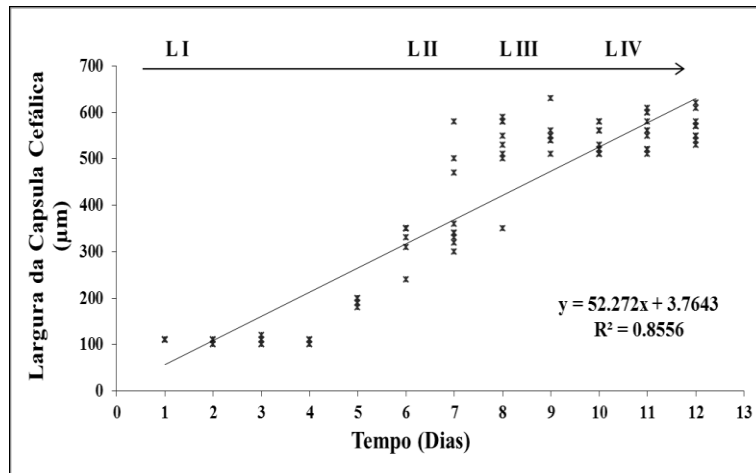
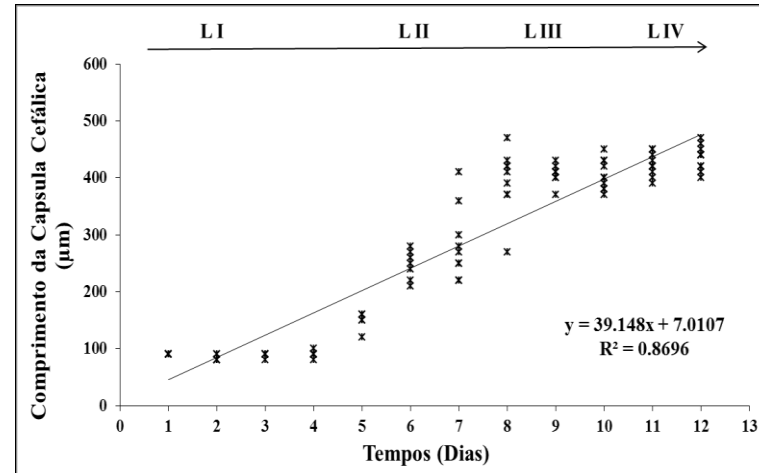
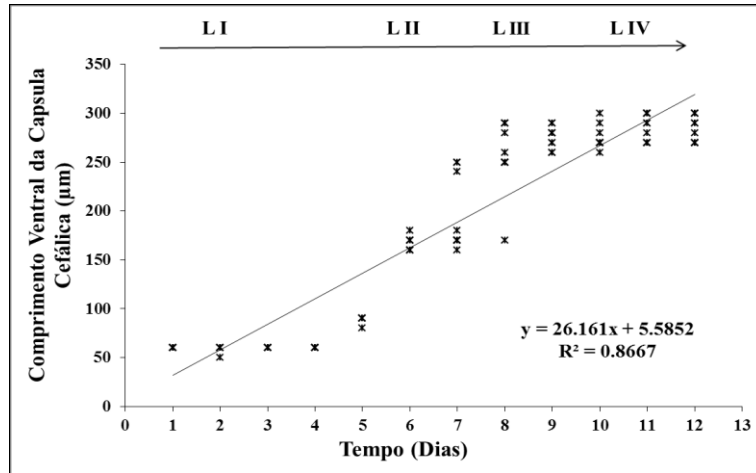
ANEXO I - Parâmetros e Condições necessárias para o Cultivo e Manutenção da Espécie de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

CULTIVO	
PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Temperatura da Água	23° C (+/- 0,5°C)
Temperatura do ambiente	23 á 26 °C
Luminosidade	645 a 670 Lux (9.03 a 9.38 fótons)
Fotoperíodo	12 horas
Recipiente	Bandejas de polietileno com capacidade de 7 L
Quantidade de Sedimento	500 gramas (Arenoso)
Água de Cultivo	Proveniente de fonte natural com pH (7,0 a 7,6), Condutividade (72 a 212 $\mu\text{S.cm}^{-1}$), Dureza (40 a 48 mg $\text{CaCO}_3\text{.L}$) e Oxigênio Dissolvido (>5,0 mg.L ⁻¹).
Volume de água	4 L
Idade dos indivíduos	1° ínstar
Numero de organismos por cultura	150 á 200
MANUTENÇÃO	
Alimentação	1° dia: 20 mL da solução de algas clorofíceas (10^5 cels.mL ⁻¹) e 80 mL da solução de ração de peixes (0,002 mg.mL de sólidos totais (ST) e 0,002 mg.mL de sólidos voláteis (SV)). Posteriormente: a cada dois dias 80 mL da solução de ração de peixes até o surgimento dos indivíduos adultos.
Aeração	Continua e Branda
Limpeza	Semanal: laterais das bandejas e superfície da água.
Duração da Cultura	19 a 20 dias.
Retiradas das desovas	3 a 4 vezes por semana.

ANEXO II – Tamanho, Fecundidade, Fertilidade e Porcentagem de Eclosão por Desova Analisada.

Desova/Nº	Tamanho (µm)	Total de Ovos	Total de Larvulas	Porcetagem de Eclosão (%)
1	6000	291	198	68.04
2	14000	421	257	61.05
3	34000	750	367	48.93
4	28000	458	276	60.26
5	14000	425	259	60.94
6	15000	398	253	63.57
7	15000	293	121	41.30
8	20000	398	67	16.83
9	21000	547	460	84.10
10	14000	246	101	41.06
11	14000	435	317	72.87
12	15000	401	263	65.59
13	13000	261	182	69.73
14	17000	416	253	60.82
15	14000	365	222	60.82
16	26000	521	268	51.44
17	14000	466	275	59.01
18	17000	636	477	75.00
19	11000	464	306	65.95
20	18000	559	339	60.64
21	15000	364	159	43.68
22	13000	497	289	58.15
Média	16727	437	260	58.63
DP	6072	120	101	14
CV(%)	36,30	27,47	39,00	24,15

ANEXO III – Dados Brutos do Comprimento Ventral da Cápsula Cefálica (n=91) Comprimento da Cápsula Cefálica (n=88), Largura da Cápsula Cefálica (n= 87) e Comprimento do Corpo (n=105) em Relação ao Tempo.



CAPITULO 2 – SENSIBILIDADE DE *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) AS SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA: CLORETO DE POTÁSSIO E CLORETO DE CÁDMIO.

1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O crescimento populacional, acompanhado do aumento do consumo de combustíveis fósseis, devido à expansão industrial, vem acelerando os impactos ambientais como o despejo efluentes nos corpos hídricos (ALMEIDA, 2007). Segundo Jardim (1992), a principal fonte de degradação dos ecossistemas aquáticos são os lançamentos de esgotos industriais e domésticos não tratados.

Apesar da grande gama de técnicas analíticas existentes, apenas estas não são suficientes para garantir os programas de biomonitoramento ambiental, já que os resultados obtidos por estas análises, apenas indicam a concentração da substância poluente, mas não o seu efeito aos organismos ou mesmo a sua biodisponibilidade (ALMEIDA, 2007). Para isso os ensaios ou bioensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos são necessários como complemento nestes programas.

O primeiro ensaio de toxicidade aquática registrado tem mais de 2000 anos e foi realizado por Aristóteles que teve como objetivo avaliar a reação de organismos dulcícolas quando em contato com água salgada (ALMEIDA, 2007).

Os organismos aquáticos utilizados em ensaios ecotoxicológicos devem pertencer a certos grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos (CARVALHO et al., 2012). Dentre os mais utilizados para estes fins se destacam os cladoceros, macroinvertebrados bentônicos e os peixes.

Segundo Carvalho e outros (2012) outro fato que deve ser levado em consideração é a sensibilidade dos organismos a exposição da substância de referência. Para tanto é necessário que o organismo escolhido seja bastante sensível a uma diversidade de agentes químicos e estejam facilmente disponíveis e em abundância tanto na natureza como nos sistemas de cultivo laboratorial.

Segundo Magalhães e Ferrão-Filho (2008) alguns critérios devem ser levados em consideração para a escolha do organismo-teste tais como: representação ecológica; cosmopolitismo; ter conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade das populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa.

A utilização de comunidades biológicas nos ensaios ecotoxicológicos é uma das maneiras de se obter uma maior relevância ecológica, que visa tanto a preservação da fauna aquática como do próprio ecossistema em que a mesma está inserida (CETESB, 2010).

De acordo com Fonseca e Rocha (2004) os Chironomidae são utilizados em ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimentos contaminados. Esses organismos, segundo estes autores, são considerados bons bioindicadores devido a sua abundância na comunidade bentônica, importância na cadeia alimentar e por alimentarem-se de partículas de sedimento que estão diretamente expostos aos compostos tóxicos e em contato com o corpo do organismo.

Dentre as espécies mais comumente utilizadas destacam-se o gênero *Chironomus* como, por exemplo, o *Chironomus tentans* (EUA) e *Chironomus riparius* (Europa). No Brasil a espécie de *Chironomus xanthus* vem sendo utilizada neste tipo de ensaio, porém a mesma ainda não possui um protocolo normatizado para os ensaios ecotoxicológicos, diferentemente das outras duas espécies citadas.

As espécies de Chironomidae, em sua fase larval, apresentam adaptações para viver em extremos de temperatura, pH, salinidade, profundidade, velocidade de correnteza, produtividade, em locais com baixas concentrações de oxigênio dissolvido e podem ser os únicos insetos presentes no sedimento (CRANSTON, 1995 apud CALLISTO; ESTEVES, 1998). Já a distribuição e a abundância dos Chironomidae são influenciadas pelas condições físicas e químicas da água, assim como pelas características do substrato e as relações tróficas com outros organismos (JOHNSON et al. 1992 apud SILVA et al. 2008).

Trivinho-Strixino e Strixino (1982) iniciaram o desenvolvimento da metodologia de cultivo de *C. xanthus* e evidenciaram a facilidade de sua manutenção em laboratório. A partir de então, vários estudos buscam melhorar a técnica de cultivo e manutenção desses organismos como os de: Almeida (2002) e Fonseca e Rocha (2004). Estes autores estudaram o ciclo de vida desta espécie visando sua utilização como organismo-teste na avaliação de efeitos tóxicos em amostras de sedimentos contaminados pertencentes a ambientes água doce. Trata-se de uma espécie de ocorrência nos trópicos e sub trópicos, porém com distribuição geográfica restrita ao Brasil e a Argentina (TRIVINHO - STRIXINO; STRIXINO 1982). Tem sido utilizado em vários trabalhos, como por exemplo: Dornfeld, 2006, Calvalcanti, 2010 e Emygdio, 2011.

Fatores como a fácil manutenção e cultivo em laboratório, além do ciclo de vida relativamente curto, tem contribuído para a utilização de algumas espécies de *Chironomus* em programas de controle da qualidade da água e sedimento, sendo assim, alguns procedimentos padrões foram estabelecidos pela USEPA, APHA (American Public Health Association), ASTM e FAO (Food and Agriculture Organization) para os testes de toxicidade de efeito agudo ou crônico com amostras de sedimento contaminado utilizando estes organismos

(USEPA, 2000; FONSECA; ROCHA, 2004; ALMEIDA, 2007), mas ainda faz-se necessário a descoberta de outras espécies que também possam ser utilizados em programas de biomonitoramento com amostras de sedimento, aumentando assim a disponibilidade de organismos.

Como mencionado dentre os critérios de seleção de organismos- teste, destacam-se a avaliação da sensibilidade à substâncias de referência, como os sais, entre eles: o cloreto de sódio (NaCl) e o de potássio (KCl), o metais como: sulfato de cobre (CuSO₄), dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) ou cloreto de cádmio (CdCl₂), além de surfactantes como o dodecil sulfato de sódio (C₁₂H₂₅SO₄Na) ou mesmo a amônia (NH₃). Todas estas substâncias foram selecionadas para serem utilizadas na avaliação da sensibilidade de potenciais organismos teste.

Sendo assim, no presente capítulo a espécie isolada *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) teve sua sensibilidade avaliada por meio de duas substâncias de referência: o cloreto de potássio (KCl) e o cloreto de cádmio (CdCl₂). Todos os ensaios foram realizados através de exposição aguda (96h) em número suficiente para se estabelecer uma carta-controle para a substância KCl que subsidiou os ensaios com CdCl₂.

2 - OBJETIVOS

2.1 - GERAL

- Avaliar o potencial uso de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) nos ensaios ecotoxicológicos.

2.2 - ESPECÍFICOS

- Verificar a sensibilidade dos diferentes estágios larvais de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) ao Cloreto de Potássio e indicar o mais adequado a ser avaliado com Cloreto de Cádmio;

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

O termo ecotoxicologia, foi mencionado pela primeira vez em junho de 1969, na reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut, que definiu a ecotoxicologia como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Segundo Costa e outros (2008) a ecotoxicologia aquática é uma área especializada da toxicologia ambiental, cujo objetivo é avaliar o efeito de substâncias tóxicas sobre organismos representativos do ambiente aquático por meio de ensaios de toxicidade.

Em comparação com as tradicionais análises físicas e químicas, estes ensaios possuem uma maior relevância ecológica, uma vez que os próprios organismos são os sensores, por terem seus sistemas biológicos afetados pelas substâncias tóxicas, porém são considerados um complemento às avaliações dos parâmetros físicos e químicos (CARVALHO et al., 2012).

De acordo com Costa e outros (2008) os ensaios ecotoxicológicos aquáticos podem ser realizados com vários organismos, tais como: bactérias, algas, microcrustáceos, organismos bentônicos e peixes. Todos estes organismos possuem metodologias já definidas, e estes ensaios são conhecidos também como bioensaios. Diferentes abordagens podem ser realizadas nestes ensaios, desde a molecular, quando se utiliza apenas o organismo, até o ecossistema, em que a avaliação é feita em toda a comunidade e sua interação com o meio.

Estes ensaios são utilizados para avaliar os efeitos tóxicos de substâncias químicas na forma isolada ou de misturas complexas. São capazes de detectar efeitos deletérios, mesmo quando estes compostos não são passíveis de identificação ou estão no limite de detecção dos métodos químicos analíticos. Os ensaios ecotoxicológicos podem avaliar a influência de interações aditivas e/ou antagônicas que podem ocorrer entre os constituintes químicos e os processos de transformação e fatores físicos e químicos intrínsecos, que interferem na biodisponibilidade e na toxicidade destes constituintes (BADARÓ-PEDROSO, 1999 apud IHARA, 2008).

Os testes de toxicidade com organismos individualizados são bioensaios laboratoriais realizados em condições experimentais específicas e controladas. Estes ensaios são utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais como:

águas e sedimento. Neste tipo de ensaio, os organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de uma determinada amostra e os efeitos tóxicos produzidos são observados e quantificados (COSTA et al., 2008). Por outro lado, o termo bioensaio é também empregado em ecotoxicologia aquática, e normalmente utilizado para designar um teste que avalia a potência relativa de um agente ou mais e é muito usado para se designar ensaios com amostras ambientais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os ensaios de toxicidade ou bioensaios podem ser realizados em laboratório em condições experimentais específicas e controladas ou *in situ*; e os efeitos observados aos organismos expostos podem ser classificados como agudos ou crônicos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Segundo Carvalho e outros (2012) os estudos realizados em campo (*in situ*) do tipo mesocosmos, por utilizar várias espécies, são considerados mais realísticos quando comparados aos ensaios laboratoriais, que utilizam, na maioria das vezes, uma única espécie. No entanto, ensaios *in situ* também podem ser realizados com espécies individuais. Estes ensaios tem a vantagem de que os organismos sofrem todas as variações ambientais juntamente com a exposição aos contaminantes tóxicos.

Os bioensaios de toxicidade aguda analisam o efeito deletério (letalidade) causado por uma amostra, simples ou composta, aos organismos-teste em um curto período de exposição, em relação ao seu ciclo de vida (KNAPIK; ANDREATTA, 2013).

Uma exposição aguda trata-se da resposta de um organismo ou célula submetido a uma alta concentração, num curto período de tempo, normalmente entre 24 e 96 horas para microcrustáceos e peixes respectivamente, tendo como parâmetros de avaliação a letalidade ou a imobilidade total. O resultado é expresso como Concentração Letal Média (CL50) para peixes ou a Concentração Efetiva Média (CE50) para microcrustáceos, ou seja, a concentração do agente tóxico capaz de causar mortalidade ou imobilidade, a 50% dos organismos após o tempo de exposição (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Já o efeito de exposição crônica causado por amostra simples ou composta, a duração do tempo de exposição é maior e os organismos são expostos a concentrações subletais. Normalmente o tempo de exposição é de 1/3 do seu ciclo de vida e os parâmetros avaliados são os efeitos nas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação destes organismos (COSTA et al., 2008; KNAPIK; ANDREATTA, 2013). São utilizados como efeitos preditivos na avaliação de risco ecológico.

