

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

**CRISTIANE POHL DELLATORRE
PALOMA SIQUEIRA**

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE METAIS EM *Daphnia magna*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2015**

CRISTIANE POHL DELLATORRE
PALOMA SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE METAIS EM *Daphnia magna*

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientador: Prof. Me. Alessandro Feitosa Machado

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Wanessa Ramsdorf

**CURITIBA
2015**

RESUMO

DELLATORRE, C. P.; SIQUEIRA, P. **Avaliação de Toxicidade de Metais em *Daphnia magna***. Trabalho de conclusão de curso. 40 f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

A modernização da qualidade de vida levou a utilização de diversos produtos químicos em larga escala e, alguns destes produtos, são compostos por metais pesados, que podem causar uma intensa contaminação do meio ambiente, principalmente a água. Os metais são contaminantes que não possuem degradação natural e, dependendo da forma em que se encontram no ambiente aquático, podem ser altamente tóxicos, principalmente pelo seu efeito acumulativo, podendo levar a morte. O presente trabalho teve como objetivo determinar as concentrações iniciais efetivas medianas, $CE(I)_{50}$, dos metais Cr, Cu e Cd utilizando soluções padrões com concentrações variadas e conhecidas, sendo a concentração mediana a estabelecida pela Resolução CONAMA nº 430/2011. Os ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna* foram realizados segundo a NBR 12.713 (2009). A concentração efetiva mediana $CE(I)_{50}$ média encontrada para o cádmio foi $0,31 \text{ mg L}^{-1}$, concentração superior à permitida pela legislação ambiental ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$). Para o cromo hexavalente, a $CE(I)_{50}$ média foi $1,37 \text{ mg L}^{-1}$, concentração muito superior à máxima permitida de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, mostrando uma resistência do bioindicador ao cromo hexavalente. Para o cobre, a $CE(I)_{50}$ média encontrada foi $0,0525 \text{ mg L}^{-1}$, concentração inferior à máxima permitida ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$). Não foi possível determinar a toxicidade dos Pb, Ni e Zn devido às características dos metais, que impossibilitaram os ensaios com *D. magna*. Concluímos que *D. magna* possui sensibilidade elevada ao cobre, resistência elevada frente ao cromo hexavalente e valores de sensibilidade frente ao cádmio muito próximos aos estabelecidos pela Resolução 430 do CONAMA.

Palavras chave: Ecotoxicologia. Lançamento de efluentes. *Daphnia magna*.

ABSTRACT

DELLATORRE, C.P.; SIQUEIRA, P. **Metal Toxicity Assessment in *Daphnia magna***. Completion of course work. 29 f. Federal Technological University of Paraná, Curitiba, 2015.

The life quality modernization has led to the large scale use of various chemical products, some of these products are heavy metal compounds, and can cause intense environmental contamination, mainly in water. Metals are a non-natural degradation contaminant, which depending on the way they are found on the aquatic environment can be highly toxic, mainly for its cumulative effect one which can lead to death. This work had as its main goal, to establish the average effective initial concentration, CE(I)50, of the compounds: Cr, Cu and Cd. Using standard samples with different known concentrations, being the average standard concentration the one established on CONAMA 430/2011. The Eco toxicological trials with *Daphnia magna* were realized accordingly to the NBR 12.713(2009). The effective average concentration, CE(I)50, found for cadmium was 0.24 mg L^{-1} , these being higher than the one allowed on the environment legislation (0.2 mg L^{-1}). For the hexavalent chrome, the CE(I)50 that has been found was 1.15 mg L^{-1} , being much higher than the one allowed on the environmental legislation (0.1 mg L^{-1}). The toxicity of Pb, Ni and Zn could not be determined due to these metals characteristics, which has made *D. magna* trials impossible. We have concluded that *D. magna* has a high sensibility to copper, high resistance to hexavalent chrome, and that the sensibility to cadmium is very close to the ones established on CONAMA 430 Resolution.

Keywords: Ecotoxicology. Effluent discharge. *Daphnia magna*.

AGRADECIMENTOS

Ao IAP, por nos disponibilizar o espaço e nos dar suporte para a realização deste trabalho e, em especial, à Márcia T. Nunes Bosa e Elenize Ferrante M. Silva por toda a ajuda desde o dia inicial até a finalização deste trabalho e principalmente pelo incansável esforço em nos repassar suas experiências e sabedoria.

Aos nossos professores, Me. Alessandro Feitosa Machado e Dr^a. Wanessa Ramsdorf por facilitar este projeto, estando sempre dispostos a nos orientar em todas as vezes que os procuramos.

Às nossas famílias e a todos os amigos que nos ajudaram com a realização deste trabalho, contribuindo com ideias, nos apoiando e estando sempre presentes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 – Composição do meio básico.....	17
QUADRO 2 – Composição do M4.....	18
FIGURA 1 – Lotes com organismo teste <i>Daphnia magna</i>	16
FIGURA 2 – Testes Preliminares de toxicidade de metais em <i>D.magna</i>	22
FIGURA 3 – Testes Definitivos de toxicidade dos metais em <i>D.magna</i>	23
FIGURA 4 – Bandeja com os organismos <i>D. magna</i> , filhotes que serão empregados nos ensaios ecotoxicológicos.....	24
GRÁFICO 1 – Equação da reta e r^2 - Cádmio.....	28
GRÁFICO 2 – Equação da reta e r^2 - Cromo.....	30
GRÁFICO 3 – Equação da reta e r^2 - Cobre.....	31
GRÁFICO 4 – Carta Controle - Cádmio.....	33
GRÁFICO 5 – Carta Controle - Cromo.....	34
GRÁFICO 6 – Carta Controle - Cobre.....	35
GRÁFICO 7 – Carta Controle de Sensibilidade.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Volumes para elaboração do M4.....	19
TABELA 2 – Padrões de lançamento de efluentes – CONAMA 430/2011.....	21
TABELA 3 – Concentrações empregadas de cada metal nos testes ecotoxicológicos.....	22
TABELA 4 – Propriedades do meio de diluição, meio básico, utilizado nos ensaios ecotoxicológicos com <i>D. magna</i>	25
TABELA 5 – Resultado do teste preliminar de toxicidade em <i>D. magna</i> utilizando o padrão de Pb.....	25
TABELA 6 – Porcentual de Imobilidade dos organismos expostos às concentrações de Cádmio.....	28
TABELA 7 – Porcentual de Imobilidade dos organismos expostos às concentrações de Cromo.....	29
TABELA 8 – Porcentagem de Imobilidade dos organismos expostos às concentrações de Cobre.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AESBE – Associação das Empresas de Saneamento Básico Estaduais

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

CEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente

CE(I)₅₀ – Concentração Efetiva Inicial que causa efeito em 50% dos organismos

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

FATMA – Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina

FT_D – Fator de Toxicidade para *Daphnia magna*

IAP – Instituto Ambiental do Paraná

ISO – International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)

NBR – Norma Brasileira

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
4.1 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS.....	12
4.2 LEGISLAÇÃO.....	12
4.3 <i>Daphnia magna</i>	13
4.4 METAIS.....	14
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
5.1 CONTEXTUALIZAÇÃO.....	16
5.2 CULTIVO DE <i>Daphnia magna</i>	20
5.3 TESTE DE ECOTOXICIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	20
5.4 TESTE DE SENSIBILIDADE.....	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1 CÁDMIO.....	28
6.2 CROMO.....	29
6.3 COBRE.....	30
6.4 CARTAS CONTROLE.....	32
6.4.1 Carta controle do metal cádmio	33
6.4.2 Carta controle do metal cromo	34
6.4.3 Carta controle do metal cobre	35
6.4.4 Carta controle de sensibilidade	35
7 CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

A melhora no padrão de qualidade de vida da sociedade em todo o mundo originou o aumento na utilização de novos materiais, ou seja, atualmente alguns produtos químicos desempenham papéis indispensáveis na agricultura, indústria, transporte e saúde.

Porém, a utilização em larga escala desses produtos está associada à contínua liberação de substâncias naturais e sintéticas no ambiente de maneira localizada ou difundida. Assim, gases, "metais pesados", corantes e compostos nitrogenados estão presentes no ar, no solo e na água. Dentre essas substâncias, os metais representam um grupo em particular, pois não são degradados, química ou biologicamente, de maneira natural. A elevada concentração de metais potencialmente tóxicos em ambientes aquáticos leva a morte de peixes, seres fotossintetizantes e outros organismos. Introduzido no organismo humano, por meio de fonte alimentar, pode originar várias doenças, pelo seu efeito acumulativo, podendo até levar a morte (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2009).

