

**UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AUDITORIA AMBIENTAL**  
**MESTRADO EM AUDITORIA AMBIENTAL**

**MIKE DE SOUZA MOREIRA**

**EFEITOS BIOLÓGICOS ADVERSOS DOS ORGANISMOS *POECILIA VIVIPARA* E  
*DAPHNIA SIMILIS* APÓS A EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DOMÉSTICO TRATADO**

**SANTOS/SP**

**2020**

**MIKE DE SOUZA MOREIRA**

**EFEITOS BIOLÓGICOS ADVERSOS DOS ORGANISMOS *POECILIA VIVIPARA* E  
*DAPHNIA SIMILIS* APÓS A EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DOMÉSTICO TRATADO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Santa Cecília como  
parte dos requisitos para obtenção de  
título de mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Auditoria Ambiental,  
sob a orientação do Prof. Dr. Bruno  
Lopes da Silva Ferrette (UNISANTA)  
e coorientação da Profa. Dra. Olívia  
Cristina Camilo Menossi (FURG).

**SANTOS/SP**

**2020**

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

571.95 Moreira, Mike de Souza  
M838e Efeito biológicos adversos dos organismos *Poecilia vivipara* e *Daphnia similis* após a exposição ao efluente doméstico tratado/Mike de Souza Moreira. 2020. N. fls. 38.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Lopes da Silva Ferrette.  
Coorientadora: Profa. Olívia Cristina Camilo Menossi.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Auditoria Ambiental, Santos, SP, 2020.

1. Bertioga. 2. Rio Itapanhaú. 3. Ecotoxicologia. 4. Impacto ambiental. 5. Recursos Hídricos. I. Ferrette, Bruno Lopes da Silva. II. Menossi, Olívia Cristina Camilo. III. Moreira, Mike de Souza IV. Efeito biológicos adversos aos organismos *Poecilia vivipara* e *Daphnia similis* após a exposição ao efluente doméstico tratado.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu pai e a minha mãe, com todo o meu amor e gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Karina Faria Santos, minha namorada, pelos momentos que passamos juntos, momentos alegres, felizes, pela paciência, pela compreensão, pelo respeito, pelo carinho, pelo apoio na pesquisa e na vida. Muito obrigado!!!

À Professora Doutora Olívia Cristina Camilo Menossi meus agradecimentos especiais pelos ensinamentos, pela paciência, pela confiança creditada, pela ajuda incondicional, durante toda pesquisa, sua contribuição foi fundamental, muitas vezes abdicando do tempo em família com esposo e filho para concretizar este projeto. Muito obrigado!!!

À minha família pelo incentivo, apoio e por entenderem minha ausência nos eventos familiares.

Ao meu orientador, Professor Doutor Bruno Lopes da Silva Ferrette, pelas orientações e conhecimentos compartilhados.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília onde foram conduzidos todos os experimentos laboratoriais.

Ao Professor Doutor Fernando Sanzi Cortez e ao Estagiário Lucas Franco e Almeida pelo apoio durante os experimentos laboratoriais e troca de conhecimentos.

Aos membros da banca de qualificação: Professor Doutor Camilo Dias Seabra Pereira e Professor Doutor Fernando Sanzi Cortez, e de defesa final: Professor Doutor Fábio Hermes Pusceddu e a Professora Doutora Luciane Alves Maranhão, pelas valorosas contribuições para a dissertação, e artigo científico.

A Prefeitura do município de Bertioga por ceder a infraestrutura necessária para os ensaios com as larvas de peixe.

Aos amigos e colegas, que me incentivaram todos os dias e ofereceram apoio nos momentos críticos.

## EPÍGRAFE

*“Qualquer idiota pode fazer coisas cada vez mais complexas. É preciso um toque de gênio e muita coragem para se mover na direção oposta.”*

*Charles Darwin*

## RESUMO

Os efluentes oriundos das estações de tratamento de esgoto são geralmente despejados em rios, estuários e oceanos. Com o aumento da população humana, esse volume tende a ser cada vez maior, fazendo-se necessário estudos que avaliem os impactos causados nos ecossistemas aquáticos bem como em sua biota. Efluentes tratados contêm carga de matéria orgânica e componentes sintéticos, que apresentam uma gama de xenobióticos que ocasionam efeitos negativos sobre a biodiversidade aquática. Os testes ecotoxicológicos são utilizados para avaliar os impactos em ambientes aquáticos, sendo o microcrustáceo *Daphnia similis* e o peixe *Poecilia vivipara* modelos biológicos amplamente empregados nesses estudos. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do despejo de efluente doméstico tratado nestes dois organismos quando expostos à diferentes gradientes de concentração de efluente tratado (100%, 75%, 50%, 25%, 0%), visando avaliar os efeitos em sua reprodução, sobrevivência e alterações histopatológicas no tecido branquial das larvas de peixe. Para os ensaios com o microcrustáceo *D. similis*, adotamos as diluições (100%, 75%, 50%, 25%, 10% e 0%), para no teste agudo avaliar a imobilidade e mortalidade enquanto no teste crônico avaliar a reprodução do número de neonatas por fêmea. A exposição ao efluente tratado nas diluições 100% e 75% ocasionou mortalidade dos organismos e promoveu alterações nos tecidos branquiais das larvas de *P. vivipara* em todas as diluições testadas. Os dados de CE<sub>50</sub> para níveis de toxicidade nos ensaios com os organismos *Daphnia* spp. caracterizaram-se como moderadamente tóxica e, quando diluído (10%, 25% e 50%), o efluente tratado não afetou a sobrevivência desses organismos e ocasionou acréscimo na taxa de reprodução. Desta maneira, reforçamos que são necessárias mais pesquisas conduzidas tanto *in situ* quanto testes laboratoriais, visando compreender de forma holística as consequências que o despejo do efluente tratado neste ponto do Rio Itapanhaú e em seu entorno.