Nos testes de toxicidade crônica determina-se a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO). Pode-se determinar

também o Valor Crônico (VC), que é a média geométrica entre o CENO e CEO e a Concentração Percentual de Inibição (ICp), que é a concentração que causa um percentual de inibição na reprodução ou no desenvolvimento embrionário e/ou larval em um tempo específico de exposição. A CENO seria, portanto, uma concentração considerada segura do agente tóxico ou efluente tóxico a ser lançado num corpo d'água, enquanto que a CL50 ou a CE50 são parâmetros que indicam a toxicidade da substância ou amostra testada. Quanto menor os valores de CL50/CE50, maior o efeito tóxico da substância ou amostra (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Em todo mundo vários órgãos ambientais como USEPA (2000) e ASTM (2000) têm utilizados protocolos de bioensaios de ecotoxicidade como ferramenta de regulamentação e para seleção de novos organismos-teste. Segundo Dellamatrice e Monteiro (2006) existe uma grande variedade de espécies já padronizadas, compreendendo os mais diferentes níveis tróficos tais como: organismos produtores (algas), consumidores primários (microcrustáceos), consumidores secundários (peixes) e decompositores (bactérias).

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é a instituição responsável pela elaboração e divulgação dos protocolos dos ensaios ecotoxicológicos, como por exemplo, a NBR 12.648 (2011), NBR 12.713 (2009), NBR 13.373 (2010) e NBR 15.088 (2011) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Com relação à legislação até a década de 1980, somente o monitoramento químico era utilizado como forma de controle de poluentes em efluentes líquidos nos corpos hídricos. As condições e padrões de lançamentos de efluentes eram estabelecidos pela Resolução CONAMA 20/86, que vigorou no período de 1986 a 2005 (PENIDO, 2010).

Entretanto, esta resolução tornou-se obsoleta e foi revogada pela CONAMA 357/05, que incluiu os ensaios de toxicidade de efeitos agudos e crônicos na avaliação de lançamentos de efluentes domésticos e industriais no ambiente aquático, pois perceberam que somente o monitoramento baseado nos parâmetros físicos e químicos não garantia a adequação dos efluentes aos padrões de lançamentos e da não ocorrência de impacto no corpo hídrico. A Resolução CONAMA 344/04 também incluiu a avaliação ecotoxicológica em amostras de sedimentos a serem dragados (ALEGRE, 2009; PENIDO, 2010). Estas legislações têm direcionado os órgãos ambientais em seus programas de biomonitoramento ambiental, com ênfase aos parâmetros de qualidade de água.

3.2 - BIOINDICADORES

O termo bioindicador tem sido usado para identificar respostas biológicas que indicam a exposição ou os efeitos de poluentes em organismos, populações, comunidades e ecossistemas (ANDRÉA, 2008). Esses organismos, plantas ou animais, são chamados de indicadores biológicos ou bioindicadores da presença - ausência de contaminantes no ambiente.

Os bioindicadores são espécies, grupos ou comunidades biológicas, onde a presença, quantidade e distribuição, indicam o tamanho dos impactos ambientais em um determinado ecossistema aquático e sua bacia de drenagem (CALLISTO et al., 2002).

Segundo a USEPA (2008) mencionado por Andréa (2008), os efeitos de alteração ou de saúde do ambiente são chamados de indicadores ecológicos. Entretanto tem-se notado que alguns organismos como peixes, insetos, algas, plantas são resistentes a alguns níveis de contaminação, pois não morrem quando expostos a certos agentes tóxicos e fornecem informações precisas sobre a saúde dos respectivos ambientes.

Os bioindicadores, quando não sofrem efeitos agudos (morte) por alterações do ambiente, respondem a elas por meio de reações comportamentais ou metabólicas mensuráveis (concentrações consideradas de efeitos crônicos), que indicam e refletem alguma mudança no ambiente onde eles vivem (ANDRÉA, 2008).

Além disso, são importantes ferramentas para a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição. O uso dos bioindicadores é mais eficiente do que as medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos como: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, teores totais e dissolvidos de nutrientes, que são normalmente medidos no campo e utilizados para avaliar a qualidade das águas. Por isso, a USEPA e a Diretriz da União Europeia recomendam a utilização de bioindicadores como complemento às informações obtidas com os parâmetros físicos e químicos sobre a qualidade das águas (CALLISTO et al., 2013).

Segundo os mesmos autores, os bioindicadores mais utilizados são aqueles capazes de diferenciar os fenômenos naturais e o estresse de origem antrópica, relacionados às fontes de poluição. Alguns organismos estão diretamente ligados a um determinado agente poluidor ou a um fator natural potencialmente poluente como exemplo, pode-se mencionar as altas densidades de *Oligochaeta* e de larvas de *Chironomus* (Diptera), em rios com elevados teores de matéria orgânica. Estes organismos pertencem ao grupo dos macroinvertebrados bentônicos.

Os macroinvertebrados bentônicos representam um elemento importante na estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos e sua distribuição é influenciada pelas características do sedimento, morfologia das margens, profundidade, natureza química do substrato, vegetação, competição entre as diferentes espécies e disponibilidade de fontes alimentares (QUEIROZ et al., 2000). Estes organismos têm sido considerados bons bioindicadores, desde os primórdios dos estudos limnológicos.

O primeiro teste de toxicidade com insetos aquáticos que se tem notícia foi realizado em 1816 (BUIKEMA; VOSHELL 1993 apud MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

3.3 - SENSIBILIDADE A SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

As substâncias de referência são utilizadas nos laboratórios de ecotoxicologia para garantir a qualidade analítica de estudos que realizam ensaios de toxicidade de efeitos agudos e crônicos, bem como avaliar as alterações na sensibilidade de organismos testes mantidos em cultivo laboratorial (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Segundo a ENVIRONMENT CANADA (1990) o objetivo dos ensaios ecotoxicológicos com substâncias de referência é avaliar a repetitividade do método analítico em um laboratório ao longo do tempo e, também permitir comparações inter laboratoriais. Além disso, estas substâncias são selecionadas para indicar se aquele organismo será mesmo utilizado nos ensaios ecotoxicológicos.

Os resultados obtidos com as substâncias de referência são demonstrados na forma de cartas-controle onde os limites de aceitação dos resultados estão compreendidos entre ± 2 desvios-padrão da média dos valores de CL50 ou CE50 de no mínimo cinco ensaios. Tal procedimento foi estabelecido pela USEPA. Estes valores indicam a qualidade do ensaio ecotoxicológico (ENVIRONMENT CANADA, 1995; USEPA, 2002; apud KNAPIK; ANDREATTA, 2013).

A seleção de uma substância de referência segue alguns critérios, tais como: ser um contaminante ambiental; disponibilidade técnica para mensurá-la, solubilidade, segurança dos técnicos na manipulação em laboratório, estar disponível no mercado com pureza consistente, ser estável em água, ou seja, que sua toxicidade permaneça inalterada, não sendo afetada por variações normais da qualidade da água (por exemplo, pH, dureza, substâncias orgânicas como ácidos húmicos, dentre outros), ter toxicidade consistente, ter toxicidade não específica para os diferentes grupos de organismos e ter dados ecotoxicológicos básicos disponíveis (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; BERTOLETTI, 2014).

Existe uma gama de substâncias de referência, mais dentre elas destacam – se: os cloretos de potássio e de sódio e os metais: cádmio, cromo, cobre, níquel, zinco, nitrato de amônia e o surfactante: docecil sulfato sódio entre outros (BOSSUYT; JANSSEN, 2005).

O Cloreto de Potássio (KCl) de alta pureza é utilizado na realização de titulações argentimétricas. Porém a utilização do KCl causa algumas discussões, pois acredita – se que ocorra mais um efeito osmótico no organismo-teste do que um efeito tóxico propriamente dito (KNIE; LOPES, 2004).

Já o cádmio é altamente resistente à corrosão e por tanto é usado em eletrodeposição sobre outros metais, principalmente aço e ferro. É utilizado em parafusos, porcas, fechaduras e várias partes de aeronaves e motores de veículos, equipamentos marítimos e máquinas industriais. Sua abundância na crosta terrestre situa-se em torno de 0,1 a 0,2 ppm (CARDOSO; CBASIN, 2001)

Já a forma de cloreto de cádmio é um sólido cristalino e branco (CARDOSO; CBASIN, 2001). O Cloreto de Cádmio é facilmente complexado pela matéria orgânica, ácidos húmicos e hidróxidos presentes na água e tem potencial carcinogênico (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Segundo Bertoletti (2014) o uso da substância de referência visa avaliar o estado de saúde dos organismos e detectar lotes debilitados ou geneticamente diferentes. Além disso, as substâncias de referência são utilizadas para aumentar a confiabilidades dos dados gerados em diferentes estudos e/ou laboratórios (ZAGATO; BERTOLETTI, 2006).

Para escolher uma substância de referência deve primeiramente, saber o objetivo do estudo e, posteriormente, verificar se algumas das substâncias de referência já conhecidas foram padronizadas em outras espécies do mesmo grupo taxonômico.

Uma única substância não é capaz de revelar o real estado de “saúde” dos organismos, deve – se testar mais de uma substância, sendo estas pertencentes á diferentes grupos químicos, como por exemplo: um sal, um metal e um surfactante, pois muitas vezes a espécie testada pode ser sensível a um sal, mais resistente a um metal, por exemplo. Além disso, os dados obtidos durante o ensaio (pH, Dureza, Condutividade), juntamente com os dados de cultivo (Taxa de reprodução e sobrevivência), ajudam a fornecer maiores informações sobre a saúde dos organismos-teste (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CULTIVO POR MEIO DE ENSAIO DE SENSIBILIDADE COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl)

A substância empregada no presente trabalho foi o cloreto de potássio (KCl). Com o KCl foi avaliado a qualidade das culturas nos estágios larvais (II, III e IV) de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), excluindo o primeiro estágio, por ser de hábito planctônico, com intuito de avaliar o estado de saúde da larvas cultivadas em laboratório e estabelecer a melhor fase a ser utilizada nos ensaios de exposição aguda, que posteriormente foi realizado com cloreto de cádmio (CdCl_2).

Com base nos valores de CL50 obtidos com *C. xanthus* por FONSECA, 1997, foram selecionadas as seguintes concentrações: 1,0 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 3,0 g.L⁻¹, 4,0 g.L⁻¹, 5,0 g.L⁻¹ e 6,0 g.L⁻¹ de KCl. As concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque (SE) de 40 g.L⁻¹ de KCl (SIGMA ALDRICH®) e água de cultivo.

Mantendo-se uma de proporção de 15 organismos/300 mL de solução (USEPA, 2000), foram preparadas 15 réplicas individualizadas em frascos de polipropileno contendo 20 mL de solução para cada concentração (tabela 6). O preparo das mesmas foi realizado utilizando as devidas proporções da solução estoque com a água de cultivo. Na figura 27 encontra-se um esquema destes ensaios.

Tabela 6 - Proporções de volumes para preparo das soluções – teste com KCl.

Padrões	Proporção		
	V (água de cultivo) mL	V1 (SE) mL	V (final)
Controle	20,0	0,0	20,0
1 g.L ⁻¹	19,5	0,5	20,0
2 g.L ⁻¹	19,0	1,0	20,0
3 g.L ⁻¹	18,5	1,5	20,0
4 g.L ⁻¹	18,0	2,0	20,0
5 g.L ⁻¹	17,5	2,5	20,0
6 g.L ⁻¹	17,0	3,0	20,0

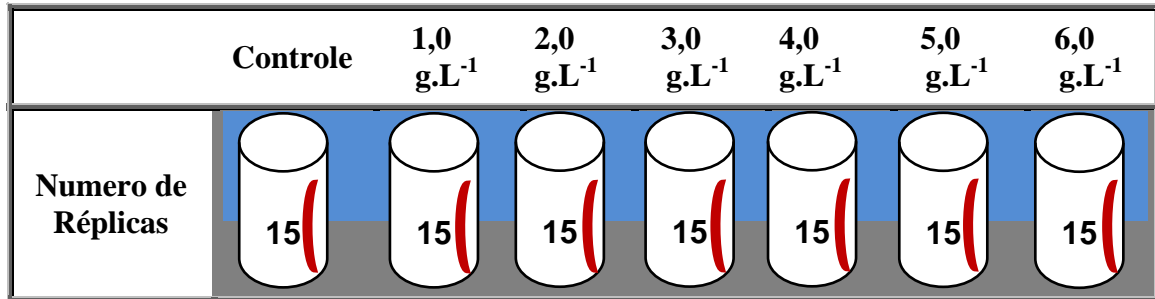


Figura 27 - Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) em larvas dos estágios II, III e IV.

Posteriormente estes recipientes foram acondicionados em bandejas de polipropileno e em seguida mensuradas as variáveis: pH, Oxigênio Dissolvido (mg.L⁻¹), Temperatura (°C), Condutividade (mS.cm⁻¹) e Dureza (mgCaCO₃.L), das concentrações: Controle, 1,0 g.L⁻¹, 3,0 g.L⁻¹ e 6,0g.L⁻¹.

Como alimento foi adicionado em cada recipiente, 200 µL da solução de ração de peixes TetraMin® Tropical Flakes (0,002 mg/mL de sólidos totais (ST) e 0,002 mg/mL de sólidos voláteis (SV)) somente no primeiro dia.

Com o intuito de deixar o ambiente o mais próximo possível do natural e evitar o fototropismo positivo que ocorre nas condições de cultivo, mas não existe em condições normais (COMAS,1928), estas bandejas foram cobertas com um pano preto e mantidos por 96 horas em sala climatizada com temperatura variando de 23 a 26 °C, sem fotoperíodo. Este processo está demonstrado na figura 28. Decorrido este período de exposição, foi realizada a contagem dos organismos mortos ou imóveis e novamente quantificados os valores das variáveis físicas e químicas.

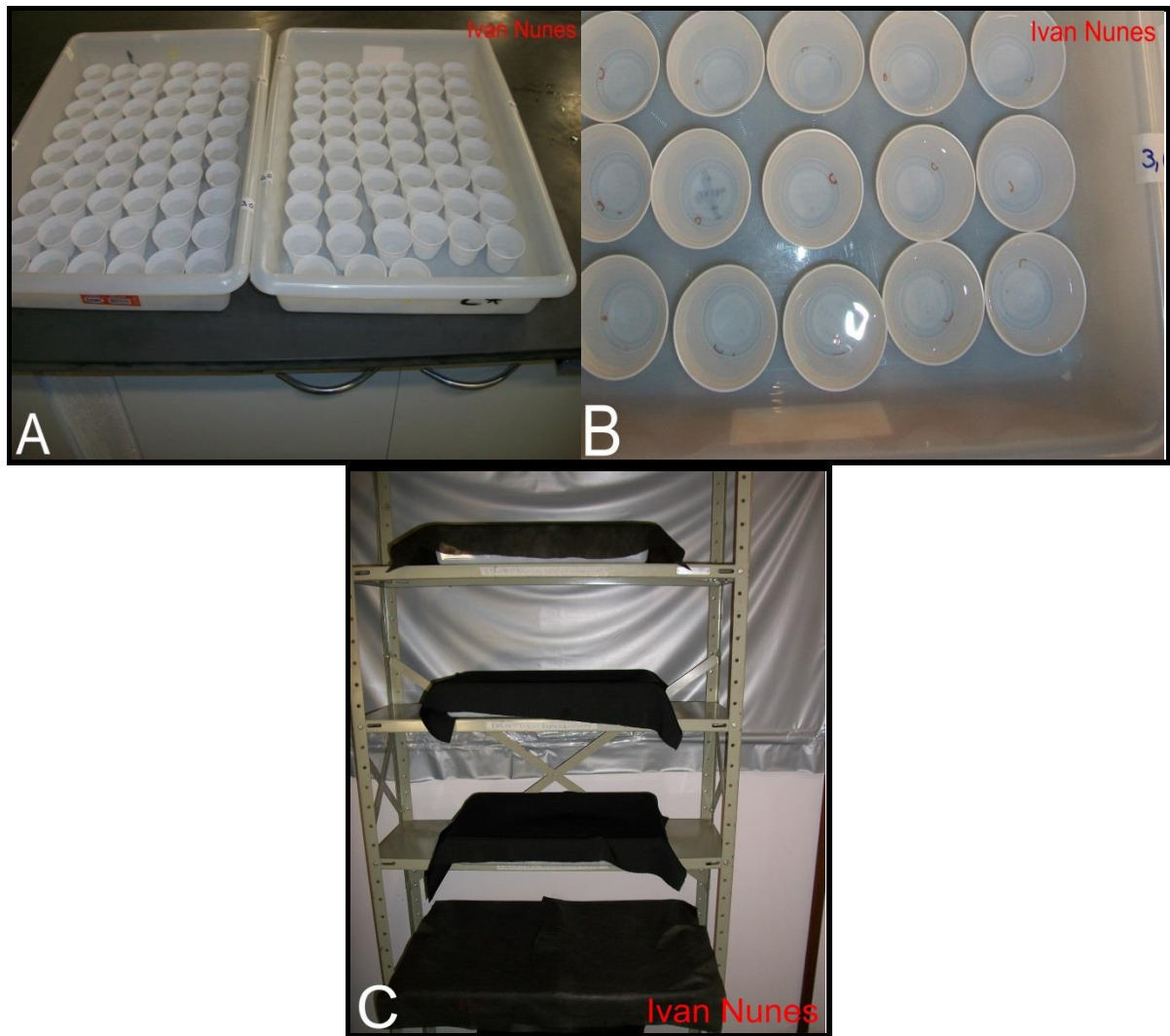


Figura 28 - Recipientes acondicionados na bandeja para o teste de sensibilidade separados por concentração (A). Larvas expostas nas concentrações desejadas (B). Bandejas cobertas e com pano preto e colocadas em sala com temperatura controlada (C).