A toxicidade de cada "metal pesado" depende, na maior parte, da forma química que o elemento é encontrado no ambiente aquático. Como por exemplo, o mercúrio quando ligado a grupos alquila apresenta sua forma mais tóxica, pois tais grupos são solúveis nos tecidos animais, podendo atravessar as membranas biológicas. A toxicidade do metal aos microrganismos pode ser moderada ou reforçada por fatores ambientais, incluindo a presença de outras substâncias, antagônicas ou sinérgicas, a formação de complexos com ácidos inorgânicos, ânions, pH, potencial redox, temperatura, matéria orgânica particulada, e matéria orgânica dissolvida (WANG, 1987).

Até mesmo a quantidade de carbono, dissolvido e em suspensão, em um curso natural de água está relacionada com a toxicidade de certa concentração de um metal pesado (BAIRD, 2011).

Por se tratarem de contaminantes em potencial, a Resolução CONAMA nº 430 (CONAMA, 2011), que dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, determinou limites de concentração para o descarte de metais em corpos hídricos.

É cada vez mais importante entender, quantificar, controlar e prever os possíveis danos que os mais distintos produtos químicos, possivelmente encontrados nos efluentes líquidos, podem causar no ambiente (AESBE, 2009). Os testes de ecotoxicidade podem ajudar significativamente a proteger os ecossistemas, por ser sua principal finalidade informar os potenciais impactos negativos sobre os organismos (AESBE, 2009).

O microcrustáceo *Daphnia magna* é um organismo-teste reconhecido em vários países, e vem sendo utilizado há décadas em laboratórios de ecotoxicologia, principalmente por demonstrar a toxicidade com resultados rápidos (até 48 horas de exposição). No ensaio agudo, a observação final é baseada na mobilidade ou imobilidade, o que torna o resultado de fácil interpretação.

Desde 1990 os testes com o microcrustáceo *Daphnia magna* foram introduzidos no Paraná (IAP, 1997). Atualmente é considerado de fácil manuseio, sendo utilizado como bioindicador de amostras ambientais para realização de testes ecotoxicológicos. Porém, este organismo fornece resultados amplos, definindo amostras como tóxicas, mas não a origem desta toxicidade. Segundo dados do IAP (IAP, 2011), em geral, as maiores imobilidades de *Daphnia magna* ocorrem em altas concentrações (ou na presença) de metais.

Propõe-se no presente trabalho realizar avaliações de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, expondo-as às soluções padronizadas de metais específicos, para determinação de sensibilidade aos metais escolhidos. Será utilizada como valores de referência, as concentrações definidas na Resolução nº 430 do CONAMA (CONAMA, 2011), que estabelece limites de metais em efluentes. Os resultados obtidos nos testes serão utilizados como ferramenta para avaliação da qualidade da água dos rios na elaboração dos relatórios de monitoramento ambiental, realizado pelo IAP nos rios do Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ecotoxicidade aguda de metais (cádmio, cobre, chumbo, níquel, zinco e cromo) em *Daphnia magna* utilizando os valores limítrofes estabelecidos na Resolução CONAMA nº 430/2011.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade dos organismos através de testes de sensibilidade;
- Avaliar a toxicidade de metais em *Daphnia magna*, utilizando o valor descrito na Resolução nº 430 (CONAMA, 2011) como valor mediano e demais concentrações;
- Determinar as concentrações efetivas iniciais - CE(I)₅₀- de cada metal
- Comparar as CE(I)₅₀ com concentrações limites permitidas, estabelecidas pela Resolução nº430 (CONAMA, 2011) e, dessa forma, determinar a sensibilidade ou resistência dos organismos frente aos metais.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

A ecotoxicidade, por definição, é o resultado das condições ambientais contra a atividade biológica, medidas com a intenção de proteger a vida aquática, considerando as etapas de reprodução, crescimento e sobrevivência, necessárias para manter a população de organismos e suas funções vitais (SANTI, 2013). Nesse contexto, “testes de toxicidade são realizados para determinar o efeito deletério de agentes físicos ou químicos a diversos organismos aquáticos” (CEMA, 2010).

A utilização dos testes de ecotoxicidade é uma importante ferramenta voltada para a proteção dos copos d’água. Esses testes também possuem o objetivo de monitoramento de efluentes e programas de gestão nas bacias, indicando a necessidade de controle na fonte (AESBE, 2009). Constatada a importância destes testes, sua utilização foi efetuada de modo rotineiro no Brasil no final dos anos 1990 (BERTOLETTI, 2012).

“Substâncias como metais pesados, compostos orgânicos voláteis, sólidos totais dissolvidos, orgânicos apolares e oxidantes levam toxicidade aos efluentes líquidos” (SANTI, 2013). Segundo os critérios de ecotoxicidade, o CONAMA define que o efluente não poderá provocar efeitos tóxicos aos organismos presentes no corpo receptor (SANTI, 2013).

4.2 LEGISLAÇÃO

O CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, é o órgão responsável pela definição de normas e padrões para controle da qualidade do ambiente. Em 17 de março de 2005 o CONAMA apresentou a Resolução nº357 que classifica e dá diretrizes ambientais para a definição dos corpos de água, além de definir as condições e padrões de lançamento de efluentes. A resolução anterior, nº20 de 1986, não possuía limites tão rígidos quanto à nova resolução, a Resolução CONAMA nº357 de 2005 (ROSINI; SANTOS; NÓBREGA, 2006). Em 2011, o CONAMA nº 430 veio para substituir e alterar os artigos das resoluções CONAMA

nº357/2005 e 396/2008, no âmbito de lançamentos de efluentes em corpos hídricos, além de estabelecer critérios de ecotoxicidade.

No Estado do Paraná, em 2010, o Conselho Estadual do Meio Ambiente estabeleceu a Resolução nº 81 (CEMA 081, 2010), que dispõe sobre critérios e padrões de ecotoxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados em águas superficiais no estado do Paraná. Esta resolução estabelece os tipos de organismos-teste apropriados para a realização do teste de ecotoxicidade para cada tipo de efluente industrial. Desta forma, a resolução considera a sensibilidade da espécie de organismos-teste, considerando determinados agentes potencialmente tóxicos encontrados nos efluentes industriais de diferentes fontes (ALMEIDA; ROSA; PAIXÃO, 2013).

A resolução CEMA 081/2010 define os organismos utilizados para os testes ecotoxicológicos em efluentes com despejo em corpos hídricos de água doce, sendo que para testes agudos nos efluentes os organismos definidos são *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* e, para testes crônicos os organismos podem ser *Ceriodaphnia dubia* e *Desmodesmus subspicatus*, dependendo da origem do efluente.

Por definição, a toxicidade aguda é o efeito prejudicial ocasionado a organismos vivos, por agentes físicos ou químicos em um curto prazo de exposição comparado ao seu ciclo de vida e resultante de testes de ecotoxicidade. A toxicidade crônica é "efeito deletério causado por agentes físicos ou químicos aos organismos vivos, que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele" (CEMA, 2010).

4.3 *Daphnia magna*

A indicação da realização de testes agudos com *Daphnia magna* pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) se dá pelo fácil cultivo originado do curto tempo de geração. Sendo assim, atualmente *Daphnia magna* (STRAUS, 1820) é um dos bioindicadores zooplanctônicos mais utilizados em testes ecotoxicológicos em diversos países e reage sensivelmente aos mais diferentes agentes tóxicos (ALVES; SILVANO, 2006).

Daphnia magna possui um tamanho médio de 5 a 6 mm, e alimenta-se preferencialmente de algas. Em boas condições ambientais, se reproduz por partenogênese, originando apenas fêmeas (ALVES; SILVANO, 2006). Além disso, possuem de 7 a 8 semanas de vida, um tempo de maturação curto e altas taxas de reprodução, tornando-a ideal para estudos de mudanças fisiológicas resultantes de estresse químico ou ambiental em laboratório (ACHARYA; SCHULMAN; YOUNG, 2010).