Com o total de organismos mortos ou imóveis por concentração foi estabelecido os valores da concentração letal média (CL50), calculados por meio do programa computacional Trimmed Spearman – Karber (JSpear) (HAMILTON; RUSSO; THURSTON,1978).

Para estabelecer as faixas de sensibilidade, foi utilizado o modelo de carta controle proposto pela norma da USEPA 600/R99/064 (2000) para *C. tentans* e as Normas Brasileiras: NBR 12713 (2009) e NBR 13373 (2010) de *Daphnia spp.* e *Ceriodaphnia spp.*, respectivamente. Tais normas consistem em utilizar os valores médios de CL50 obtidos para cada estágio, no mínimo 5 resultados, mais ou menos duas vezes os desvios padrão ($\times 2DP$). Os resultados expressam o limite inferior e o limite superior da carta. Os valores de CL50 compreendidos dentro desta faixa são validados, indicando assim que as condições de cultivo estão adequadas e revelam o bom estado de saúde dos organismos, o que permitirá o uso dos mesmos nos ensaios ecotoxicológicos. Por outro lado os valores não compreendidos nesta

faixa, nos mostra uma deficiência no cultivo impossibilitando o uso daqueles organismos nos ensaios ecotoxicológicos.

4.2 - VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS MONITORADAS NOS ENSAIOS

Devido ao fato da água de diluição (água de cultivo) ser proveniente de uma fonte natural, a mesma foi monitorada a cada lote coletado. Ao todo foram utilizados 7 lotes de água para todos os ensaios para ambas as substâncias de referência (KCl e CdCl₂), com os diferentes estágios larvais de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), como mostra o anexo II.

A metodologia adotada para realizar estas medições estão descritas no quadro 2 a seguir.

Quadro 2 - Materiais e métodos utilizados para mensurar as variáveis: pH, condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dureza ($\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}$) nos ensaios com as substâncias de referência KCl e CdCl₂.

Variável	Equipamento	Marca	Modelo	Método
pH	pHmetro	Digimed®	DM - 20	–
Condutividade	Condutímetro	Alfa Mare®	mCa 150	–
Oxigênio Dissolvido	Multiparâmetros	InoLab®	Terminal Level 3	–
Temperatura	Condutímetro	Alfa Mare®	mCa 150	–
Dureza	–	–	–	Titulométrico (APHA, 2005).

4.3 - EFEITOS AGUDOS AO CLORETO DE CÁDMIO (CdCl₂)

Mediante os resultados obtidos com os diferentes estágios larvais expostos a substância KCl, e considerando o menor coeficiente de variação, bem como os resultados do teste ANOVA Tukey, foi selecionado o estágio II para ensaios de toxicidade aguda com CdCl₂.

As concentrações estabelecidas para estes ensaios foram baseadas no trabalho de Dornfeld (2006) que testou diferentes concentrações CdCl₂ em *C. xanthus*. Sendo assim, partindo de uma solução estoque de 0,1 g.L⁻¹ de CdCl₂ (ISO FAR®), foram preparadas as seguintes concentrações: 0,25 mg.L⁻¹; 0,50 mg.L⁻¹; 0,75 mg.L⁻¹ e 1,00 mg.L⁻¹, além do

tratamento controle, seguindo o mesmo método adotado nos ensaios com o KCl, com modificação na quantidade de indivíduos por concentração, que passou a ser de 10 organismos/200 mL de solução, como mostra figura 29 e Tabela 7.

As variáveis físicas e químicas também foram mensuradas de acordo com item 4.2.

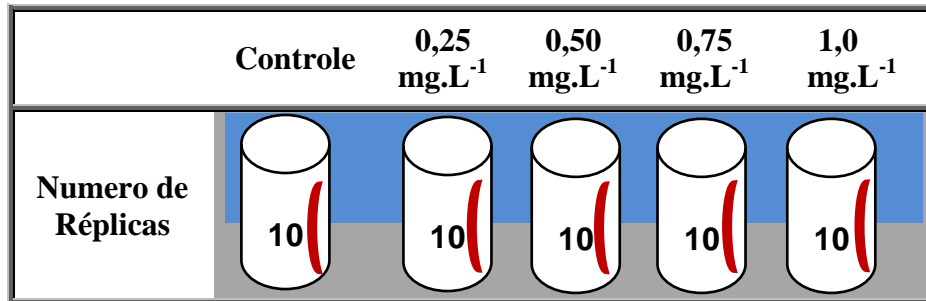


Figura 29 - Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de cádmio em larvas do estágio II.

Tabela 7 - Proporções de volumes para preparo das soluções – teste com CdCl_2

Padrões	Proporção		
	V (água de cultivo) mL	V1 (SE) mL	V (final)
Controle	20,00	0,0	20,0
0,25 mg.L^{-1}	19,95	0,05	20,0
0,50 mg.L^{-1}	19,90	0,10	20,0
0,75 mg.L^{-1}	19,85	0,15	20,0
1,0 mg.L^{-1}	19,80	0,20	20,0

Todo este procedimento está resumido no anexo I deste capítulo.

4.4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Utilizando o programa computacional BioEstat® 5.0 foram calculadas as seguintes variáveis da estatística descritiva: média, desvio padrão e o coeficiente de variação das medias dos valores de CL50 obtidas do 2º, 3º e 4º estágio testados com KCl. Essas médias também foram submetidas às análises de variância One – Way (ANOVA) com pós-teste Tukey (paramétrico) para comparação entre os diferentes estágios larvais. Estes valores juntamente com os valores do coeficiente de variação serviram de base na seleção de qual e/ou quais estágios devem ser utilizados nos ensaios com CdCl_2 .

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO CULTIVO POR MEIO DE ENSAIO DE SENSIBILIDADE COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl)

Na Tabela 8, estão demonstrados os valores de CL50 - 96h com seus respectivos intervalos confiança e os valores da análise estatística obtida para os estágios II, III e IV de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), quando submetidos às diferentes concentrações de KCl. Tais valores foram utilizados para elaborar as respectivas cartas controle (Figuras 30 a 32).

Observa-se que os resultados dos coeficientes de variação dos três estágios larvais apresentaram uma precisão analítica, uma vez que quase todos os valores de CL50 estão dentro dos limites permitidos pelo método. Tais resultados permitem inferir que o procedimento de cultivo laboratorial fornece um bom estado nutricional aos organismos, permitindo assim o uso dos mesmos nos ensaios ecotoxicológicos.

Observa-se que somente o resultado da CL50 obtida no 4º ensaio correspondente ao estágio III, está fora do limite inferior, o que significa que os organismos daquele lote não devem ser utilizados nos ensaios com amostras ambientais, uma vez que sua condição de saúde não está adequada.

Tabela 8 - Valores de CL50 – 96h g.L⁻¹ KCl e análise estatística das variáveis descritivas (desvio padrão, média e coeficiente de variação) obtidas nos testes de sensibilidade ao KCl, para os estágios II, III e IV de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

Número do Teste	Estágio II	Estágio III	Estágio IV
1	4,55 (4,06 - 5,12)	4,76 (4,37 - 5,19)	1,96 (1,17 - 3,29)
2	4,57 (4,18 - 5,02)	4,10 (3,31 - 5,09)	3,69 (2,91 - 4,70)
3	3,77 (2,98 - 4,78)	4,07 (3,69 - 4,50)	3,46 (2,92 - 4,16)
4	3,52 (2,74 - 4,55)	2,82 (2,18 - 3,66)	3,52 (2,93 - 4,24)
5	4,11 (3,54 - 4,79)	4,57 (4,19 - 4,99)	3,30
6	3,94 (3,44 - 4,53)	4,79 (4,39 - 5,24)	1,85 (0,90 - 3,81)
7	4,89 (4,56 - 5,24)	4,90 (4,41 - 5,46)	2,51 (2,22 - 2,86)
Média	4,19	4,29	2,90
Desvio Padrão	0,49	0,73	0,78
CV (%)	11,76	16,95	26,80

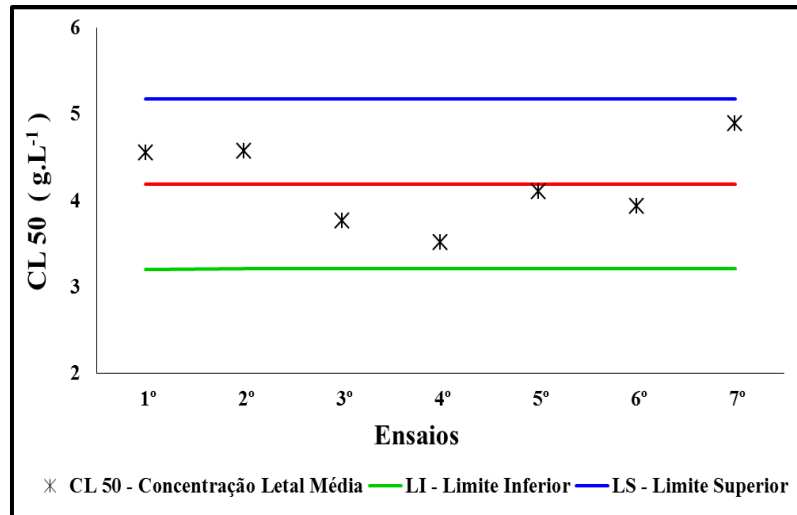


Figura 30 - Carta Controle obtida para organismos do estágio II de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), submetidos ao KCl.

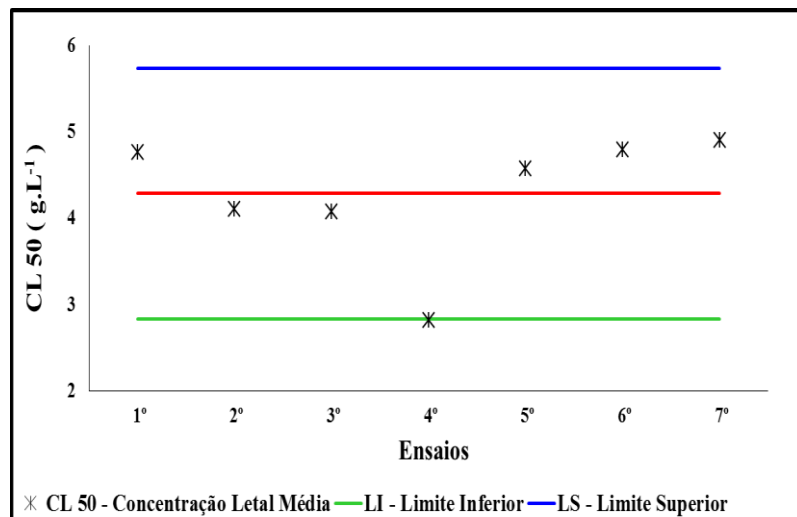


Figura 31 - Carta Controle obtida para organismos do estágio III de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), submetidos ao KCl.

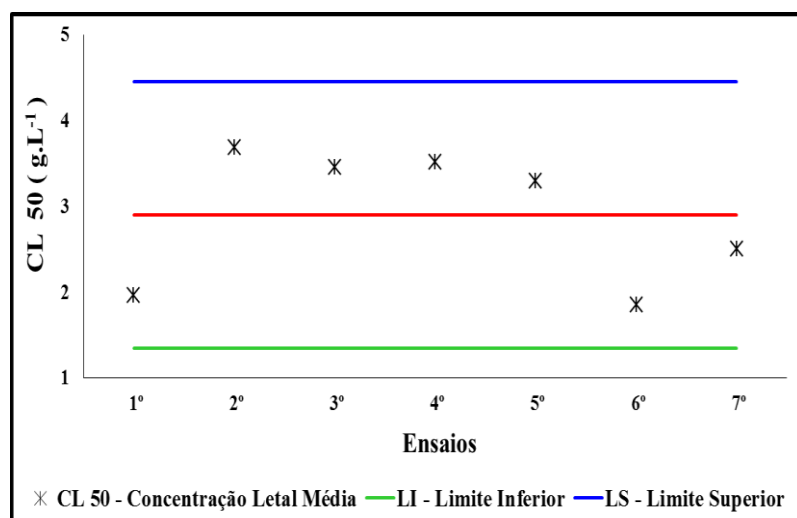


Figura 32 - Carta Controle obtida para organismos do estágio IV de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014), submetidos ao KCl.

Observando as curvas da concentração/resposta (Anexo - III), obtidas com o total dos organismos usados em todo o teste, podemos perceber que a menor quantidade de organismos sobreviventes em todos os ensaios foi na concentração de 6 g.L^{-1} de KCl, que obteve 5%, 7% e 5% de sobrevivência para os estágios II, III e IV, respectivamente.

Ainda sobre a curva concentração/resposta, com relação ao controle dos estágios II e III, a taxa de mortalidade registrada ficou em torno de 14 % e 13 %, respectivamente e para o estágio IV, 21%. Ambos os resultados estão fora no padrão estabelecido pela USEPA (2000) para *C. tentans*, onde os testes só devem ser aceitos se 90 % ou mais organismos do controle sobreviver e, portanto, deveriam ser descartados. Mas visto que se trata de uma espécie isolada dos trópicos e que no Brasil os testes de sensibilidade com *Chironomus* ainda estão em fase de estudo, e que o número de indivíduos utilizados foi maior ($n=15$), os ensaios foram considerados válidos. Também foi observado que as curvas dos estágios II e III não seguiram uma curva linear contínua, ou seja, a mortalidade registrada na concentração de 3 g.L^{-1} foi maior que na concentração 4 g.L^{-1} .

O resultado do teste One Way ANOVA com Pós Teste de Tukey ($F= 9,20$ e $p = 0,0021$), indicou as diferenças comparativas entre as médias dos estágios larvais (Tabela 9 e Figura 33) e mostrou similaridade entre os estágios II e III que podem ser usados nos testes ecotoxicológicos, já o estágio IV, mesmo tento apresentado uma sensibilidade menor, de $2,90 \text{ g.L}^{-1}$, se mostrou inapropriado e, portanto, foi descartado. Uma vez que as larvas neste estágio empulpam durante o ensaio, o que dificulta a leitura e pode gerar um resultado falso-positivo.

Tabela 9 - Diferença comparativa entre as médias de CL50 para os estágios larvais, II, III e IV obtidas nos ensaios de sensibilidade com KCl pelo teste de Tukey (ANOVA) $p < 0,01$.

	Diferença entre as Médias	p-Valor
II e III	0,094	0,963
II e IV	1,29	0,006
III e IV	1,38	0,003

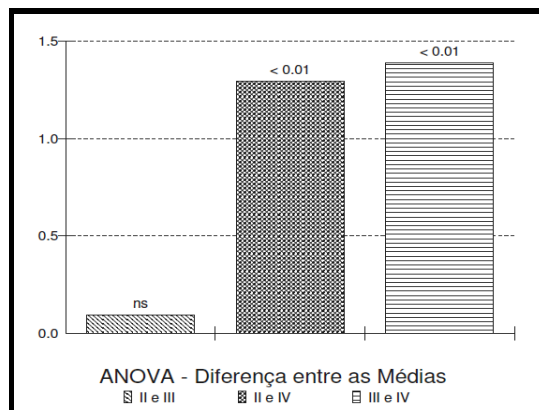


Figura 33 - Valores do teste de Tukey (ANOVA) $p < 0,01$.

Analisando os resultados dos testes de sensibilidade com KCl dos estágios II e III, observamos que ambos são sensíveis a esta substância, sendo o estágio II (CL50 médio = 4,19 g.L⁻¹) similar ao estágio III (CL50 médio = 4,29 g.L⁻¹). Os resultados obtidos no presente trabalho não mostram uma variação expressiva quando comparados aos valores de *C. xanthus* encontrados por Fonseca (1997) onde a CL50 média obtida foi de 4,5 g.L⁻¹ e faixa e sensibilidade de 2,6 e 6,4 g.L⁻¹, para o estágio III. Mas diferem quando comparado aos valores obtidos por Dornfeld (2006) onde a CL50 foi de 5,15 g.L⁻¹ (3,39 a 6,38 g.L⁻¹) para o estágio III. O mesmo acontece quando estes valores são comparados aos valores de *C. tentans* (BURTON et al., 1996) onde a CL50 foi de 5,4 g.L⁻¹ e o intervalo de sensibilidade de 3,6 a 6,6 g.L⁻¹, para o mesmo estágio III.

Almeida (2002) em seu estudo com o mesmo *C. xanthus* estimou a faixa de sensibilidade ao KCl entre 2,83 e 4,1 g.L⁻¹ e Viveiros (2012) com *C. sancticaroli* obteve a concentração letal média de 4,48 g.L⁻¹ (3,14 – 5,82).

5.2 - VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS MONITORADAS NOS ENSAIOS

Os valores médios das variáveis físicas e químicas monitoradas durante estes ensaios para os estágios II, III e IV estão descritos na tabela 10 a seguir.

Tabela 10 - Leitura e estatísticas descritivas das variáveis pH, temperatura (°C), condutividade (mS.cm⁻¹), oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) e Dureza (mg CaCO₃.L) obtidas nos ensaios de toxicidade aguda com KCl.

		ESTÁGIO II									
		pH		OD (mg.L ⁻¹)		Temp. (°C)		Condutividade (mS.cm ⁻¹)		Dureza (mgCaCO ₃ .L)	
		Inicial	Final	Inicia I	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicia I	Final
Controle		7,43	7,75	7,79	7,73	22,83	23,53	0,08	0,11	50,00	45,42
	(DP)	0,14	0,10	0,36	0,71	0,33	0,80	0,00	0,01	9,43	2,95
1 g.L ⁻¹		7,31	7,75	8,25	8,35	22,40	22,60	2,30	2,28	42,50	43,33
	(DP)	0,09	0,11	0,44	0,80	0,42	1,25	0,53	0,69	4,12	4,71
3 g.L ⁻¹		7,37	7,64	8,28	8,38	22,97	22,57	3,38	4,85	40,00	46,67
	(DP)	0,01	0,08	0,48	1,08	0,33	1,41	0,18	0,47	4,71	1,18
6 g.L ⁻¹		7,17	7,60	8,18	8,32	23,90	22,67	6,07	7,68	42,50	36,67
	(DP)	0,14	0,41	0,53	0,83	0,16	1,34	0,18	0,37	3,54	8,25

Continua pg. 94

Contunuação Tabela 10.

ESTÁGIO III										
Controle	7,70	7,74	7,34	7,71	24,17	24,72	0,09	0,11	38,33	50,83
(DP)	0,25	0,13	1,49	0,17	0,28	0,40	0,01	0,00	2,36	1,18
1 g.L ⁻¹	7,69	7,56	6,35	7,69	23,77	25,00	1,82	1,95	41,67	51,67
(DP)	0,01	0,21	1,56	0,07	1,01	0,75	0,06	0,08	1,18	1,18
3 g.L ⁻¹	7,48	7,85	6,37	7,75	23,80	25,00	3,88	3,32	45,00	43,33
(DP)	0,11	0,07	1,58	0,06	0,64	0,82	0,34	0,67	7,07	1,18
6 g.L ⁻¹	7,49	7,67	6,41	7,41	23,80	25,00	6,32	6,94	36,67	50,00
(DP)	0,01	0,05	1,58	0,24	0,47	0,71	0,17	0,06	7,66	1,18
ESTÁGIO IV										
Controle	7,52	7,65	6,28	7,59	23,97	25,00	0,09	0,11	36,67	50,00
(DP)	0,40	0,03	0,23	0,68	0,42	1,91	0,00	0,00	4,14	4,71
1 g.L ⁻¹	7,69	7,56	6,35	7,69	23,77	25,00	1,82	1,95	41,67	51,67
(DP)	0,40	0,09	0,30	0,35	0,38	2,33	0,14	0,13	10,61	12,96
3 g.L ⁻¹	7,36	7,75	7,60	6,84	23,43	24,57	3,12	4,19	46,67	48,33
(DP)	0,34	0,16	0,46	0,46	0,75	2,59	0,06	1,01	9,43	7,07
6 g.L ⁻¹	7,49	7,67	6,41	7,41	23,80	25,00	6,32	6,94	36,67	50,00
(DP)	0,32	0,02	0,46	0,28	0,94	2,24	0,52	0,14	8,25	7,07

Podemos observar que não houve grandes variações nos parâmetros analisados entre as etapas inicial e final dos ensaios. As maiores variações estão registradas para oxigênio dissolvido e temperatura nos ensaios com os estágios III e IV. A avaliação destes parâmetros ajuda a entender como o contaminante pode interferir no metabolismo ou na fisiologia do organismo-teste causando algum dano ou até mesmo a morte.

Segundo Stockmann (2010) variações no pH é um dos motivos das mortalidade dos organismos no meio aquático, uma vez que essas variações podem inibir o transporte do oxigênio. De acordo com Peres (2008) citado pelo mesmo autor, quanto mais alto o pH, maior a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

Arana (2004) diz que o pH é um dos parâmetros mais importantes no meio aquático podendo ser a causa de muitos fenômenos químicos e biológicos, já que o metabolismo de qualquer sistema biológico é dependente do pH.

Já o oxigênio dissolvido (OD) é de grande importância para os organismos aeróbios aquáticos, sendo considerado como a principal variável para a caracterização dos efeitos da poluição das águas por elementos orgânicos. Além de afetar a vida aquática, este parâmetro afeta também os processos biogeoquímicos dos organismos (GUIMARÃES et al., 2004).

Já a temperatura, de acordo com Tavares e Rocha (2001), é um fator de grande relevância nos sistemas aquáticos, pois exerce grande influência sobre as propriedades físicas

e químicas da água, interferindo em fatores como a tensão superficial, viscosidade, densidade, solubilidade e as trocas gasosas. Além de interferir nos processos fisiológicos do organismo, afetando sua taxa de sobrevivência.

Arana (2004) comenta que o aumento da temperatura da água provoca um aumento da atividade metabólica e fisiológica dos organismos consumindo mais oxigênio, o que pode ser evidenciado no presente trabalho. A variação encontrada está relacionada com as oscilações da temperatura da sala de cultivo onde o teste foi mantido.

Já a variação encontrada na condutividade, se deve ao KCl, já que esta substância é um sal que quando adicionado em água aumenta a condutividade elétrica. A variação nos valores de condutividade pode afetar o processo de osmorregulação dos organismo (ESTEVES, 2011).

Já a dureza está relacionada com a concentração de íons, principalmente pela presença de sais de cálcio e magnésio (bicarbonatos, sulfatos, cloretos e nitratos), embora possa haver zinco, estrôncio, ferro ou alumínio como contribuintes (ADAD, 1982).

A água é classificada como “mole” (poucos minerais dissolvidos) ou "dura" (muitos minerais dissolvidos), No presente trabalho o valor de dureza dos ensaios pode ser considerada como muito mole já que os valores estão compreendidos dentro do valor de 0 a 70 mgCaCO₃.L. Variações na dureza podem afetar na manutenção dos exoesqueleto do organismo teste (STOCKMANN, 2010).

Nos anexos IV, V, VI, VII, VIII e X estão as tabelas e gráficos dos valores destas variáveis físicas e químicas obtidas nos diferentes lotes de água de cultivo coletados.

5.3 - EFEITOS AGUDOS AO CLORETO DE CÁDMIO (CdCl₂).

Com base nos valores do teste Tukey, tanto o estágio II quanto o III poderiam ser utilizados nos ensaios de toxicidade aguda. Contudo, o estágio II ainda apresentou um menor coeficiente de variação (11,76%), quando comparado ao estágio III (16,95%), nos ensaios com KCl e, portanto, foi escolhido para os ensaios com CdCl₂

Os valores médios de CL50 obtidos neste ensaio, bem como a curva concentração/resposta estão demonstrados na tabela 11 e Figura 34. Já os valores das variáveis físicas e químicas obtidas estão descritas na tabela 12 a seguir.

Tabela 11 - Valores de CL50 – 96 h mg.L^{-1} CdCl_2 e análise estatística das variáveis descritivas obtidas nos testes de sensibilidade, para os estágio II de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO,2014).

Numero do Teste	Estágio II
1	0,90 (0,71 - 1,16)
2	0,62 (0,42 - 0,92)
3	0,71 (0,56 - 0,92)
4	0,78 (0,68 - 0,89)
5	0,28 (0,16 - 0,50)
6	0,35 (0,27 - 0,46)
Média	0,61
Desvio Padrão	0,24
CV (%)	40,34

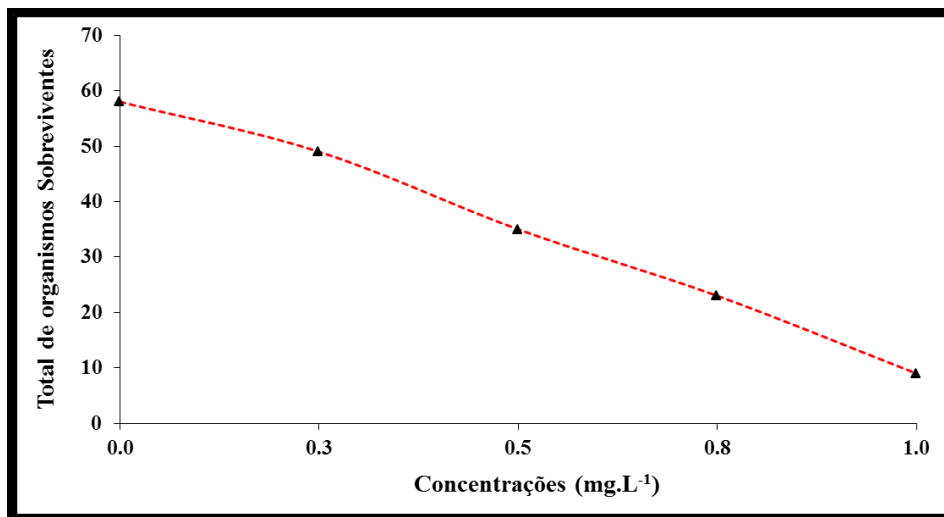


Figura 34 – Curva da concentração/resposta obtida para os organismos do estágio II de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO,2014), submetidos ao CdCl_2 .

Tabela 12 - Leitura e estatísticas descritivas das variáveis pH , temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade (mS.cm^{-1}), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e Dureza ($\text{mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}$) obtidas no ensaio de toxicidade aguda com CdCl_2 .

	pH		OD (mg.L^{-1})		Temp. ($^{\circ}\text{C}$)		Cond. (mS.cm^{-1})		Dureza ($\text{mgCaCO}_3\text{.L}^{-1}$)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,29	8,07	7,20	7,70	25,10	23,53	0,07	0,12	45,00	58,33
(DP)	0,11	0,15	0,05	0,09	0,20	0,23	0,00	0,00	5,00	12,58
0,25 mg.L^{-1}	7,73	8,32	7,08	7,75	24,80	23,57	0,08	0,13	43,33	48,33
(DP)	0,10	0,04	0,10	0,07	0,00	0,06	0,00	0,00	5,77	2,89
0,50 mg.L^{-1}	7,79	8,32	6,96	7,81	24,85	23,73	0,08	0,12	42,50	46,67
(DP)	0,04	0,04	0,01	0,04	0,21	0,06	0,00	0,01	10,61	2,89

Continua pg. 97.

Continuação tabela 12.

0,75 mg.L ⁻¹	7,85	8,20	7,01	7,63	24,57	24,17	0,08	0,13	45,00	61,67
(DP)	0,04	0,01	0,02	0,33	0,21	0,06	0,00	0,01	0,00	12,58
1,00 mg.L ⁻¹	7,85	8,31	6,98	8,03	24,87	24,37	0,08	0,12	41,67	65,00
(DP)	0,05	0,01	0,05	0,01	0,06	0,12	0,01	0,01	2,89	10,00

Observando a curva da concentração/resposta obtida através do total dos organismos usados em todo o teste, observa-se que a menor sobrevivência (15%) foi na concentração de 1mg.L⁻¹ de CdCl₂. Já com relação ao tratamento controle, a taxa de mortalidade registrada ficou em torno de 3%, indicando um bom estado de saúde dos organismos.

Com relação ao cloreto de cádmio podemos observar que a CL50 média obtida (0,61 mg.L⁻¹) foi similar ao encontrado por Dornfeld (2006) para o *C. xanthus* (0,70 mg.L⁻¹). Valores estes bem abaixo dos obtidos por Suedel e outros (1997) para *C. tentans* (CL50 = 8,0 mg.L⁻¹) e por Fargasova (2001) para *C. plumosus* (CL50 = 10,0 mg.L⁻¹) e acima dos resultados apresentados por Postma e outros (1994) para *C. riparius*, (CL50 = 0,0162 mg.L⁻¹) e por Oliver e outros (2003) para *C. calligraphus* Goeldi (CL50 = 0,132 mg.L⁻¹). Portanto *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) mostrou-se relativamente sensível ao cloreto de cádmio.

De acordo Pascoe e outros. (1989) os Chironomidae são relativamente tolerantes aos metais pesados, como o cádmio.

Postma (1995) diz que essa tolerância adquirida por metais possui base genética e tem sido utilizada por muitas espécies animais, incluindo alguns dípteros, mais os mecanismos fisiológicos responsáveis por este processo ainda são pouco conhecidos e estão relacionados com a indução de proteínas que se ligam aos metais e a formação de grânulos que contém esse metal.

Mesmo com esta tolerância, a presença destes metais pesados, podem ainda causar mudanças morfológicas, fisiológicas, genéticas e comportamentais nestes organismos. Segundo Janssens de Bisthoven (1998) citado por Dornfeld (2006) existe uma redução e atraso na emergência de adultos de *Chironomus* quando as larvas são expostas a sedimentos contendo altas concentrações de Cd, Zn e Cr. Além disso, outros efeitos podem ser observados tais como: atraso no desenvolvimento, baixa capacidade reprodutiva e deformidades. A diminuição no crescimento e reprodução são consequências de uma ruptura bioquímica devido à exposição ao contaminante (DORNFELD, 2006).

Sildanchandra e Crane (2000) confirmaram em seu estudo com *C. riparius* que o sedimento contaminado com altas concentrações de Cd pode reduzir a sobrevivência,

crescimento, desenvolvimento e emergência do organismo.

Com relação às variáveis físicas e químicas (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza) monitoradas durante os ensaios, podemos perceber um aumento significativo nas variáveis: temperatura, pH e dureza. Segundo Benaduce (2005) a qualidade dos parâmetros físicos e químicos da água pode interferir na toxicidade do metal testado. O aumento do pH, por exemplo, pode reduzir a toxicidade de alguns metais como o Cromo (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO 2006). Já quanto maior a temperatura maior é a toxicidade do cádmio e quanto maior a dureza da água menor a toxicidade (BENADUCE, 2005). A tabela e os gráficos dos valores das variáveis físicas e químicas do lote 7 da água de cultivo utilizada neste ensaio encontram-se anexo IX.

6 - CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos no presente estudo podemos indicar o uso potencial de *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014) como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos com amostras de sedimentos contaminados, após a devida confirmação taxonômica, bem como o uso de outras substâncias de referência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAD, J. M.T. **Controle químico de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois S. A., 1982.
- ALEGRE, G. F. **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do Rio Tietê, entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP**. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALMEIDA, C. A. **Aspectos do ciclo de vida de espécies bentônicas nativas e sua utilização na avaliação da qualidade de sedimentos de lagos naturais e reservatórios**. 2007. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)-Universidade de São Paulo, São Paulo 2007.
- ALMEIDA, C. A. **Estudo ecotoxicológica do sedimento de represa do rio Tietê com organismo-teste bentônico: *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera)**. 2002. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Philadelphia. 2000.
- ANDRÉA, M.M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos, 2008, Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83> Acesso em 15 JUL. 2013.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21^a ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10664: Águas – Determinação de resíduos (sólidos) – Método Gravimétrico**. Rio de Janeiro, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13343: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp**. Rio de Janeiro, 2010.
- BERNADUCE, A. P. S. **Toxicidade do Cádmio em Embriões e Larvas de *Rhamdia quelen* (heptapteridae) em Diferentes Alcalinidades da Água**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- BERTOLETTI, E. Aspectos Relativos ao Controle da Sensibilidade de Organismos Utilizados em ensaios ecotoxicológicos, Disponível em:
<www.ecologia.ufrgs.br/alex/abnt/TEXTO%20SENSIBILIDADE.doc> Acesso em 16 JUL. 2014.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 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. Diário Oficial da União Nº 053, Brasília, p. 58-63, 18 mar 2005.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as 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. Diário Oficial da União Nº 092, Brasília, p. 89, 13 mai 2011.

BORGES, P.P.; SOBRAL, S. P.; SILVA R. S.; BANDEIRA, R. D. C. C. Caracterização da pureza do padrão primário de cloreto de potássio por coulometria a corrente constante e cromatografia iônica, 2011. Disponível em:

< <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T3281-2.pdf>> Acesso em: 15 JUL. 2013.

BOSSUYT, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. **Environmental Pollution**, v. 136, p.145-154, 2005.

BURTON, G.A, Jr. Assessing the toxicity of freshwater sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, p. 1585-1627, 1991.

BURTON, G. A.; NORBERG-KING, T. J.; INGERSOLL, J. M.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T.; WINGER, P. V.; KUBITZ, J.; LAZORCHAK, J. M.; SMITH, M. E.; GREER, E.; DWYER, F. J.; CALL, D. J.; DAY, K. E. Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 1335-1343,1996.

CALLISTO, M; ESTEVES, F. Biomonitoramento da macrofauna bentônica de Chironomidae (Diptera, Insecta) em dois igarapés amazônicos sob influência das atividades de uma mineração de bauxita. **Oecologia Brasiliensis**, v. 5, p. 299-309, 1998.

CALLISTO, M.; GONÇALVES Jr., J. F.; MORENO, P. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. Disponível em:

< http://www.manuelzao.ufmg.br/assets/files/Biblioteca_Virtual/invertaquaticos.pdf> Acesso 15 JUL. 2013.

CARDOSO, L. M. N.; CBASIN, A. M. Ecotoxicologia do Cádmio e seus Compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, v. 6, 2001.

CARVALHO, A. E. F; SILVA, E. M. F; MATSUBARA, K. G; LEONEL, L. F; MONZANE, P.V. G; SASAKI, T. H. Avaliação ecotoxicológica de ecossistemas aquáticos da bacia hidrográfica do rio Itaqueri (Itirapina/Brotas, SP): uma análise espacial Disponível em:< <http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A2-158.pdf>> Acesso 24 OUT. 2012.