4.4 METAIS

Alguns elementos químicos essenciais normalmente ocorrem em determinada concentração nos seres vivos, outros são incorporados no organismo, devido à sua semelhança química com elementos essenciais ou como um resultado de absorção passiva. A concentração tóxica varia fortemente entre os diferentes elementos, mas também é influenciada pelo estado de oxidação e carga iônica (LITHNER, 1989).

A Resolução CONAMA nº430 de 2011 estabelece os níveis máximos de concentração de metais em efluentes para despejo em corpos hídricos. O Cádmiu apresenta a concentração máxima de 0,2 mg L⁻¹, sendo considerado um metal pesado que em faixas alcalinas é sujeito a hidrólise. Pode formar quelatos com substâncias orgânicas e inorgânicas, principalmente com substâncias húmicas, se tornando facilmente adsorvíveis nos materiais sólidos da água. Em concentrações acima de 0,1 mg L⁻¹ o poder de autodepuração da água é inibido (FATMA, 1999).

O Cromo pode ser encontrado na água em forma trivalente ou hexavalente, chegando às águas através de lançamentos de efluentes industriais. Na sua forma trivalente apresenta difícil dissolução e a forma hexavalente tem sua concentração máxima definida pelo CONAMA nº 430 dez vezes menor do que o Cromo trivalente, sendo 0,1 mg L⁻¹ de cromo hexavalente e 1,0 mg L⁻¹ do metal trivalente. O Cromo, como vários outros metais, acumula-se nos sedimentos (FATMA, 1999).

O Cobre também se acumula no sedimento e é fortemente tóxico para peixes, tendo sua concentração máxima definida pela Resolução CONAMA nº 430 como 1,0 mg L⁻¹. Sua toxicidade pode ser aumentada com a presença de metais, como Cádmiu, Zinco ou Mercúrio (FATMA, 1999). O Chumbo é considerado um metal pesado que pode estar nas formas de oxidação Pb⁺² e Pb⁺⁴, sendo que os sais de

Chumbo bivalente (Pb^{+2}) são os mais estáveis e os mais presentes nas águas. O Chumbo se acumula em organismos aquáticos, como todos os outros metais. Sua concentração máxima, definida pela Resolução CONAMA nº430 é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, pois concentrações entre $0,2$ e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ empobrecem a fauna e, em água com baixa dureza, sua toxicidade é aumentada (FATMA, 1999).

O Níquel é principalmente bivalente nas suas possíveis combinações no meio aquoso. Situa-se entre os metais pesados particularmente móveis. Sua concentração máxima estabelecida pela Resolução CONAMA nº 430 é de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Acumula-se no sedimento, em briófitas e plantas aquáticas (FATMA,1999).

O Zinco pode ser encontrado na forma bivalente nas suas combinações. Acumula-se no sedimento entre 45 a 60% de forma residual, sendo, desta forma, não acessível aos organismos aquáticos. Sua concentração máxima definida pela Resolução CONAMA 430 é de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (FATMA, 1999).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O microcrustáceo *Daphnia magna* é internacionalmente reconhecido como uma espécie bioindicadora, e vem sendo usado há décadas para realização de testes ecotoxicológicos; por sua facilidade de manuseio, pelos seus descendentes serem geneticamente iguais, o que torna o teste mais uniforme e seguro, por seu ciclo de vida, e principalmente o de reprodução, serem curtos, e por este organismo ser sensível a vários agentes nocivos (KNIE; LOPES, 2004).



FIGURA 1- Lotes do organismo-teste *Daphnia magna*.

Para garantir a qualidade de vida do organismo, e assim também do ensaio, prepara-se uma água de cultivo, um Meio Básico composto por concentrações específicas de sais característicos contidos na água natural, como o Cálcio,

Magnésio, Potássio e Sódio e pelo Meio M4 que contém elementos-traço e vitaminas (ELENDET; BIAS, 1990).

Para o preparo do Meio Básico foram utilizadas quatro soluções apresentadas no QUADRO 1 e para o preparo do meio M4 foram preparadas as 10 soluções mostradas no QUADRO 2, de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2009).

MEIO BÁSICO			
Solução	Reagente	mg L⁻¹	Método
1	Cloreto de Cálcio di-hidratado	73.500	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
2	Sulfato de Magnésio hepta-hidratado	123.300	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
3			
4	Bicarbonato de Sódio	64.800	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.

QUADRO 1- Composição do meio básico

Fonte: Adaptado de NBR 12713 (ABNT, 2009)

M4 (continua)			
Solução	Reagente	mg L⁻¹	Método
1	Cloreto de Cálcio di-hidratado	73.500	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
2	Sulfato de Magnésio hepta-hidratado	123.300	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
3	Cloreto de Potássio	5.800	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
4	Bicarbonato de Sódio	64.800	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
5	Cloreto de Manganês tetra-hidratado Cloreto de Lítio Cloreto de Rubídio Cloreto de Estrôncio hexa-hidratado Cloreto de cobre di-hidratado Cloreto de Zinco Cloreto de Cobalto hexa-hidratado	7.210 6.120 1.420 3.040 335 260 200	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
6	Nitrato de Sódio	548	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.
7	Acido Bórico Brometo de Sódio Molibdato de Sódio di-hidratado Metavanadato de Amônio Iodeto de Potássio Selenito de Sódio Silicato de sódio	5.719 32 126 1,15 6,5 4,38 21.475	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada, deixando em agitação até o clareamento da solução.
8	Titriplex III	500	Preparar as soluções separadamente. Diluir e aferir em balão volumétrico para 500 mL com água ultrapurificada. Misturar as duas soluções imediatamente antes de autoclavar a 121°C por 15min.
9	Sulfato ferroso hepta-hidratado Ortofosfato di-hidrogenado de potássio	199 286	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada.

10	Ortofosfato hidrogenado de dipotássio	368	Diluir e aferir em balão volumétrico para 1000 mL com água ultrapurificada. Congelar em volumes de 1mL para adicionar a 10L de meio de cultivo.
	Hidrocloreto de tiamina	750	
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	10	
	D(+) Biotina	7,5	

QUADRO 2 – Composição do M4

Fonte: Adaptado de NBR 12713 (ABNT, 2009).

A água de cultivo foi então preparada a partir de volumes definidos dessas soluções (TABELA 1), sendo a solução 10 descongelada e imediatamente adicionada às outras já diluídas. A solução final foi preparada 24 horas antes de seu uso e foi aerada suficientemente para assim atingir a concentração de oxigênio acima de 80% de saturação. A concentração de oxigênio foi medida através do oximêtro WTW, modelo oxi 315i. Após a aeração, a água de cultivo apresentou dureza entre 225 a 275 mg L⁻¹ de CaCO₃, verificada por titulação e pH de 7,6 a 8,0, medido por pHmêtro WTW, modelo pH 197i. (ABNT, 2009). E condutividade, medida através do condutivimêtro LABSTORE modelo CL700 de 655,5 µS cm⁻¹.

TABELA 1- Volumes para elaboração do M4

Soluções	Volume (mL/L)
1	4,0
2	1,0
3	1,0
4	1,0
5	0,1
6	0,5
7	0,2
8	5,0
9	0,5
10	0,1

Fonte: Adaptado de KNIE & LOPES (2004)

5.2 CULTIVO DE *DAPHNIA MAGNA*

Após a estabilização do meio e verificação dos parâmetros restritivos, os organismos foram cultivados, sendo que para a abertura de lotes, foram utilizados 50 organismos. Esses organismos são chamados de matrizes e foram mantidos em béqueres de vidro com aproximadamente 1000 mL do meio de cultivo M4. A partir da terceira geração das matrizes, os filhotes podem ser usados para os testes (KNIE & LOPES, 2004).

Foram feitas trocas de meio e limpezas dos lotes de cultivo diariamente, sendo troca total (toda a água é trocada) nas segundas e sextas feiras, e parcial (metade da água é trocada por uma nova) de terça a quinta, para garantir diariamente os nutrientes necessários, melhor qualidade de vida e boa taxa de reprodução dos organismos. Para a separação dos filhotes, que posteriormente foram utilizados nos testes ecotoxicológicos e para a limpeza dos béqueres, foram retirados então os organismos mortos e/ou doentes e as carapaças que são liberadas. Os lotes foram alimentados diariamente com aproximadamente 20 mL de suspensão de algas fresca (*Desmodesmus subspicatus*) e mantidos em incubadora com temperatura de 20°C, e fotoperíodo em torno de 1000 lux por 16 horas (KNIE & LOPES, 2004).

Todas as informações foram registradas em forma de fichas, como: data de abertura e numeração dos lotes; número inicial de indivíduos e número de indivíduos adultos descartados; aparecimento de machos ou efípios, assim como o aparecimento de doenças; e por fim a data do descarte do lote. Além dessas informações foram registradas hora e data das trocas do meio, se esta troca foi parcial ou total, e a quantidade de alimento que foi fornecida para cada lote (ABNT, 2009).

5.3 TESTE DE ECOTOXICIDADE COM *DAPHNIA MAGNA*

Para o teste ecotoxicológico, foi preparada a água de diluição de acordo com a TABELA 1, porém como foi usado somente o Meio Básico, as soluções usadas foram 1, 2, 3 e 4.

As soluções utilizadas como amostras para execução dos testes foram obtidas por diluição de soluções-padrão concentradas 1.000 mg L^{-1} de Zn, Ni, Cr, Cu, Cd, não foi preciso ajuste de pH, e temperatura se manteve inferior a 40°C , conforme as condições e padrões de lançamento de efluentes estabelecidas pela Resolução 430 (CONAMA, 2011).

Como o Cromo possui duas formas disponíveis, o Cromo hexavalente e o Cromo trivalente. Foi levado em consideração a toxicidade do Cr^{+3} que comparado ao Cr^{+6} concordou-se não ser necessário à realização do teste com esta forma do Cr^{+3} . Para a realização do teste com o Cr^{+6} , o padrão utilizado foi o de Dicromato de Potássio.

O Dicromato de Potássio também é utilizado como substância de referência, nos testes de sensibilidade.

As soluções dos metais utilizados, exceto o Cromo, que foi substituído pelo Dicromato de Potássio, foram soluções dos metais puros, essas soluções foram diluídas no meio de cultura, conforme as concentrações definidas por valores estabelecidos para o descarte de efluentes da Resolução nº 430, de 13 de Maio de 2011 (TABELA 2).

TABELA 2 - Padrões de lançamento de efluentes – CONAMA 430/2011

Parâmetros inorgânicos	Valores máximos
Cádmio Total (Cd)	$0,2 \text{ mg L}^{-1}$
Chumbo Total (Pb)	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$
Cobre Dissolvido (Cu)	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$
Cromo Hexavalente (Cr^{+6})	$0,1 \text{ mg L}^{-1}$
Cromo Trivalente (Cr^{+3})	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$
Ferro Dissolvido (Fe)	$15,0 \text{ mg L}^{-1}$
Níquel Total (Ni)	$2,0 \text{ mg L}^{-1}$
Zinco Total (Zn)	$5,0 \text{ mg L}^{-1}$

Fonte: Adaptado de Resolução 430 (CONAMA, 2011).

Para determinação das concentrações empregadas nos testes ecotoxicológicos, foram realizados testes preliminares (FIGURA 2), considerando o

Cada diluição dos distintos metais foi dividida em dois béqueres de 50 mL, tornando-se então o volume final de aproximadamente 25 mL por béquer; neste volume foram colocados 10 filhotes das *Daphnias*, de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2009).

Os béqueres foram distribuídos em bandejas e cobertos com filme de PVC e levados para incubadora, sem luz, pelo período de 24 horas. Juntamente com as amostras foram incubados também dois béqueres controles, com 25 mL de meio de diluição cada e dez filhotes.

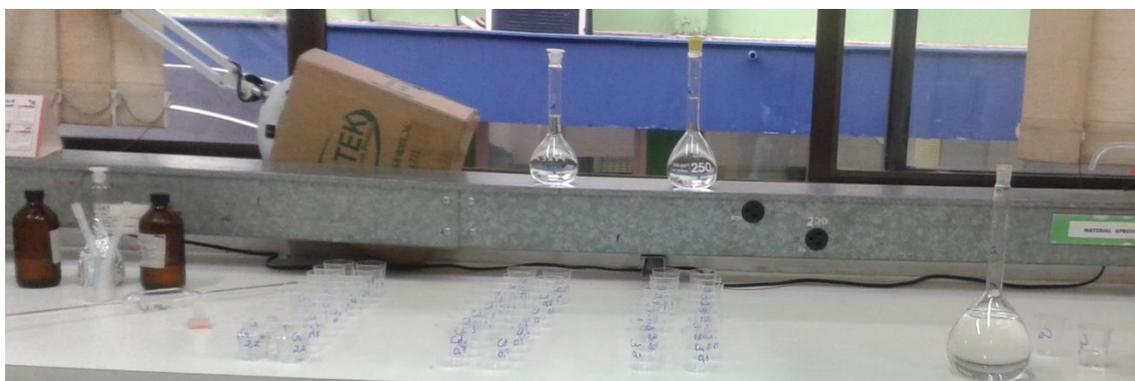


FIGURA 3 - Testes definitivos de toxicidade dos metais em *D. magna*.

Os resultados foram expressos em $CE(I)_{50}$, Concentração efetiva inicial que causa efeito em 50% dos organismos. Essa concentração foi determinada a partir da interseção da reta calculada estatisticamente e do eixo com 50% de imobilidade. Para determinação da $CE(I)_{50}$ foi utilizada a equação da reta e os valores expressos em $mg L^{-1}$.

5.4 TESTE DE SENSIBILIDADE

Foram realizados, em paralelo os testes com as soluções metálicas, testes de sensibilidade com os mesmos lotes de organismos cultivados, comparando os resultados obtidos com as cartas controle já estabelecidas anteriormente no Laboratório de Ecotoxicologia do IAP- Instituto Ambiental do Paraná. A substância de referência utilizada foi o Dicromato de Potássio ($100 mg L^{-1}$), indicada por normas de vários países, inclusive pela norma ISO 6341 (2012). A mesma norma indica,

para o organismo em questão, valores limite de sensibilidade entre 0,6 a 1,7 mg L⁻¹ de CE(I)₅₀, sendo que cada laboratório necessita estipular sua própria carta controle de sensibilidade. O Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto Ambiental do Paraná definiu seus valores de sensibilidade entre 0,58 a 1,56 mg L⁻¹ de K₂Cr₂O₇.

Neste teste, o tempo de incubação é de 24 horas (ISO 6341, 2012). Esse teste é realizado para avaliar a qualidade dos filhotes dos lotes que serão também utilizados nos testes realizados com os metais definidos neste trabalho.



FIGURA 4. Bandeja com os organismos *D. magna*, filhotes que serão empregados nos ensaios ecotoxicológicos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio básico usado para a realização das diluições conta com quatro soluções que garantem o bem estar dos organismos, pois contem sais que atuam como nutrientes, porém, não devem interferir negativamente no teste. Para melhor especificação, a tabela 4 conta com as propriedades do meio básico.

Tabela 4 - Propriedades do meio de diluição, meio básico, utilizado nos ensaios ecotoxicológicos com *D. magna*.

Lote	Data	Validade	Volume	Dureza Total	pH	Condutividade	Oxigênio Dissolvido
3044	05/03/2015	03/06/2015	50L	212 mg L ⁻¹ CaCO ₃	7,80	655,5 µS cm ⁻¹	7,25 mg L ⁻¹

A solução de chumbo, ao ser diluída no meio nutritivo, reagiu com as soluções encontradas neste meio, como o cloreto de cálcio, cloreto de potássio e o sulfato de magnésio, gerando um precipitado branco de cloretos e/ou sulfeto de chumbo. Agentes de complexação em conjunto e a formação de complexos, quer inorgânicos ou orgânicos reduzem significativamente a toxicidade do metal (ANDREW; BIESINGER e GLASS, 1976). Isso pode ser confirmado pelos resultados encontrados nos testes realizados com chumbo apresentados na tabela a seguir. Mesmo em concentrações muito elevadas, os organismos não mostraram imobilidade em nenhuma diluição.

Tabela 5 – Resultado do teste preliminar de toxicidade em *D. magna* utilizando o padrão de Pb

Concentração de Pb (mg L ⁻¹)	% de Imobilidade
30	0
15	0
7,5	0

Como este metal está dissolvido ou suspenso em água, reagem quimicamente ou são adsorvidos por partículas em até certo ponto, a concentração real à qual o organismo está exposto, e em muitos casos a forma química do metal,

não estão claramente definidos (ANDREW; BIESINGER e GLASS, 1976). Sendo assim o chumbo não ficou disponível para o organismo e o teste foi comprometido.