CAVALCANTI, V. A. **Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis***. 2010.78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública)-FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

COMAS, M. **Contribución al conocimiento de la biología de *Chironomus* y de su parásito *Paramermis contorta*** . Museo nacional de ciencias naturales, Madrid, 1928.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL **Relatório de qualidade das águas interiores de São Paulo**. Relatório da Diretoria de Controle da Poluição do Interior, CETESB, São Paulo, 2010 213 p.

CORRÊA, P.F. **Importância da avaliação ecotóxica de sedimentos aquáticos como ferramenta na perícia ambiental judicial**. 2011. 41 f. Monografia (Especialista em Auditoria e Perícia Ambiental)-Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2011.

COSTA, C. R. C.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.R.; ESPINDOLA, E. L. G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820 – 1830, 2008.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microrganismos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology** v. 1, p. 63-66, 2006.

DORNFELD, C. B. **Utilização de *Chironomus* sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais.** 2006. 239 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

EMYGDIO, S.A.B. **Efeito de cianotoxinas cilindrospermopsina e microcistina sobre aspectos do ciclo de vida de *chironomus xanthus* (diptera, chironomidae).** 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.)-Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2011.

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

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant,** report EPS 1/RM/30, 1995

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FAO. **United Nations Population Division World Population Prospects 1950-2050: The 2000 Revision.** United Nations, New York. 2003. Disponível em: <www.fao.org/ag/agl/aglw/aquasat/main/> Acesso em: Acesso em 15 JUL. 2013.

FARGASOVA A. Winter third- to fourth- instar larvae of *Chironomus plumosus* as bioassay tools for assessment of acute toxicity of metals and their binary combinations. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 48, p. 1-5. 2001.

FONSECA, A. L., ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rampel, 1939 (Diptera, Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia,** v. 16, n. 2, p. 153-161. 2004.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba /SP através de testes de toxicidade com invertebrados.** 1997. 222 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

FAO. **United Nations Population Division World Population Prospects 1950-2050: The 2000 Revision.** United Nations, New York. 2003. Disponível em: <www.fao.org/ag/agl/aglw/aquasat/main/> Acesso em: Acesso em 15 JUL. 2013.

GUIMARÃES, E. S.; LACAVA, P. M.; MAGALHÃES, N. P. Avaliação da toxicidade aguda com *Daphnia similis* na água captada no Rio Paraíba do Sul e processada na Estação de Tratamento de Água do município de Jacareí - SP – Brasil. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental,** v. 9, n. 2, p. 124-130, 2004.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. 1977. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology.** v. 12, n. 4, p. 714-719, 1978.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURNTON Jr., G. A.; CAIRNS Jr., J. **Handbook of Ecotoxicology.** 2ª ed. Florida: CRC Press, 2003. 1315p.

IHARA, P. M. **Aplicação de Ensaio Ecotoxicológicos com Diferentes Organismos-Testes na Determinação da Toxicidade da Água Produzida.** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica)-Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

JARDIM, W.F. A contaminação dos recursos hídricos por esgoto doméstico e industrial. **Química Nova**, v. 15, p. 144-146, 1992.

KNAPIK, L. F. O.; ANDREATTA, M. **Avaliação de Toxicidade de Três Substâncias de Referência ao Microcrustáceo *Daphnia magna***. 2013. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Processos Ambientais)-Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: Ed Fatma, 2004. 288 p.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MENDES, H. F.; PINHO, L. C. Diptera: Chironomidae. 2006. <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/chironomidae/chiroin dex.htm> In: Levantamento e biologia de Insecta e Oligochaeta aquáticos de sistemas lóticos do Estado de São Paulo, <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce>. [Atualização: Setembro 2008 (em construção)].

MUNIZ, D. H. F.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Metais Pesados Provenientes de Rejeitos de Mineração e seus Efeitos sobre a Saúde e o Meio Ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 4, n. 1 / 2, p. 83-100, 2006.

OLIVER, J. A. I.; CAPCHA, N. S.; FLORES, L. A. Variabilidad Del Ensayo Ecotoxicológico Con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para Evaluar Cadmio, Mercurio y Plomo. **Ecologia Aplicada**. v. 2, n. 1. 2003.

PENIDO, J.S. **Estudos Ecotoxicológicos da água e do sedimento do ribeirão Limeira (Piquete/Lorena, SP)**. 2010. 148 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

POSTMA J.F.; BUCKERT DE JONG M.C.; STAATS N.; DAVIDS C. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. **Arch. Environmental Contamination and Toxicology**. v. 26, p. 143-148. 1994.

POSTMA, J.F.. Adaptation to metals in the midge *Chironomus riparius*. Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands, 1995. 156p.

PASCOE, D.; WILLIAMS, K.A.; GREEN, W.J. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* Meigen - effects upon larval development and adult emergence. **Hydrobiologia**. v. 175, p. 109-115. 1989.

QUEIROZ, J. F.; TRIVINHO-STRIXINO, S.; NASCIMENTO, V. M. C. Organismos Bentônicos Bioindicadores da Qualidade das Águas da Bacia do Médio São Francisco. **Comunicado Técnico**. Embrapa Meio Ambiente, 2000.

SILDANCHANDRA, W.; CRANE, M. Influence of sexual dimorphism in *Chironomus riparius* Meigen on toxic effects of cadmium. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.19, n. 9, p. 2309-2313. 2000.

SILVA, F. L.; RUIZ, S. S.; MOREIRA, D. C.; BOCHINI, G. L. Composição e Diversidade de Imaturos de Chironomidae (Insecta, Diptera) no Ribeirão dos Peixes, Dois Córregos, SP. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 4, p. 341-346. 2008.

STOCKMANN, C. **A Influência do pH e da Dureza sobre a Inibição do Ciclo de Vida do Microcrustáceo *Moina micrura* (Kurz, 1874) em um Tanque de Decantação**. 2010. 72 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SUEDEL, B.C.; RODGERS JR, J.H.; DEEVER, E. Experimental factors that may affect toxicity of Cadmium to freshwater organisms. **Archives Environmental Contamination Toxicology**. v. 33. p. 188–193. 1997.

TAVARES, L.H.S.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos**. São Carlos: RIMA, 2001. 106 p.

TRIVINHO-STRIXINO, S.; STRIXINO, G. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino; Strixino, (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, p.183-189. 1982.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **USEPA/600/R-94/064**: Methods for measuring toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Washington, 2000.

VIVEIROS, W. **Chironomus Sancticaroli – do Cultivo em Laboratório ao Ensaios Ecotoxicológicos com Amostras Ambientais de Sedimento**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais)-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI. E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2ª ed. São Paulo: RIMA , 2006. 464 p.

ANEXO I - Requisitos e Condições necessárias para Realização de Ensaio de Toxicidade Aguda ao Cloreto de Potássio (KCl) e Cloreto de Cádmio (CdCl₂) com *Chironomus affinis xanthus* (PINHO, 2014).

REQUISITOS	CONDIÇÕES
Tipo de Teste	Água
Espécie	<i>Chironomus affinis xanthus</i> (PINHO, 2014)
Tipo de Ensaio Estático	96h.
Substâncias	KCl e CdCl ₂
Idade de Organismo - teste	II e III Estágio
Água de Diluição	Água de Cultivo
Volume da Solução – Teste por organismo	20 mL
Numero mínimo de concentrações	6 além do controle e/ou 4 além do controle
Numero mínimo de réplicas por diluição	10
Numero mínimo de organismos por diluição	1
Câmara de Teste	Copos de polipropileno de 30 mL
Alimentação	200 µL da solução de ração de peixes TetraMin® Tropical Flakes (0,002 mg.mL de sólidos totais (ST) e 0,002 mg.mL de sólidos voláteis (SV)).
Aeração	Nunca
Temperatura do Ambiente	23°C a 26°C
Fotoperíodo	Escuro
Parâmetros Mensurados no Início e Fim do Teste	pH, Oxigênio Dissolvido, Temperatura, Condutividade e Dureza
Limpeza da câmara de ensaio	Nunca
Troca da Água	Nunca
Efeito observado	Imobilidade ou mortalidade
Nível de aceitação do Teste	85 % de sobrevivência do controle (<u>Organismo em fase de teste</u>)

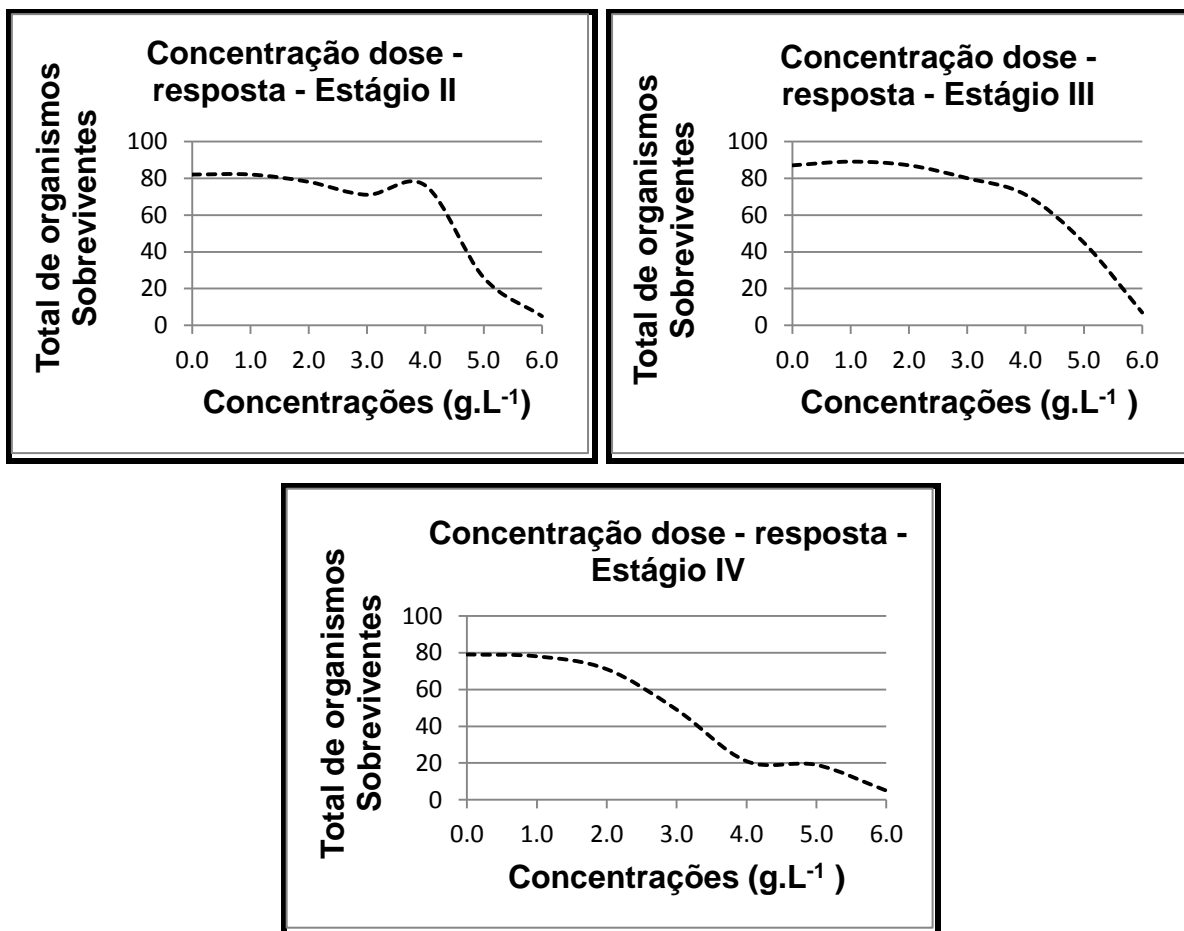
ANEXO II - Ensaio realizados com KCl.

Nº do Ensaio	Data da coleta do Lote	Lote / Nº	Data Montagem do Ensaio	Leitura	Ensaio C/ Estágio
1	10/11/2013	2	15/11/2013	19/11/2013	II
2	10/11/2013	2	16/11/2013	20/11/2013	III
3	16/11/2013	3	20/11/2013	24/11/2013	II
4	16/11/2013	3	21/11/2013	25/11/2013	II
5	01/12/2013	4	06/12/2013	10/12/2013	II
6	01/12/2013	4	07/12/2013	11/12/2013	III
7	01/12/2013	4	10/12/2013	14/12/2013	IV
8	16/12/2013	5	23/12/2013	27/12/2013	III
9	16/12/2013	5	23/12/2013	27/12/2013	III
10	06/01/2014	6	11/01/2014	15/01/2014	II
11	06/01/2014	6	11/01/2014	15/01/2014	II
12	06/01/2014	6	11/01/2014	15/01/2014	II
13	06/01/2014	6	13/01/2014	17/01/2014	III
14	06/01/2014	6	13/01/2014	17/01/2014	III
15	06/01/2014	6	13/01/2014	17/01/2014	III
16	06/01/2014	6	15/01/2014	19/01/2014	IV
17	06/01/2014	6	15/01/2014	19/01/2014	IV
18	06/01/2014	6	15/01/2014	19/01/2014	IV
19	12/02/2014	8	21/02/2014	25/02/2014	IV
20	12/02/2014	8	21/02/2014	25/02/2014	IV
21	12/02/2014	8	21/02/2014	25/02/2014	IV

Ensaaios realizados com CdCl₂.

Nº do Ensaio	Data da coleta do Lote	Lote / Nº	Data Montagem do Ensaio	Leitura	Ensaio C/ Estágio
1	23/01/2014	7	28/01/2014	01/02/2014	II
2	23/01/2014	7	28/01/2014	01/02/2014	II
3	23/01/2014	7	28/01/2014	01/02/2014	II
4	23/01/2014	7	28/01/2014	01/02/2014	II
5	12/02/2014	8	16/02/2014	20/02/2014	II
6	12/02/2014	8	16/02/2014	20/02/2014	II

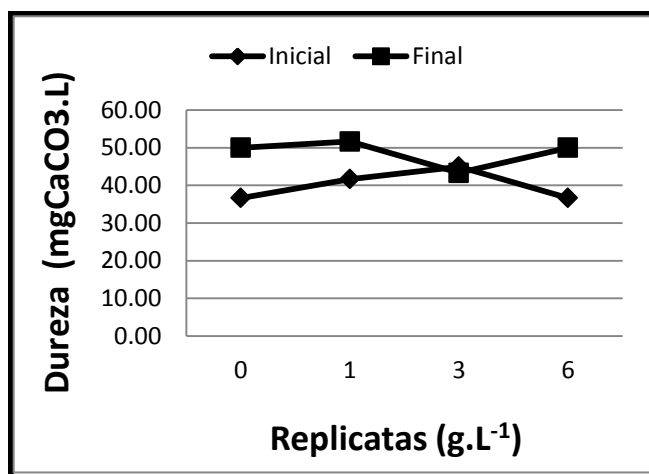
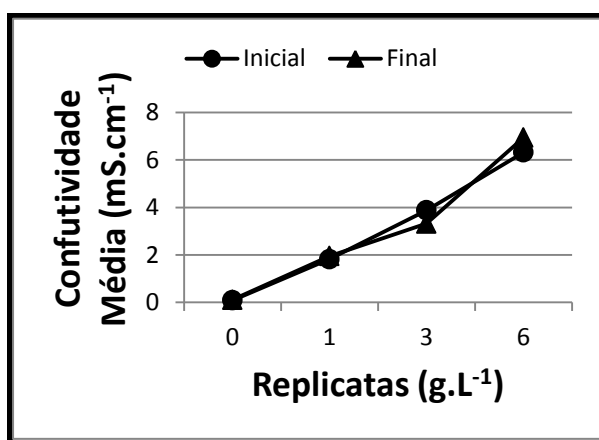
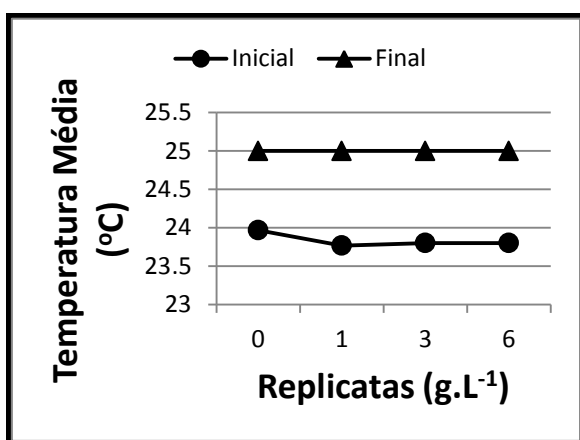
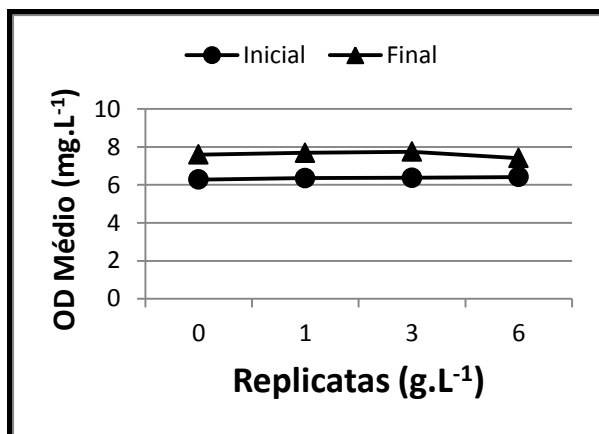
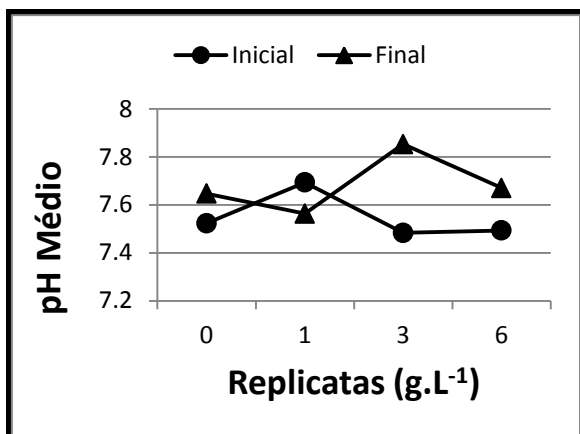
ANEXO III - Gráficos: Concentração/resposta.