Um fator complicante nos estudos sobre a toxicidade dos metais é a complexidade da sua química aquosa. Em águas naturais, os metais formam prontamente complexos estáveis hidróxi ou carbonato, ou ambos, e apenas uma fração da concentração total existe como catiônico, ou forma aquosa (STUMM & MORGAN, 1970).

Todos os padrões precisaram ser refeitos por conta da data de validade, após o término dos testes preliminares, com concentrações ajustadas, no entanto, os novos padrões de Ni e Zn estavam preservados com 5% HNO₃, sendo que os antigos estavam com 1% apenas. Essa diferença na concentração do ácido interferiu negativamente nos testes, pois o organismo não sobreviveu em função do baixo pH. O pH encontrado para o padrão de Zn foi de 2,44 e para o padrão de Ni foi de 1,01, e ao neutralizarmos o padrão de Zn, houve turvamento da solução, indicando assim que possivelmente o Hidróxido de Zinco tenha sido formado, tornando então o Zn indisponível para o organismo filtrante, o que invalidaria o teste.

O padrão de Níquel apresentou a mesma concentração de ácido nítrico, como nessa faixa de pH de 1,01 o teste estaria comprometido, e a neutralização do ácido não se mostrou um método eficiente, o padrão não foi testado, tampouco neutralizado.

Os metais Cádmio e Cobre foram os que apresentaram maior toxicidade em *D. magna*. Porém a CE(I)₅₀ encontrada para o Cádmio foi relativamente próxima a concentração limite imposta pela legislação ambiental vigente (Resolução nº 430, de 2011).

Um fator que pode justificar a maior toxicidade desses metais são as indiscutíveis baixas concentrações, por exemplo, de cádmio na crosta da Terra (0,2 mg.kg⁻¹) sendo metais muito mais tóxicos do que os abundantes elementos de sódio e cálcio.

Esta é uma explicação de porque o Cobre e o Cádmio, mas não o cálcio e o sódio, tornaram-se grandes problemas ambientais. No entanto, a mesma argumentação não pode ser usada para explicar porque o alumínio, que é particularmente comum na crosta terrestre (8.300 mg.kg⁻¹), tornou-se um problema ambiental (LITHNER, 1989).

Todos os testes realizados foram analisados estatisticamente, porém uma dificuldade adicional com a interpretação destes testes é que, uma vez que o animal vive na solução de teste, quaisquer interações químicas ou físicas que ocorrem podem afetar o animal fisiologicamente, indo além da resposta tóxica direta que é para ser medida. Pequenas alterações no oxigênio dissolvido e o teor de CO₂, pH, alcalinidade e dureza da água de ensaio podem alterar, tanto a química aquosa do agente tóxico, quanto a resposta fisiológica para as substâncias tóxicas (Jones, 1939). A redução da toxicidade também pode estar relacionada com as constantes de estabilidade de complexos de metal formados (ANDREW; BIESINGER; GLASS, 1976).

A investigação da influência das alterações do pH nos meios dos ensaios ecotoxicológicos com daphnídeos já é bastante antiga. Mount (1966), Steernan Nielsen et al. (1969), Mancy & Allen (1976), e outros autores já investigaram o efeito das mudanças no pH sobre a toxicidade dos metais e concluíram que a toxicidade aumenta com o aumento do pH.

Considerando essas interações, alguns dados encontrados nos testes ecotoxicológicos foram descartados, cujos resultados estavam extremamente discrepantes, onde os organismos se apresentaram muito sensíveis ou resistentes. Com essa correção r^2 , foi recalculado, aumentando assim a confiabilidade dos resultados.

6.1 CÁDMIO

A seguir apresenta-se uma tabela, que descreve as concentrações utilizadas para o primeiro teste de solução contendo o metal Cádmio, e a porcentagem de imobilidade dos organismos, dados para a obtenção da equação da reta e o r^2 (coeficiente de correlação), apresentados no gráfico. O valor encontrado para $CE(I)_{50}$, neste teste foi de $0,24 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 6 – Porcentual de Imobilidade dos organismos expostos às concentrações de cádmio

% de imobilidade	Concentração de Cd (mg L^{-1})	ΣX^2	Σy	ΣX	ΣXy
100	$0,7000 \text{ mg L}^{-1}$	0,490			70
95	$0,5250 \text{ mg L}^{-1}$	0,276			50
75	$0,3937 \text{ mg L}^{-1}$	0,155			30
70	$0,2953 \text{ mg L}^{-1}$	0,087			21
55	$0,2214 \text{ mg L}^{-1}$	0,049			12
40	$0,1661 \text{ mg L}^{-1}$	0,028			7
30	$0,1245 \text{ mg L}^{-1}$	0,016			4
15	$0,0934 \text{ mg L}^{-1}$	0,009			1
		1,1088	480,0000	2,5197	194,0434

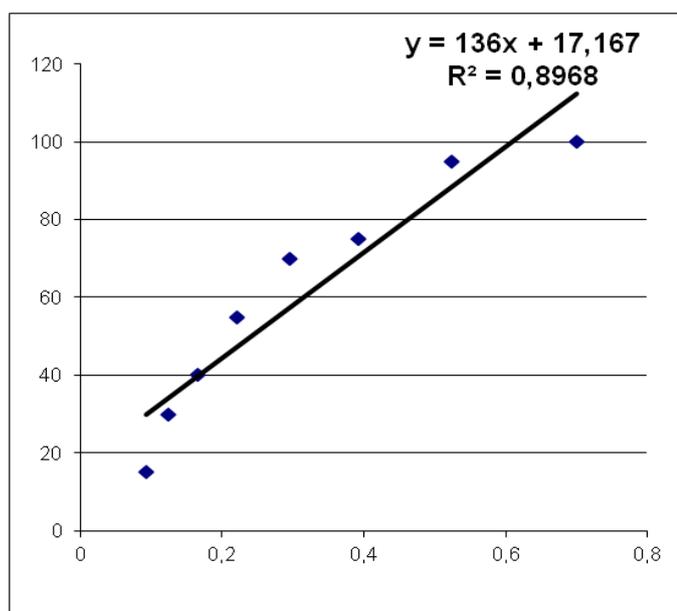


Gráfico 1 - Equação da reta e r^2 - Cádmio

Comparando o valor máximo estabelecido no CONAMA 430 para esse metal ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) e considerando a $CE(I)_{50}$ encontrada neste teste, e a média dos 5 testes realizados com o Cádmiu, aproximadamente $0,31 \text{ mg L}^{-1}$, verificamos que o organismo *Daphnia magna* possui uma maior sensibilidade a esse metal, obtendo resultados próximos de $CE(I)_{50}$, mas todos superiores ao determinado pela legislação. A $CE(I)_{50}$ do cádmio para o microcrustáceo *D. magna* encontrada por Qu et al. (2013) foi de $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ em pH próximo de 7.; sendo esse valor também superior ao determinado pela Resolução CONAMA nº 430 (CONAMA, 2011).

6.2 CROMO

Na tabela abaixo, seguem as concentrações utilizadas e os percentuais de imobilidade dos organismos, no primeiro teste realizado com o Cromo. No gráfico a seguir estão representados a equação da reta e o r^2 , com esses dados a $CE(I)_{50}$ obtida foi de $1,15 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 7 – Percentual de Imobilidade dos organismos expostos às concentrações de cromo

% de imobilidade	Concentração de Cr (mg L^{-1})	ΣX^2	Σy	ΣX	ΣXy
100	2 mg L^{-1}	4			200
90	$1,6 \text{ mg L}^{-1}$	3			144
80	$1,28 \text{ mg L}^{-1}$	2			102
50	$1,024 \text{ mg L}^{-1}$	1			51
20	$0,819 \text{ mg L}^{-1}$	1			16
0	$0,655 \text{ mg L}^{-1}$	0			0
0	$0,524 \text{ mg L}^{-1}$	0			0
		10,6213	340,0000	7,9020	513,9800