ANEXO IV - Análises físicas – químicas do lote 2.

	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mg CaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	7,41	7,82	6,16	7,40	24,00	25,00	0,09	0,11	35,00	50,00
Controle (2)	7,57	7,42	6,30	7,65	24,00	25,00	0,09	0,11	35,00	50,00
Controle (3)	7,59	7,70	6,38	7,73	23,90	25,00	0,09	0,10	40,00	50,00
Min	7,41	7,42	6,16	7,40	23,90	25,00	0,09	0,10	35,00	50,00
Máx	7,59	7,82	6,38	7,73	24,00	25,00	0,09	0,11	40,00	50,00
Média	7,52	7,65	6,28	7,59	23,97	25,00	0,09	0,11	36,67	50,00
Desvio padrão	0,10	0,21	0,11	0,17	0,06	0,00	0,00	0,01	2,89	0,00
CV (%)	1,31	2,68	1,77	2,27	0,24	0,00	0,00	5,41	7,87	0,00
1 g.L ⁻¹ (1)	7,63	7,51	6,35	7,51	23,80	25,00	1,67	1,91	40,00	50,00
1 g.L ⁻¹ (2)	7,72	7,51	6,39	7,86	23,70	25,00	1,95	1,98	45,00	55,00
1 g.L ⁻¹ (3)	7,73	7,67	6,32	7,70	23,80	25,00	1,85	1,96	40,00	50,00
Min	7,63	7,51	6,32	7,51	23,70	25,00	1,67	1,91	40,00	50,00
Máx	7,73	7,67	6,39	7,86	23,80	25,00	1,95	1,98	45,00	55,00
Média	7,69	7,56	6,35	7,69	23,77	25,00	1,82	1,95	41,67	51,67
Desvio padrão	0,06	0,09	0,04	0,18	0,06	0,00	0,14	0,04	2,89	2,89
CV (%)	0,72	1,22	0,55	2,28	0,24	0,00	7,78	1,85	6,93	5,59
3 g.L ⁻¹ (1)	7,42	7,79	6,45	7,61	23,80	25,00	3,70	3,24	45,00	45,00
3 g.L ⁻¹ (2)	7,55	7,87	6,38	7,78	23,80	25,00	3,99	3,67	45,00	40,00
3 g.L ⁻¹ (3)	7,48	7,90	6,29	7,85	23,80	25,00	3,94	3,05	45,00	45,00
Min	7,42	7,79	6,29	7,61	23,80	25,00	3,70	3,05	45,00	40,00
Máx	7,55	7,90	6,45	7,85	23,80	25,00	3,99	3,67	45,00	45,00
Média	7,48	7,85	6,37	7,75	23,80	25,00	3,88	3,32	45,00	43,33
Desvio padrão	0,07	0,06	0,08	0,12	0,00	0,00	0,16	0,32	0,00	2,89
CV (%)	0,87	0,72	1,26	1,59	0,00	0,00	4,00	9,57	0,00	6,66
6 g.L ⁻¹ (1)	7,49	7,66	6,45	7,61	23,80	25,00	6,27	6,77	35,00	50,00
6 g.L ⁻¹ (2)	7,51	7,68	6,42	7,29	23,80	25,00	6,33	7,09	35,00	50,00
6 g.L ⁻¹ (3)	7,48	7,67	6,37	7,34	23,80	25,00	6,36	6,97	40,00	50,00
Min	7,48	7,66	6,37	7,29	23,80	25,00	6,27	6,77	35,00	50,00
Máx	7,51	7,68	6,45	7,61	23,80	25,00	6,36	7,09	40,00	50,00
Média	7,49	7,67	6,41	7,41	23,80	25,00	6,32	6,94	36,67	50,00
Desvio padrão	0,02	0,01	0,04	0,17	0,00	0,00	0,05	0,16	2,89	0,00
CV (%)	0,20	0,13	0,63	2,32	0,00	0,00	0,73	2,33	7,87	0,00

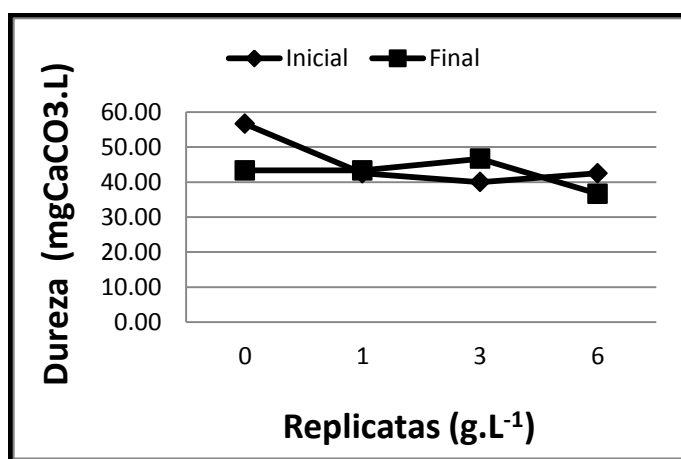
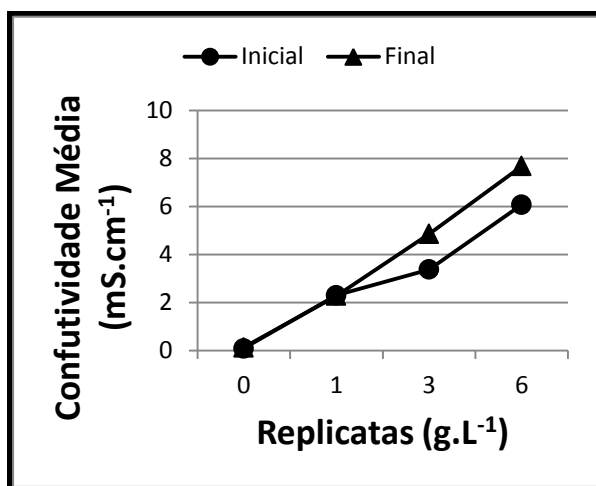
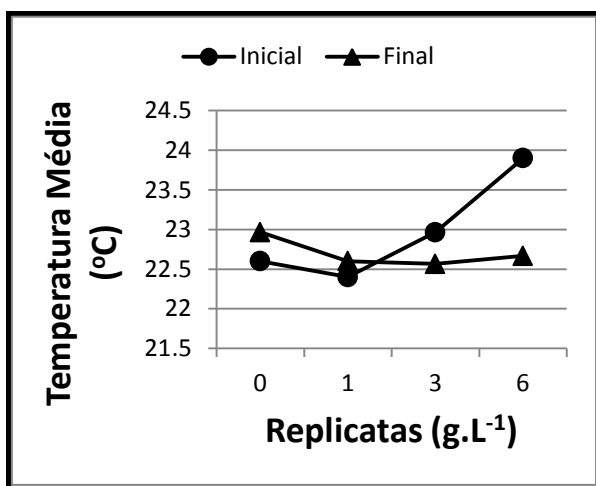
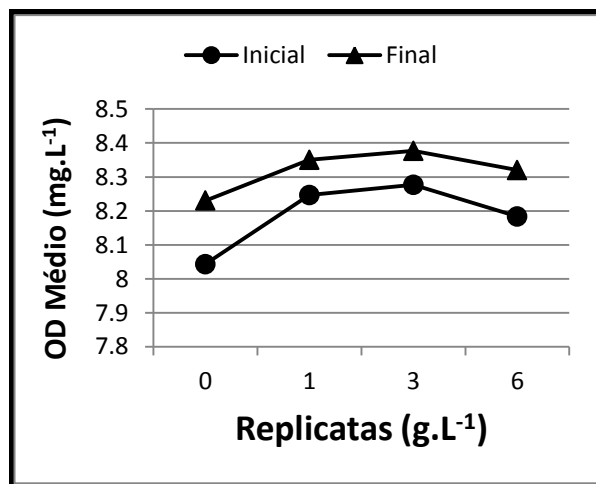
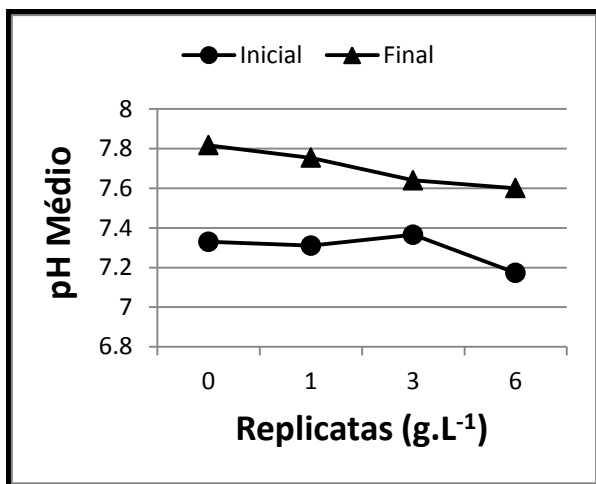
Gráficos: Análises físico – químicas do lote 2.



ANEXO V - Análises físico – químicas do lote 3.

	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mg CaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	7,27	7,73	8,06	8,22	22,60	23,10	0,08	0,12	55,00	40,00
Controle (2)	7,33	7,82	8,03	8,23	22,70	22,90	0,09	0,12	60,00	45,00
Controle (3)	7,39	7,90	8,04	8,24	22,50	22,90	0,09	0,13	55,00	45,00
Mín	7,27	7,73	8,03	8,22	22,50	22,90	0,08	0,12	55,00	40,00
Máx	7,39	7,90	8,06	8,24	22,70	23,10	0,09	0,13	60,00	45,00
Média	7,33	7,82	8,04	8,23	22,60	22,97	0,09	0,12	56,67	43,33
Desvio padrão	0,06	0,09	0,02	0,01	0,10	0,12	0,01	0,01	2,89	2,89
CV (%)	0,82	1,09	0,19	0,12	0,44	0,50	6,66	4,68	5,09	6,66
1 g.L ⁻¹ (1)	7,21	7,65	8,17	8,33	22,40	22,70	1,90	2,26	45,00	45,00
1 g.L ⁻¹ (2)	7,37	7,76	8,22	8,35	22,30	22,60	1,97	2,46	40,00	40,00
1 g.L ⁻¹ (3)	7,35	7,85	8,35	8,37	22,50	22,50	3,02	2,12	0,00	45,00
Mín	7,21	7,65	8,17	8,33	22,30	22,50	1,90	2,12	40,00	40,00
Máx	7,37	7,85	8,35	8,37	22,50	22,70	3,02	2,46	45,00	45,00
Média	7,31	7,75	8,25	8,35	22,40	22,60	2,30	2,28	42,50	43,33
Desvio padrão	0,09	0,10	0,09	0,02	0,10	0,10	0,63	0,17	3,54	2,89
CV (%)	1,19	1,29	1,13	0,24	0,45	0,44	27,32	7,49	8,32	6,66
3 g.L ⁻¹ (1)	7,37	7,43	8,34	8,42	22,70	22,60	3,80	4,84	40,00	45,00
3 g.L ⁻¹ (2)	7,36	7,71	8,31	8,37	22,90	22,60	3,83	4,83	40,00	45,00
3 g.L ⁻¹ (3)	0,00	7,78	8,18	8,34	23,30	22,50	2,50	4,89	0,00	50,00
Mín	7,36	7,43	8,18	8,34	22,70	22,50	2,50	4,83	40,00	45,00
Máx	7,37	7,78	8,34	8,42	23,30	22,60	3,83	4,89	40,00	50,00
Média	7,37	7,64	8,28	8,38	22,97	22,57	3,38	4,85	40,00	46,67
Desvio padrão	0,01	0,19	0,09	0,04	0,31	0,06	0,76	0,03	0,00	2,89
CV (%)	0,10	2,42	1,03	0,48	1,33	0,26	22,49	0,66	0,00	6,19
6 g.L ⁻¹ (1)	7,09	7,46	8,26	8,24	23,50	22,90	5,96	7,48	45,00	30,00
6 g.L ⁻¹ (2)	7,18	7,63	8,18	8,35	23,60	22,60	6,19	7,84	40,00	35,00
6 g.L ⁻¹ (3)	7,25	7,71	8,11	8,37	24,60	22,50	6,07	7,73	0,00	45,00
Mín	7,09	7,46	8,11	8,24	23,50	22,50	5,96	7,48	40,00	30,00
Máx	7,25	7,71	8,26	8,37	24,60	22,90	6,19	7,84	45,00	45,00
Média	7,17	7,60	8,18	8,32	23,90	22,67	6,07	7,68	42,50	36,67
Desvio padrão	0,08	0,13	0,08	0,07	0,61	0,21	0,12	0,18	3,54	7,64
CV (%)	1,12	1,68	0,92	0,84	2,55	0,92	1,89	2,40	8,32	20,83

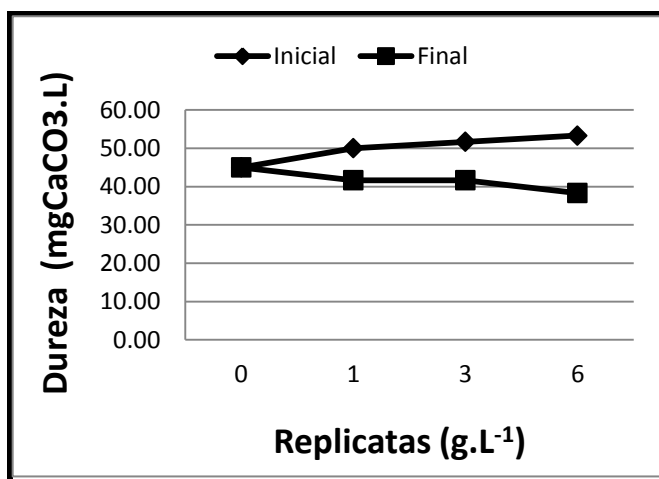
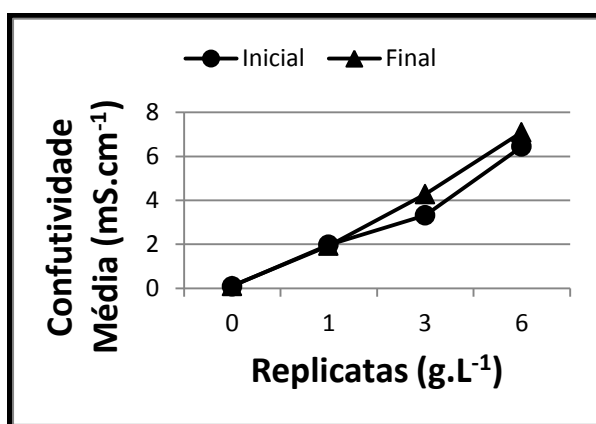
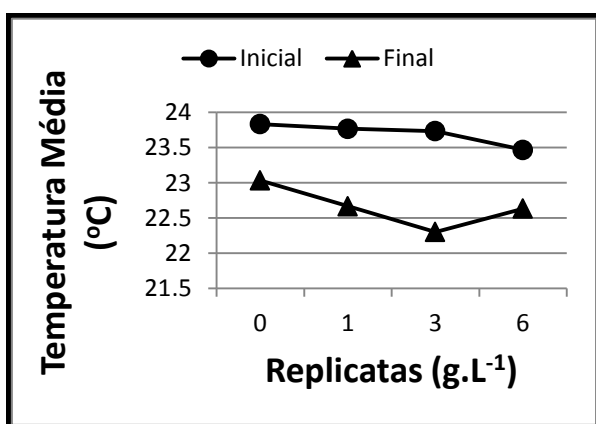
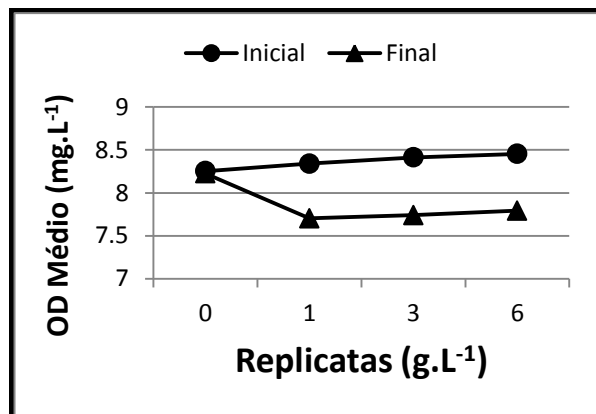
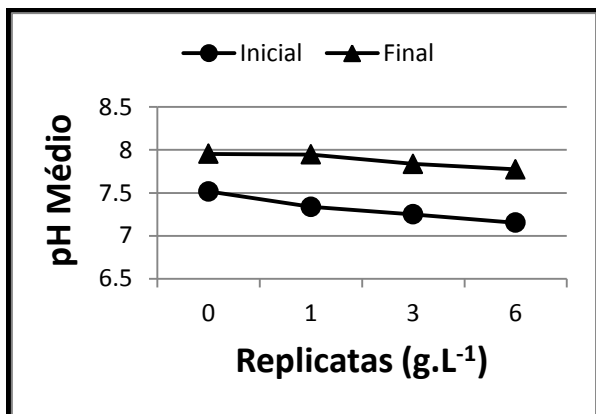
Gráficos: Análises físico – químicas do lote 3.



ANEXO VI - Análises físico – químicas do lote 4.

	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mg CaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	7,48	7,76	8,25	8,24	24,30	23,80	0,09	0,11	45,00	40,00
Controle (2)	7,53	8,03	8,21	8,24	24,10	22,70	0,09	0,11	40,00	45,00
Controle (3)	7,54	8,07	8,30	8,20	23,10	22,60	0,09	0,09	50,00	50,00
Min	7,48	7,76	8,21	8,20	23,10	22,60	0,09	0,09	40,00	40,00
Máx	7,54	8,07	8,30	8,24	24,30	23,80	0,09	0,11	50,00	50,00
Média	7,52	7,95	8,25	8,23	23,83	23,03	0,09	0,10	45,00	45,00
Desvio padrão	0,03	0,17	0,05	0,02	0,64	0,67	0,00	0,01	5,00	5,00
CV (%)	0,43	2,12	0,55	0,28	2,70	2,89	0,00	11,17	11,11	11,11
1 g.L ⁻¹ (1)	7,32	7,85	8,33	7,69	23,90	23,00	2,09	1,88	70,00	40,00
1 g.L ⁻¹ (2)	7,33	7,92	8,35	7,68	23,70	22,60	1,88	2,03	35,00	40,00
1 g.L ⁻¹ (3)	7,36	8,07	8,34	7,74	23,70	22,40	1,96	1,90	45,00	45,00
Min	7,32	7,85	8,33	7,68	23,70	22,40	1,88	1,88	35,00	40,00
Máx	7,36	8,07	8,35	7,74	23,90	23,00	2,09	2,03	70,00	45,00
Média	7,34	7,95	8,34	7,70	23,77	22,67	1,98	1,94	50,00	41,67
Desvio padrão	0,02	0,11	0,01	0,03	0,12	0,31	0,11	0,08	18,03	2,89
CV (%)	0,28	1,41	0,12	0,42	0,49	1,35	5,36	4,21	36,06	6,93
3 g.L ⁻¹ (1)	7,18	7,72	8,40	7,72	23,90	22,40	3,20	4,08	70,00	35,00
3 g.L ⁻¹ (2)	7,23	7,86	8,44	7,73	23,70	22,30	3,39	4,41	45,00	40,00
3 g.L ⁻¹ (3)	7,34	7,93	8,40	7,77	23,60	22,20	3,36	4,35	40,00	50,00
Min	7,18	7,72	8,40	7,72	23,60	22,20	3,20	4,08	40,00	35,00
Máx	7,34	7,93	8,44	7,77	23,90	22,40	3,39	4,41	70,00	50,00
Média	7,25	7,84	8,41	7,74	23,73	22,30	3,32	4,28	51,67	41,67
Desvio padrão	0,08	0,11	0,02	0,03	0,15	0,10	0,10	0,18	16,07	7,64
CV (%)	1,13	1,36	0,27	0,34	0,64	0,45	3,08	4,11	31,11	18,33
6 g.L ⁻¹ (1)	7,05	7,62	8,46	7,75	23,50	22,60	6,24	6,69	45,00	35,00
6 g.L ⁻¹ (2)	7,16	7,79	8,46	7,82	23,40	22,40	6,61	7,18	65,00	45,00
6 g.L ⁻¹ (3)	7,25	7,91	8,44	7,81	23,50	22,90	6,50	7,42	50,00	35,00
Min	7,05	7,62	8,44	7,75	23,40	22,40	6,24	6,69	45,00	35,00
Máx	7,25	7,91	8,46	7,82	23,50	22,90	6,61	7,42	65,00	45,00
Média	7,15	7,77	8,45	7,79	23,47	22,63	6,45	7,10	53,33	38,33
Desvio padrão	0,10	0,15	0,01	0,04	0,06	0,25	0,19	0,37	10,41	5,77
CV (%)	1,40	1,87	0,14	0,49	0,25	1,11	2,95	5,24	19,52	15,06

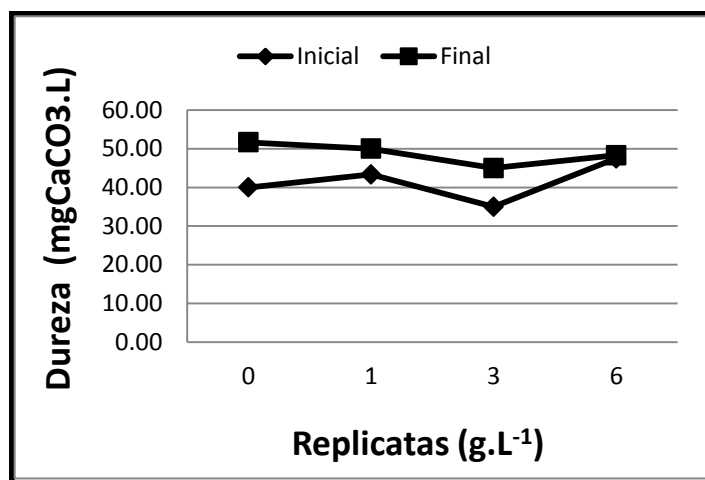
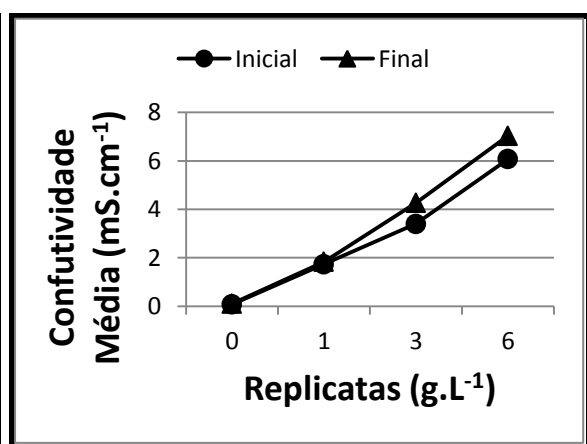
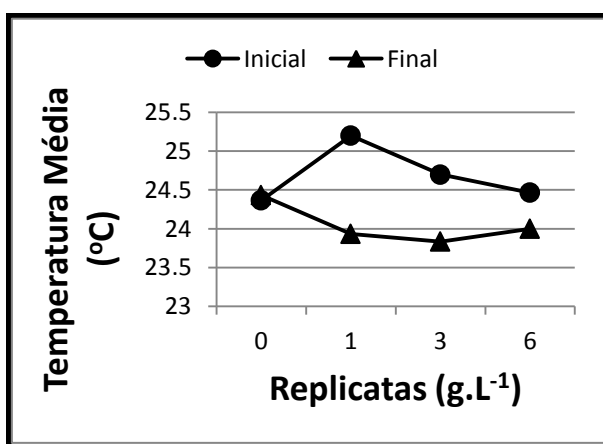
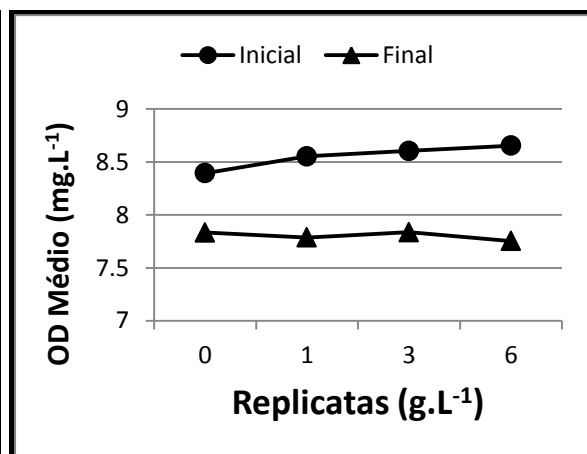
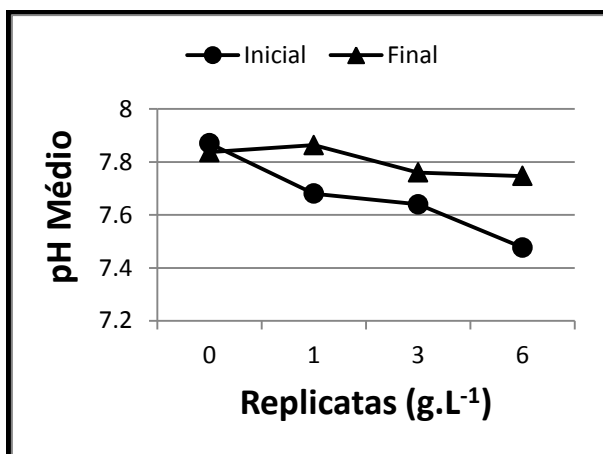
Gráficos: Análises físico – químicas do lote 4.



ANEXO VII - Análises físico – químicas do lote 5.

	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mgCaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	7,75	7,70	8,34	7,86	24,10	24,30	0,08	0,10	40,00	55,00
Controle (2)	7,92	7,86	8,42	7,77	24,40	24,50	0,08	0,11	40,00	50,00
Controle (3)	7,94	7,95	8,42	7,87	24,60	24,50	0,08	0,11	40,00	50,00
Min	7,75	7,70	8,34	7,77	24,10	24,30	0,08	0,10	40,00	50,00
Máx	7,94	7,95	8,42	7,87	24,60	24,50	0,08	0,11	40,00	55,00
Média	7,87	7,84	8,39	7,83	24,37	24,43	0,08	0,11	40,00	51,67
Desvio padrão	0,10	0,13	0,05	0,06	0,25	0,12	0,00	0,01	0,00	2,89
CV (%)	1,33	1,62	0,55	0,70	1,03	0,47	0,00	5,41	0,00	5,59
1 g.L ⁻¹ (1)	7,57	7,76	8,50	7,65	24,80	24,50	1,84	1,83	40,00	45,00
1 g.L ⁻¹ (2)	7,71	7,88	8,55	7,80	25,00	23,50	1,70	1,87	45,00	60,00
1 g.L ⁻¹ (3)	7,76	7,95	8,61	7,91	25,80	23,80	1,68	1,81	45,00	45,00
Min	7,57	7,76	8,50	7,65	24,80	23,50	1,68	1,81	40,00	45,00
Máx	7,76	7,95	8,61	7,91	25,80	24,50	1,84	1,87	45,00	60,00
Média	7,68	7,86	8,55	7,79	25,20	23,93	1,74	1,84	43,33	50,00
Desvio padrão	0,10	0,10	0,06	0,13	0,53	0,51	0,09	0,03	2,89	8,66
CV (%)	1,28	1,22	0,64	1,68	2,10	2,14	5,01	1,66	6,66	17,32
3 g.L ⁻¹ (1)	7,49	7,61	8,57	7,82	24,70	24,00	2,90	4,31	25,00	45,00
3 g.L ⁻¹ (2)	7,69	7,80	8,63	7,85	24,70	23,80	3,57	4,24	45,00	45,00
3 g.L ⁻¹ (3)	7,74	7,87	8,61	7,84	24,70	23,70	3,73	4,26	35,00	
Min	7,49	7,61	8,57	7,82	24,70	23,70	2,90	4,24	25,00	45,00
Máx	7,74	7,87	8,63	7,85	24,70	24,00	3,73	4,31	45,00	45,00
Média	7,64	7,76	8,60	7,84	24,70	23,83	3,40	4,27	35,00	45,00
Desvio padrão	0,13	0,13	0,03	0,02	0,00	0,15	0,44	0,04	10,00	0,00
CV (%)	1,73	1,73	0,36	0,19	0,00	0,64	12,95	0,84	28,57	0,00
6 g.L ⁻¹ (1)	7,30	7,64	8,66	7,84	24,50	24,10	6,00	6,94	50,00	45,00
6 g.L ⁻¹ (2)	7,53	7,80	8,67	7,72	24,50	24,00	6,19	7,12	0,00	60,00
6 g.L ⁻¹ (3)	7,60	7,80	8,63	7,70	24,40	23,90	6,05	7,04	45,00	40,00
Min	7,30	7,64	8,63	7,70	24,40	23,90	6,00	6,94	45,00	40,00
Máx	7,60	7,80	8,67	7,84	24,50	24,10	6,19	7,12	50,00	60,00
Média	7,48	7,75	8,65	7,75	24,47	24,00	6,08	7,03	47,50	48,33
Desvio padrão	0,16	0,09	0,02	0,08	0,06	0,10	0,10	0,09	3,54	10,41
CV (%)	2,10	1,19	0,24	0,98	0,24	0,42	1,62	1,28	7,44	21,53

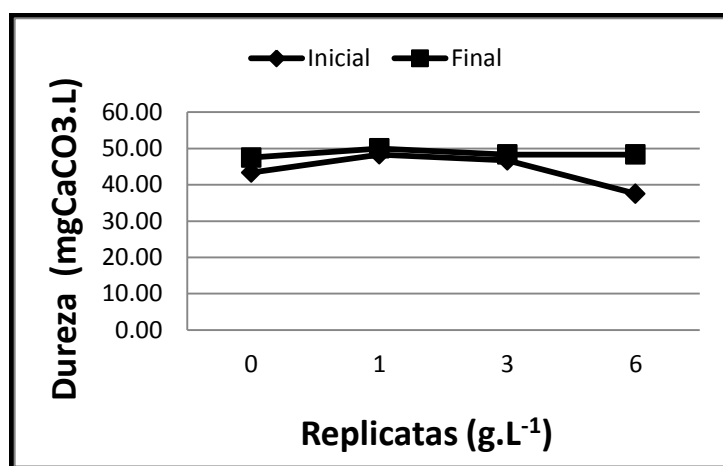
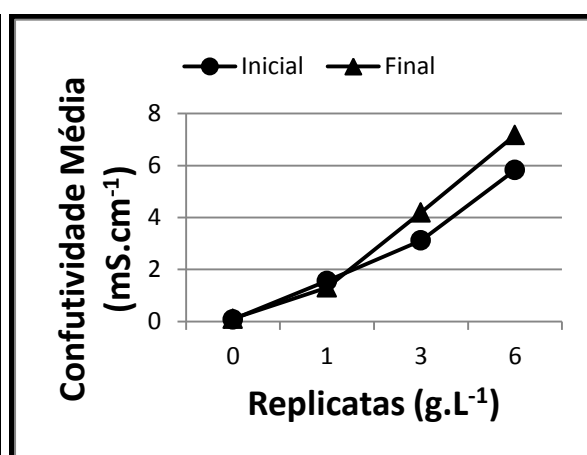
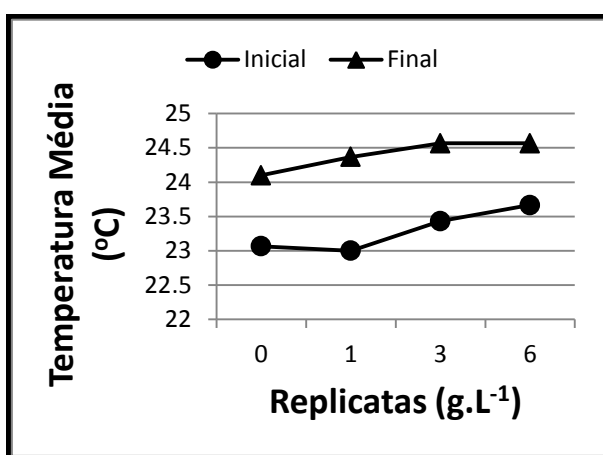
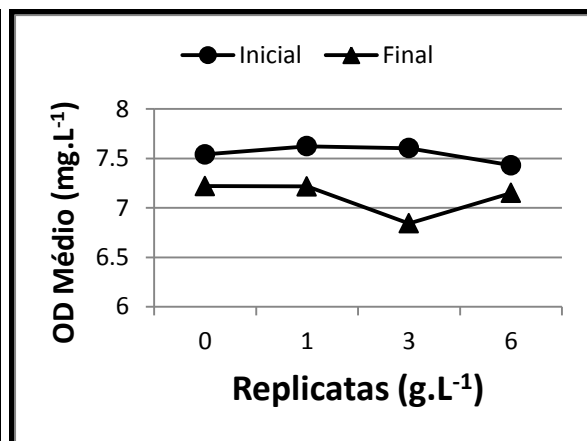
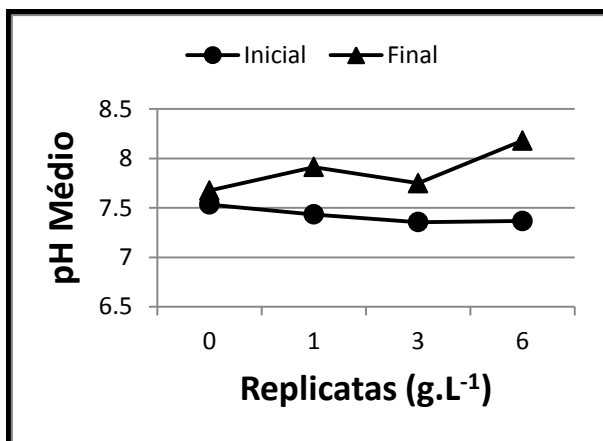
Gráficos: Análises físico – químicas do lote 5.