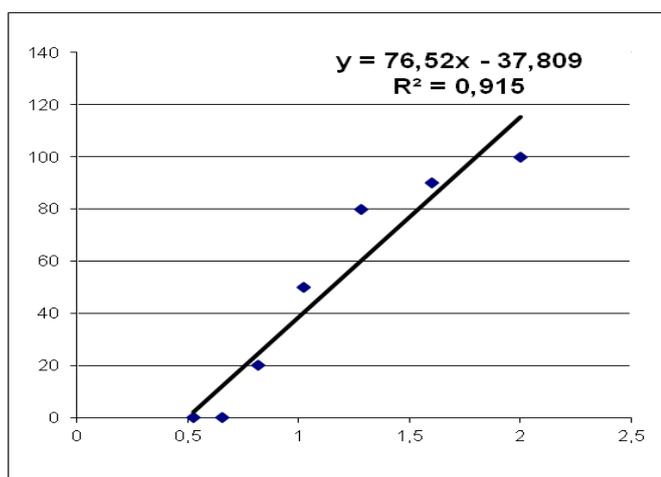


Gráfico 2 - Equação da reta e r^2 - Cromo

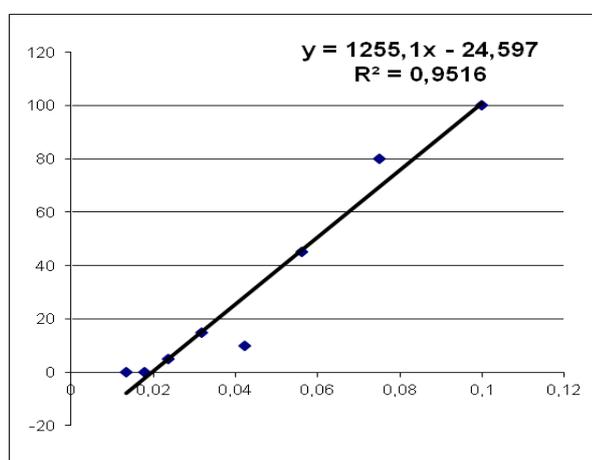
O resultado obtido de $CE(I)_{50}$ neste primeiro teste e a média obtida nos 5 testes realizados (aproximadamente $1,37 \text{ mg L}^{-1}$) são mais de 10 vezes superiores aos valores definidos para concentração máxima de metais em efluentes líquidos do CONAMA 430 ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Portanto, neste contexto, os organismos *Daphnia magna* apresentam uma resistência elevada em relação ao metal Cromo, quando comparado com o estabelecido pela legislação. Verifica-se, dessa forma, que os valores estabelecidos pela Resolução 430 não se adéquam a todos os organismos bioindicadores.

6.3 COBRE

A tabela abaixo apresenta os percentuais de imobilidade dos organismos e as concentrações utilizadas de Cobre, no primeiro teste realizado para este metal. No gráfico estão representados a equação da reta e o r^2 , para esses valores a $CE(I)_{50}$ obtida foi de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 8 – Porcentual de Imobilidade dos organismos expostos às concentrações de cobre

% de imobilidade	Concentração de Cu (mg L ⁻¹)	ΣX^2	Σy	ΣX	ΣXy
100	0,1 mg L ⁻¹	0,010000			10,0000
80	0,075 mg L ⁻¹	0,005625			6,0000
45	0,05625 mg L ⁻¹	0,003164			2,5313
10	0,0421875 mg L ⁻¹	0,001780			0,4219
15	0,0316406 mg L ⁻¹	0,001001			0,4746
5	0,0237305 mg L ⁻¹	0,000563			0,1187
0	0,0177979 mg L ⁻¹	0,000317			0,0000
0	0,0133484 mg L ⁻¹	0,000178			0,0000
		0,0226	255,0000	0,3600	19,5464

Gráfico 3 - Equação da reta e r² - Cobre

Comparando o valor máximo estabelecido pela legislação ambiental, Resolução 430 (CONAMA, 2011) para esse metal de 1,0 mg L⁻¹ e considerando a CE(I)₅₀ encontrada neste teste (0,06 mg L⁻¹), e a média dos 5 testes realizados com o cobre, aproximadamente 0,0525 mg L⁻¹, podemos verificar que o organismo *Daphnia magna* possui uma sensibilidade muito elevada a esse metal, obtendo resultados de CE(I)₅₀ inferiores aos estabelecidos pelo CONAMA.

Mesmo a média de CE(I)₅₀ encontrada nos testes ter sido bem abaixo do permitido pela Resolução n^o 430 do CONAMA (CONAMA, 2011), Arambasic et al. (1994) encontraram uma CE(I)₅₀ à *D. magna* de 1,26 x 10⁻⁶ mg L⁻¹ para o CuSO₄, com 48 horas de exposição, um valor 10.000 vezes menor do que o encontrado

nesse estudo, essa diferença pode ser atribuída ao tempo de exposição e ao Cobre estar associado ao Sulfato no teste.

Também deve se levar em consideração que, mesmo em condições experimentais idênticas, os resultados obtidos podem ser diferentes unicamente por conta da possibilidade de lotes diferentes de *Daphnia* serem utilizados. Isso pode até mesmo influenciar a fixação dos limites admissíveis legislativos para os metais pesados envolvidos (MUNZINGER; MONICELLI, 1990).

6.4 CARTAS CONTROLE

A faixa de sensibilidade para os organismos aos metais é definida pelas cartas controle. Para isso foram realizados 5 testes para cada metal, conforme modelo USEPA (1985)

O modelo descreve que, para o limite máximo deve ser considerado: a média (\bar{x}), um limite máximo que pode ser definido como a média (\bar{x}) mais dois desvios padrão ($\bar{x} + 2s$) e, para o limite mínimo a média menos dois desvios padrão ($\bar{x} - 2s$). Para a obtenção destes resultados aplicaram-se os testes estatísticos de dispersão, onde se obteve a média e a equação da reta e o coeficiente de correlação (r^2).

Para melhor entendimento, os gráficos a seguir mostram a carta controle, com limites calculados, os mesmos estabelecem uma faixa onde os resultados encontrados tem validade estatística. O limite superior é representado em vermelho, já o limite inferior em amarelo, e a concentração permitida pela resolução 430 (CONAMA, 2011) em azul, e ainda a média encontrada de $CE(I)_{50}$ em verde.

6.4.1 CARTA CONTROLE DO METAL CÁDMIO

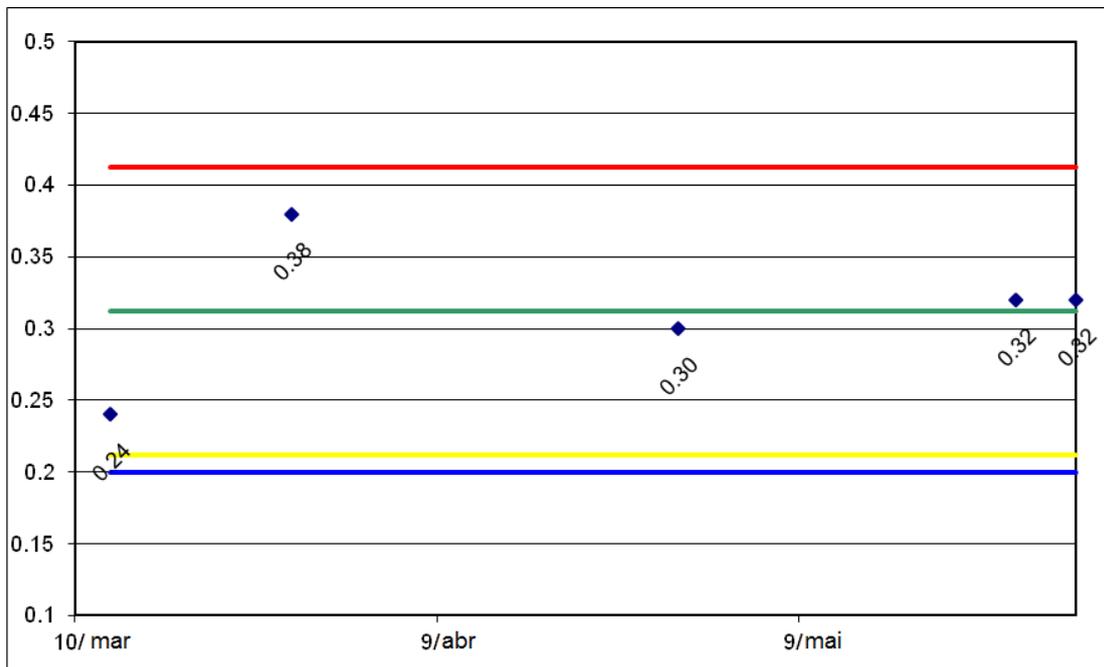


GRÁFICO 4 - Carta Controle - Cádmio

6.4.2 CARTA CONTROLE DO METAL CROMO

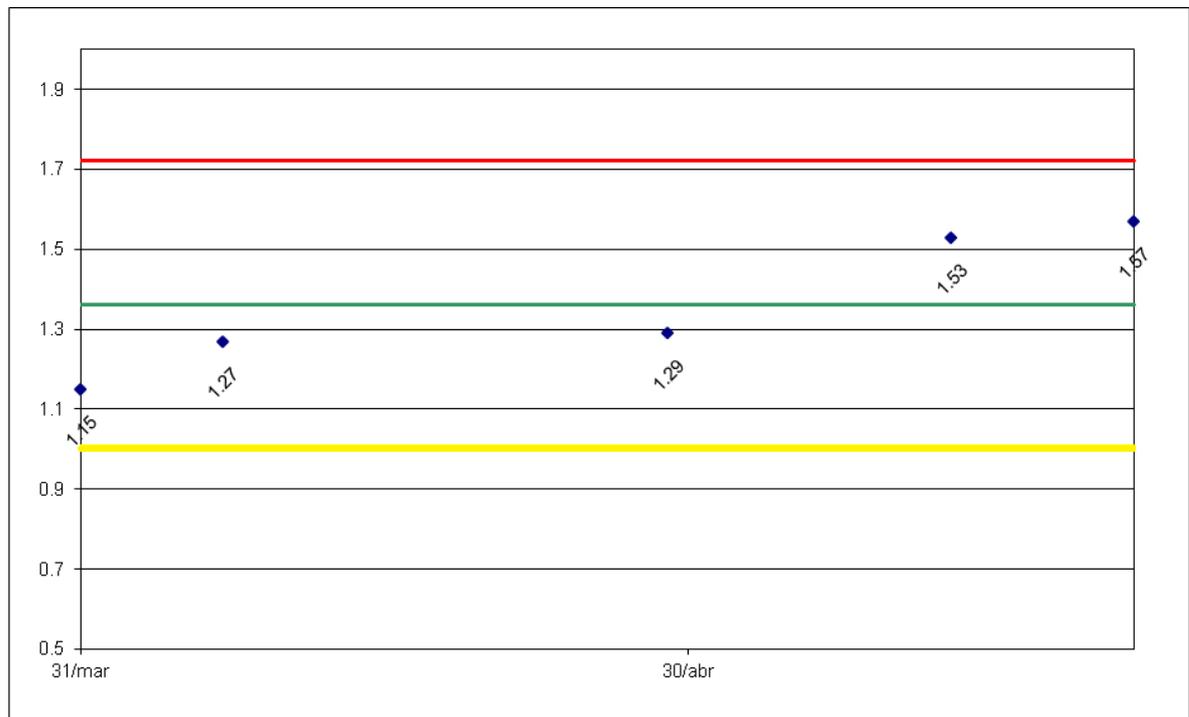


GRÁFICO 6- Carta Controle - Cromo

6.4.3 CARTA CONTROLE DO METAL COBRE

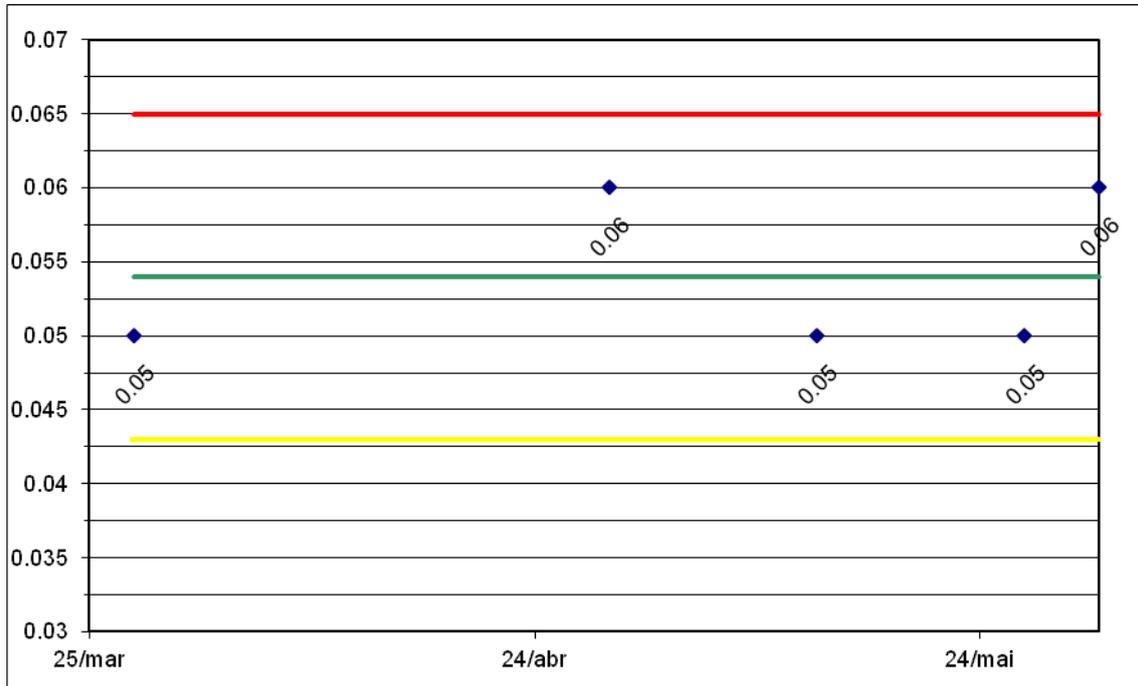


GRÁFICO 5 - Carta Controle - Cobre

6.4.4 CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE

Para comprovar os resultados, obteve-se a carta controle de sensibilidade, que foi realizada desde fevereiro de 2015. Como substância de referência foi utilizada o Dicromato de Potássio (100 mg L^{-1}). A carta controle traz a média das $CE(I)_{50}$ obtidas e os limites superiores e inferiores, encontrados a partir do desvio padrão.

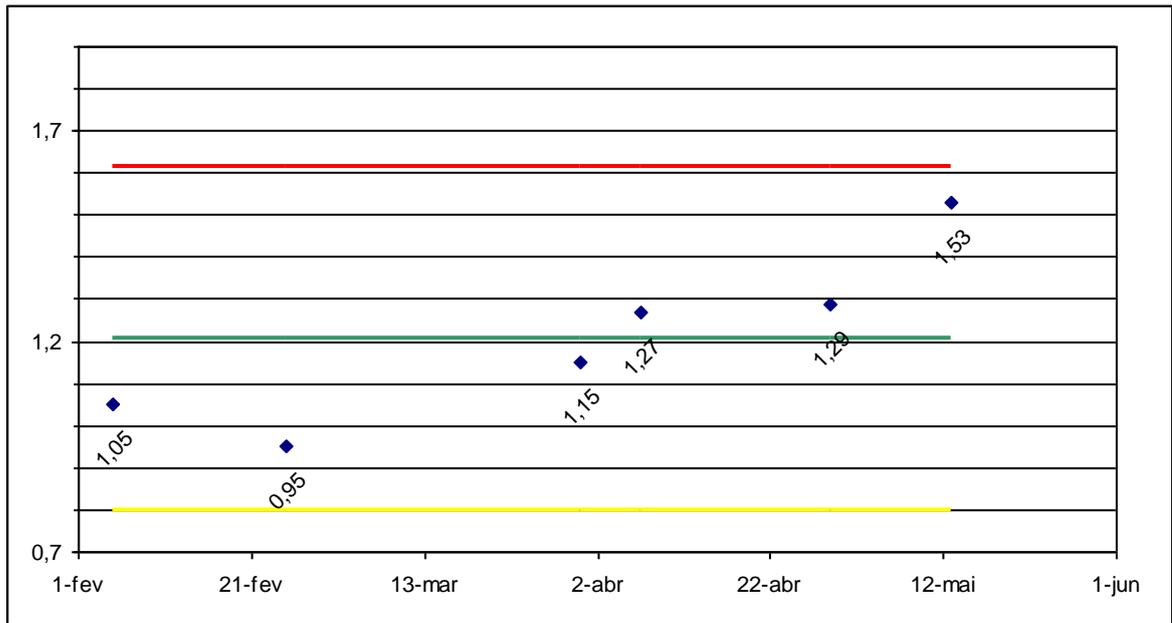


GRÁFICO 7- Carta Controle de Sensibilidade

7. CONCLUSÃO

A resolução 430 (CONAMA, 2011) leva em consideração o ambiente aquático como um todo, e não somente um organismo em questão, portanto, conclui-se que para o organismo teste *D. magna* os valores estabelecidos como limites para descarte de efluentes não estão de acordo com a toxicidade mostrada.