ANEXO VIII - Análises físico – químicas do lote 6.

	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mgCaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	7,48	7,45	7,55	7,13	23,10	23,90	0,08	0,10	45,00	45,00
Controle (2)	7,46	7,90	7,51	7,31	23,20	24,30	0,08	0,11	45,00	50,00
Controle (3)	7,66	0,00	7,56	0,00	22,90	0,00	0,08	0,00	40,00	0,00
Min	7,46	7,45	7,51	7,13	22,90	23,90	0,08	0,10	40,00	45,00
Máx	7,66	7,90	7,56	7,31	23,20	24,30	0,08	0,11	45,00	50,00
Média	7,53	7,68	7,54	7,22	23,07	24,10	0,08	0,11	43,33	47,50
Desvio padrão	0,11	0,32	0,03	0,13	0,15	0,28	0,00	0,01	2,89	3,54
CV (%)	1,46	4,15	0,35	1,76	0,66	1,17	0,00	6,73	6,66	7,44
1 g.L ⁻¹ (1)	7,29	7,86	7,55	7,34	23,00	24,40	1,56	1,89	50,00	45,00
1 g.L ⁻¹ (2)	7,45	7,99	7,62	7,16	23,00	24,30	1,53	1,01	45,00	55,00
1 g.L ⁻¹ (3)	7,56	7,89	7,70	7,15	23,00	24,40	1,57	1,01	50,00	50,00
Min	7,29	7,86	7,55	7,15	23,00	24,30	1,53	1,01	45,00	45,00
Máx	7,56	7,99	7,70	7,34	23,00	24,40	1,57	1,89	50,00	55,00
Média	7,43	7,91	7,62	7,22	23,00	24,37	1,55	1,30	48,33	50,00
Desvio padrão	0,14	0,07	0,08	0,11	0,00	0,06	0,02	0,51	2,89	5,00
CV (%)	1,83	0,86	0,98	1,48	0,00	0,24	1,34	38,98	5,97	10,00
3 g.L ⁻¹ (1)	7,27	7,49	7,58	6,46	23,80	24,80	2,23	4,26	55,00	60,00
3 g.L ⁻¹ (2)	7,33	7,85	7,61	7,10	23,30	24,50	3,51	4,28	40,00	40,00
3 g.L ⁻¹ (3)	7,47	7,91	7,62	6,97	23,20	24,40	3,61	4,03	45,00	45,00
Min	7,27	7,49	7,58	6,46	23,20	24,40	2,23	4,03	40,00	40,00
Máx	7,47	7,91	7,62	7,10	23,80	24,80	3,61	4,28	55,00	60,00
Média	7,36	7,75	7,60	6,84	23,43	24,57	3,12	4,19	46,67	48,33
Desvio padrão	0,10	0,23	0,02	0,34	0,32	0,21	0,77	0,14	7,64	10,41
CV (%)	1,40	2,93	0,27	4,94	1,37	0,85	24,69	3,32	16,37	21,53
6 g.L ⁻¹ (1)	7,25	8,05	7,23	7,68	23,60	24,70	5,80	6,81	30,00	50,00
6 g.L ⁻¹ (2)	7,38	8,19	7,46	7,11	23,60	24,50	5,98	7,38	45,00	50,00
6 g.L ⁻¹ (3)	7,47	8,30	7,60	6,66	23,80	24,50	5,69	7,31	0,00	45,00
Min	7,25	8,05	7,23	6,66	23,60	24,50	5,69	6,81	30,00	45,00
Máx	7,47	8,30	7,60	7,68	23,80	24,70	5,98	7,38	45,00	50,00
Média	7,37	8,18	7,43	7,15	23,67	24,57	5,82	7,17	37,50	48,33
Desvio padrão	0,11	0,13	0,19	0,51	0,12	0,12	0,15	0,31	10,61	2,89
CV (%)	1,50	1,53	2,51	7,15	0,49	0,47	2,51	4,34	28,28	5,97

Gráficos: Análises físico – químicas do lote 6.



ANEXO IX - Análises físico – químicas do lote 7.

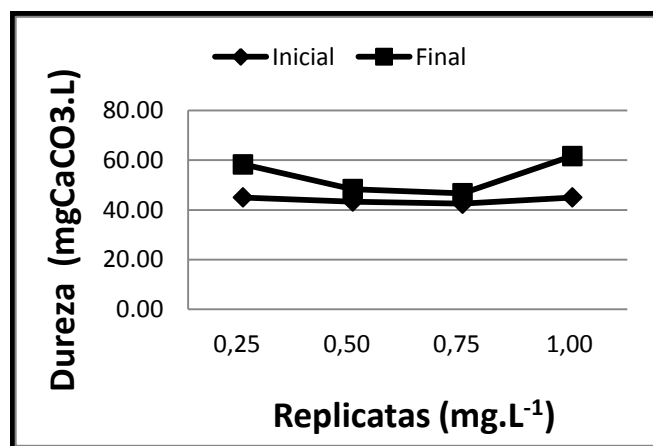
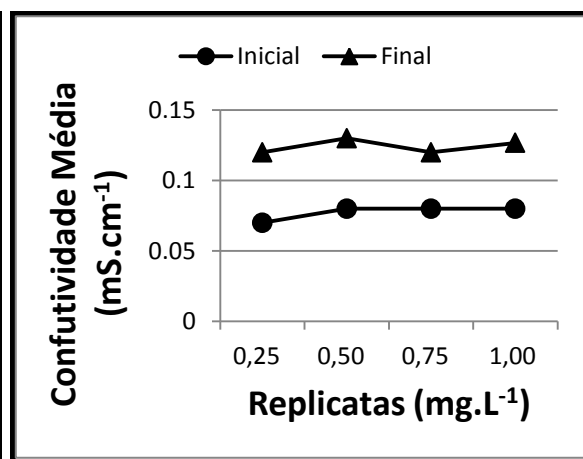
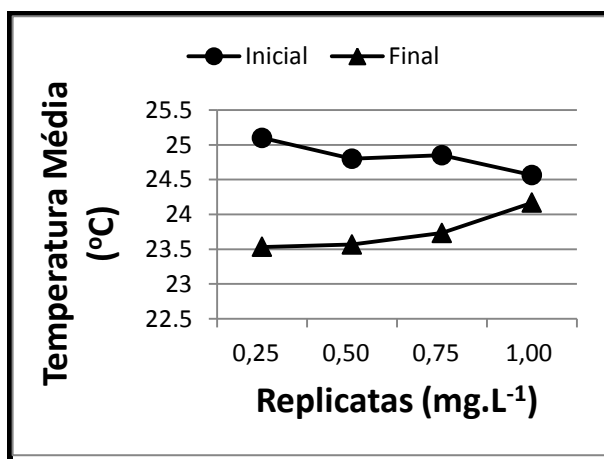
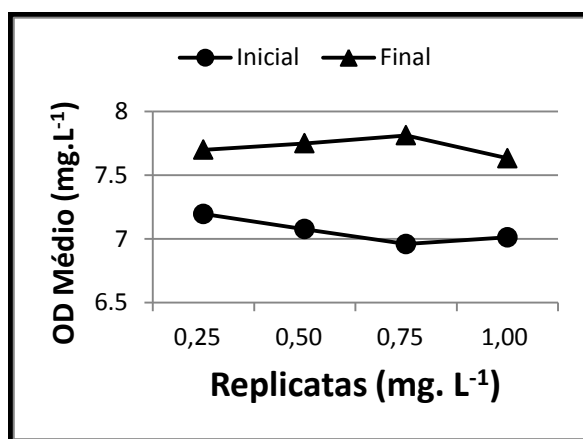
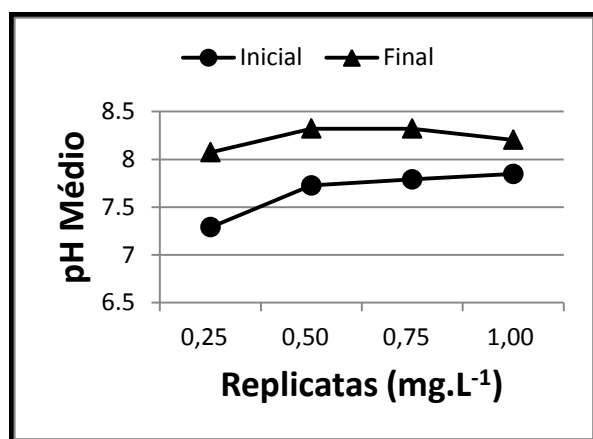
	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mgCaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	7,18	7,90	7,22	7,60	25,30	23,80	0,07	0,12	45,00	45,00
Controle (2)	7,30	8,14	7,23	7,73	25,10	23,40	0,07	0,12	50,00	60,00
Controle (3)	7,39	8,18	7,14	7,77	24,90	23,40	0,07	0,12	40,00	70,00
Mín	7,18	7,90	7,14	7,60	24,90	23,40	0,07	0,12	40,00	45,00
Máx	7,39	8,18	7,23	7,77	25,30	23,80	0,07	0,12	50,00	70,00
Média	7,29	8,07	7,20	7,70	25,10	23,53	0,07	0,12	45,00	58,33
Desvio padrão	0,11	0,15	0,05	0,09	0,20	0,23	0,00	0,00	5,00	12,58
CV (%)	1,45	1,88	0,69	1,15	0,80	0,98	0,00	0,00	11,11	21,57
0,25 mg.L ⁻¹ (1)	7,62	8,34	7,06	7,67	24,80	23,60	0,08	0,13	40,00	50,00
0,25 mg.L ⁻¹ (2)	7,74	8,35	7,18	7,77	24,80	23,60	0,08	0,13	40,00	50,00
0,25 mg.L ⁻¹ (3)	7,82	8,27	6,99	7,81	24,80	23,50	0,08	0,13	50,00	45,00
Mín	7,62	8,27	6,99	7,67	24,80	23,50	0,08	0,13	40,00	45,00
Máx	7,82	8,35	7,18	7,81	24,80	23,60	0,08	0,13	50,00	50,00
Média	7,73	8,32	7,08	7,75	24,80	23,57	0,08	0,13	43,33	48,33
Desvio padrão	0,10	0,04	0,10	0,07	0,00	0,06	0,00	0,00	5,77	2,89
CV (%)	1,30	0,52	1,36	0,93	0,00	0,24	0,00	0,00	13,32	5,97
0,50 mg.L ⁻¹ (1)	7,76	8,35	6,97	7,77	25,00	23,70	0,08	0,11	50,00	50,00
0,50 mg.L ⁻¹ (2)	7,82	8,28	6,95	7,82	24,70	23,70	0,08	0,13	35,00	45,00
0,50 mg.L ⁻¹ (3)	0,00	8,33	0,00	7,85	0,00	23,80	0,00	0,12	0,00	45,00
Mín	7,76	8,28	6,95	7,77	24,70	23,70	0,08	0,11	35,00	45,00
Máx	7,82	8,35	6,97	7,85	25,00	23,80	0,08	0,13	50,00	50,00
Média	7,79	8,32	6,96	7,81	24,85	23,73	0,08	0,12	42,50	46,67
Desvio padrão	0,04	0,04	0,01	0,04	0,21	0,06	0,00	0,01	10,61	2,89
CV (%)	0,54	0,43	0,20	0,52	0,85	0,24	0,00	8,33	24,96	6,19
0,75 mg.L ⁻¹ (1)	7,80	8,21	7,01	7,44	24,80	24,20	0,08	0,12	45,00	75,00
0,75 mg.L ⁻¹ (2)	7,86	8,20	7,00	8,02	24,50	24,20	0,08	0,13	45,00	60,00
0,75 mg.L ⁻¹ (3)	7,88	8,20	7,03	7,44	24,40	24,10	0,08	0,13	0,00	50,00
Mín	7,80	8,20	7,00	7,44	24,40	24,10	0,08	0,12	45,00	50,00
Máx	7,88	8,21	7,03	8,02	24,80	24,20	0,08	0,13	45,00	75,00
Média	7,85	8,20	7,01	7,63	24,57	24,17	0,08	0,13	45,00	61,67
Desvio padrão	0,04	0,01	0,02	0,33	0,21	0,06	0,00	0,01	0,00	12,58
CV (%)	0,53	0,07	0,22	4,39	0,85	0,24	0,00	4,56	0,00	20,40

Continua pg. 120.

Continuação anexo IX.

1,00 mg.L ⁻¹ (1)	7,81	8,30	6,94	8,04	24,90	24,50	0,07	0,12	40,00	55,00
1,00 mg.L ⁻¹ (2)	7,85	8,32	6,97	8,03	24,80	24,30	0,08	0,12	40,00	75,00
1,00 mg.L ⁻¹ (3)	7,90	8,31	7,03	8,03	24,90	24,30	0,08	0,13	45,00	65,00
Min	7,81	8,30	6,94	8,03	24,80	24,30	0,07	0,12	40,00	55,00
Máx	7,90	8,32	7,03	8,04	24,90	24,50	0,08	0,13	45,00	75,00
Média	7,85	8,31	6,98	8,03	24,87	24,37	0,08	0,12	41,67	65,00
Desvio padrão	0,05	0,01	0,05	0,01	0,06	0,12	0,01	0,01	2,89	10,00
CV (%)	0,57	0,12	0,66	0,07	0,23	0,47	7,53	4,68	6,93	15,38

Gráficos: Análises físico – químicas do lote 7.



ANEXO X- Análises físico – químicas do lote 8.

	pH		OD [mg.L ⁻¹]		Temp.[°C]		Cond. [mS.cm ⁻¹]		Dureza [mgCaCO ₃ .L]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle (1)	8,07	7,87	7,87	7,24	24,60	25,80	0,10	0,11	65,00	50,00
Controle (2)	8,08	7,86	7,93	7,22	24,40	25,70	0,09	0,11	0,00	50,00
Controle (3)	8,09	7,99	7,98	7,32	24,30	25,70	0,08	0,10	0,00	55,00
Min	8,07	7,86	7,87	7,22	24,30	25,70	0,08	0,10	65,00	50,00
Máx	8,09	7,99	7,98	7,32	24,60	25,80	0,10	0,11	65,00	55,00
Média	8,08	7,91	7,93	7,26	24,43	25,73	0,09	0,11	65,00	51,67
Desvio padrão	0,01	0,07	0,06	0,05	0,15	0,06	0,01	0,01	0,00	2,89
CV (%)	0,12	0,91	0,69	0,73	0,63	0,22	11,11	5,41	0,00	5,59
1 g.L ⁻¹ (1)	7,76	7,74	7,97	7,40	24,30	26,00	1,87	1,80	65,00	65,00
1 g.L ⁻¹ (2)	7,94	7,87	7,85	7,41	24,30	25,90	1,72	1,74	0,00	55,00
1 g.L ⁻¹ (3)	7,99	7,85	7,91	6,82	24,30	26,00	1,73	1,71	0,00	60,00
Min	7,76	7,74	7,85	6,82	24,30	25,90	1,72	1,71	65,00	55,00
Máx	7,99	7,87	7,97	7,41	24,30	26,00	1,87	1,80	65,00	65,00
Média	7,90	7,82	7,91	7,21	24,30	25,97	1,77	1,75	65,00	60,00
Desvio padrão	0,12	0,07	0,06	0,34	0,00	0,06	0,08	0,05	0,00	5,00
CV (%)	1,53	0,90	0,76	4,68	0,00	0,22	4,73	2,62	0,00	8,33
3 g.L ⁻¹ (1)	7,58	7,44	7,70	6,89	24,80	26,00	3,29	5,57	65,00	45,00
3 g.L ⁻¹ (2)	7,69	7,64	7,79	7,15	24,80	25,90	3,49	5,76	0,00	50,00
3 g.L ⁻¹ (3)	7,91	7,74	7,78	7,22	24,80	26,00	3,44	5,81	0,00	0,00
Min	7,58	7,44	7,70	6,89	24,80	25,90	3,29	5,57	65,00	0,00
Máx	7,91	7,74	7,79	7,22	24,80	26,00	3,49	5,81	65,00	50,00
Média	7,73	7,61	7,76	7,09	24,80	25,97	3,41	5,71	65,00	31,67
Desvio padrão	0,17	0,15	0,05	0,17	0,00	0,06	0,10	0,13	0,00	27,54
CV (%)	2,17	2,01	0,64	2,45	0,00	0,22	3,06	2,22	0,00	86,96
6 g.L ⁻¹ (1)	7,39	7,64	7,84	7,40	24,90	25,80	5,80	7,22	65,00	45,00
6 g.L ⁻¹ (2)	7,68	7,77	7,83	7,42	24,80	25,80	5,35	7,14	0,00	55,00
6 g.L ⁻¹ (3)	7,76	7,84	7,74	7,37	24,70	25,80	6,02	7,50	0,00	45,00
Min	7,39	7,64	7,74	7,37	24,70	25,80	5,35	7,14	65,00	45,00
Máx	7,76	7,84	7,84	7,42	24,90	25,80	6,02	7,50	65,00	55,00
Média	7,61	7,75	7,80	7,40	24,80	25,80	5,72	7,29	65,00	48,33
Desvio padrão	0,19	0,10	0,06	0,03	0,10	0,00	0,34	0,19	0,00	5,77
CV (%)	2,56	1,31	0,71	0,34	0,40	0,00	5,97	2,59	0,00	11,95

Gráficos: Análises físico – químicas do lote 8.