D. magna se mostrou muito sensível para alguns metais e mais resistente a outros. A concentração máxima permitida pela Resolução 430 (CONAMA, 2011) mostrou 100% de imobilidade nos organismos nos testes realizados com Cobre, por exemplo, e houve a necessidade de trabalhar com limites inferiores. Para outros casos, o limite estabelecido pelo CONAMA 430/2011 se aproximou da toxicidade encontrada, porém vale lembrar que metais são bioacumulativos no ambiente, e o teste utilizado foi agudo e não crônico. Apesar de termos definido a sensibilidade deste organismo a vários metais, um teste crônico com metais traria resultados mais significativos.

No caso do metal Cádmio a concentração limite estabelecida pela Resolução 430 do CONAMA está próxima da nossa margem de desvio inferior, ou seja, as outras $CE(I)_{50}$ encontradas se mostraram pouco maiores do que este limite, o que quer dizer que o organismo *Daphnia magna* é relativamente resistente a soluções testadas, por se considerar uma diferença pequena em termos estatísticos.

Além disso, os testes foram realizados para valores individuais de concentrações de metais, sendo interessante a realização de testes visando identificar sinergismos entre metais, o que pode influenciar significativamente nos valores limites estabelecidos pela Resolução. É necessário definir os limites específicos de cada organismo, para assim chegar a um limite aceitável e abrangente para todos os organismos aquáticos.

De uma forma geral os resultados encontrados apontam o organismo *Daphnia magna* como um bioindicador inapropriado para a realização de testes de ecotoxicidade em algumas soluções de metais, com níveis de $CE(I)_{50}$ muito acima, ou muito abaixo dos valores máximos permitidos estipulados pela legislação ambiental vigente, a Resolução 430 (CONAMA, 2011), mostrando assim sua grande sensibilidade às soluções de metais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA Edna S.; ROSA Edson V. C.; PAIXÃO Joana F.; **Avaliação da Legislação para lançamento de efluentes em relação à ecotoxicidade.** IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, IBEAS, Salvador, nov. 2013.

ALVES, Ana C. B.; SILVANO, Jacira. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao Dicromato de Potássio. **Revista. Inst. Adolfo Lutz.**, São Paulo, v.65, n.1, 2006.

ANDREW, R. W.; BIESINGER, K. E.; GLASS, G. E.; **Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*.** Water Research, Great Britain, v.11, p.309, Sept. 1976.

ARCHARYA, Kumud; SCHULMAN, Candi; YOUNG, Michael H.; Physiological response of *Daphnia magna* to linear anionic polyacrylamide: Ecological implications for receiving waters. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.212, p. 309-317, oct. 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

ASSOCIAÇÃO DAS EMPRESAS DE SANEAMENTO BÁSICO ESTADUAIS (AESBE). **Proposta complementar à resolução Conama nº 357/2005 sobre condições e padrões de lançamento de efluentes para o setor de saneamento em atendimento à resolução Conama nº 397/2008.** Brasília, nov. 2009. 28 p.

BAIRD, Colin.; **Química Ambiental**; tradução Maria Angeles Lobo Recio; Luiz Carlos Marques Carrera. 4-ª Ed. – Porto Alegre: Bookman. 622p. 2011

BERTOLETTI, Eduardo. **A presunção ambiental e a ecotoxicologia aquática.** Revista das Águas, São Paulo, n.12, nov. 2012

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Dispõe sobre Critérios e Padrões de ecotoxicidade para o Controle de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Paraná.** Paraná, p.9, set. 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução n° 357, de 17 de março de 2205, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.** Brasil, p. 9, mai. 2011.

ELENDT, B.P., BIAS, W.R. **Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*.** *Water Research.*, vol. 24, p. 1157-1169, 1990

FATMA; **Relevância dos parâmetros de qualidade da água aplicados à águas correntes. Parte I: Características gerais, nutrientes, elemento-traço e substâncias nocivas inorgânicas, características biológicas.** Fundação do meio ambiente de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

GEORGE L. Bowie; **Rates, Constants and kinetics formulations in surface water quality moleling (Secund edition)** USEPA/600/3-85/040 june 1985

Instituto Ambiental do Paraná (2011) **Qualidade da água da bacia hidrográfica do alto Iguaçu.**- Curitiba: IAP.246p

Instituto Ambiental do Paraná (1997) **MANUAL DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE** – Curitiba: Repidisca 2104. 90p.

ISO 6341. Water quality. **Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).** Acute toxicity test. 2012.

JONES J. R. E.; **Antagonism between salts of the heavy and alkaline-earth metals in their toxic action on the tadpole of the toad (L).** *J. expl. Biol.* 16, 313-333, 1939.

KNIE, J.L.W.; LOPES E.W.B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** – Florianópolis: FATMA/GTZ. 289p. 2004

LITHNER, Goran; **Some fundamental relationships between metal toxicity in freshwater, physico-chemical properties and background levels.** *The Science of the Total Environment*, Amsterdam, v.87-88, p. 365-380, 1989.

LUTKE, M.; **Determinação da faixa de sensibilidade da *Daphnia magna* frente ao dicromato de potássio em água de fonte natural e água potável desclorada.** Curitiba, 1993

MANCY K. H. and Alien H. E.; **Physical and chemical aspects of copper and other heavy metals bioassays.** U.S. Environmental Protection Agency, Research Contract No. 14-12-591. Univ. of Mich., School of Public Health, 1976.

MILAN B. ARAMBASIC et al. **Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *allium cepa* l., *lepidium sativum* l. And *daphnia magna* st.: comparative investigations and the ractical applications.** Institute, Quality Control Center, Biological Laboratory, YU-11.000 Beograd, 29. Nov 1994, Yugoslavia.

MOUNT D. I.; **The effect of total hardness and pH on acute toxicity of zinc to fish.** Air & War. Poll. Int. J. 10, 49-56, 1966.

MUNZINGER, Armin; MONICELLI, Franco; **A Comparison of the Sensitivity of Three *Daphnia magna* Populations under Chronic Heavy Metal Stress.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 22, p. 24-31, Aug.1990.

ROCHA, J. C.; ROSA A. H.; CARDOSO A. A. (2009) **Introdução à Química Ambiental – 2ª Ed. – Porto Alegre: Bookman. 256p.**

ROSINI, Wladiana O. M.; SANTOS, Mirian C.; NÓBREGA, Joaquim A.; **Resolução Conama nº 357 e técnicas espectroanalíticas: Meios adequados aos fins?** Revista Analytica, São Carlos, n. 22 , Abr. Mai.2006.

R.-J.Qu, et al. **The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels.** State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Xianlin Campus, Nanjing University, Nanjing 210023, Jiangsu, PR China May 2013.

SANTI, Thais. Série Seminário Meio Ambiente. **Ecotoxicidade e Legislação.** O Papel, São Paulo: Fev, 2013, p. 20-22

SANTOS, Fernanda A.; PIRES, Marçal J.R ;CANTELLI, Marlize. **Tratamento de efluente de galvanoplastia por meio da Biossorção de Cromo e Ferro com escamas da pinha da *Araucaria angustifolia*.** Revista. Esc. Minas, Ouro Preto, v. 64, n. 4, Oct.Dec. 2011.

STEEMAN Nielsen E., Kamp-Nielson L. and Wium-Ander- son S.; **Effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*.** Phys. Plant. 22. 1121-1133, 1969.

STUMM W. and Morgan J. J.; **Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters**. pp. 268-269. Wiley-Interscience, New York, 1970.

USEPA. 1985. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms**. 3rd.ed. Environmental Monitoring and Support Laboratory. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. EPA 600/4-85/013.

WANG, Wuncheng; **Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms overview**. The Science of the Total Environment, Amsterdam, v.13, p. 437-457, Nov.1987.