**Palavras Chave:** Bertioga. Rio Itapanhaú. Ecotoxicologia. Impacto ambiental. Recursos Hídricos.

## ABSTRACT

Effluents from sewage treatment plants are generally discharged into rivers, estuaries and oceans. With the increase in the human population, this volume tends to be increasingly larger, making it necessary studies that assess the impacts caused on aquatic ecosystems as well as on their biota. Treated effluents contain loads of organic matter and synthetic components, which have a range of xenobiotics that cause negative effects on aquatic biodiversity. Ecotoxicological tests are used to assess impacts on aquatic environments, with the microcrustacean *Daphnia similis* and the fish *Poecilia vivipara* biological models widely used in these studies. In this sense, this study aimed to evaluate the effects of the discharge of treated domestic effluent in these two organisms when exposed to different gradients of concentration of treated effluent (100%, 75%, 50%, 25%, 0%), to evaluate the effects on their reproduction, survival and histopathological changes in the branchial tissue of fish larvae. For the tests with the microcrustacean *D. similis*, we adopted the dilutions (100%, 75%, 50%, 25%, 10% and 0%), in order to evaluate immobility and mortality in the acute test while in the chronic test to evaluate the reproduction of the number of neonates per female. Exposure to treated effluent at 100% dilutions and 75% occasional mortality of the organisms and promoted changes in the branchial tissues of *P. vivipara* larvae in all tested dilutions. The EC50 data for toxicity levels in trials with *Daphnia* spp. they were characterized as moderately toxic and, when diluted (10%, 25% and 50%), the treated effluent did not affect the survival of these organisms and caused an increase in the reproduction rate. In this way, we reinforce the need for more research conducted both in situ and laboratory tests, in order to understand in a holistic way the consequences that the discharge of the treated effluent in this point of the Itapanhaú River and in its surroundings.

**Palavras Chave:** Bertioga. Rio Itapanhaú. Ecotoxicologia. Impacto ambiental. Recursos Hídricos.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de tratamento com lodo ativado .....	2
Figura 2. Mapa de Bertioga com destaque para local de estudo.....	5
Figura 3. Fotos do ensaio de toxicidade aguda .....	8
Figura 4. Fotos do ensaio de toxicidade crônica .....	9
Figura 5. Cortes de filamentos branquiais de larvas <i>P. vivipara</i> . A: Grupo controle: 1. Lamela branquial, 2. Filamento branquial; B: 25% Efluente: 3. Espessamento do tecido proliferativo filamentar e lamelar; C: 50% Efluente: 4. Descolamento epitelial; D: 50% Efluente: 5, Hiperplasia; E: 75% Efluente: 6. Aneurisma, 7. Fusão lamelar F: 100% Efluente: 7. Fusão lamelar. Coloração: HE. 400x.....	11
Figura 6. Total de neonatas <i>D. similis</i> (média ± desvio padrão) imóveis/mortas após exposição ao efluente tratado em diferentes diluições por 48 horas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as diluições testadas.....	12
Figura 7. Total de neonatas por fêmea de <i>D. similis</i> (média ± desvio padrão) após exposição ao efluente tratado em diferentes diluições por 21 dias. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as diluições testadas.....	13

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos utilizados para obtenção dos resultados para os parâmetros de qualidade de água avaliados.....	6
Tabela 2 - Resultado dos parâmetros de qualidade de água avaliados no efluente coletado (OD: Oxigênio Dissolvido; NH <sub>3</sub> : Amônia; NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> : Nitrito; NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : Nitrato; (PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> : Fosfato; CT: (Coliformes termotolerantes); pH: potencial hidrogeniônico).....	10
Tabela 3 - Mortalidade final (%) das larvas de <i>Poecilia vivipara</i> após 96h de exposição ao efluente doméstico tratado. DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação.....	10
Tabela 4 - Mortalidade (%) (média ± desvio padrão) de neonatas de <i>D. similis</i> após exposição ao efluente nas concentrações testadas por 48h.....	12

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	–	Porcentagem
°C	–	Grau Celsius
µL	–	Microlitro
“S	–	Coordenada geográfica referente a direção Sul
“W	–	Coordenada geográfica referente a direção Oeste
ABNT	–	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CE		Concentrações de Efeito
CETESB	–	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CEUA	–	Comitê de Ética em Uso de Animais
CONAMA	–	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAEE	–	Departamento de Água e Energia Elétrica
DBO	–	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	–	Demanda química de Oxigênio
h		Horas
m <sup>3</sup>	–	Metro Cúbico
mg	–	Miligrama
mg/L		Miligrama por Litro
mL	–	Mililitro
mm		Milímetros
NBR	–	Norma Técnica Regulamentadora
Ng	–	Nanogramos
NMP/mL		Número Mais Provável por Mililitro
OD	–	Oxigênio Dissolvido
pH	–	Potencial Hidrogeniônico
SABESP	–	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo.
SMEWW	–	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>
TSK	–	<i>Trimmed Spearman-Kärber</i>
UGRHs	–	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
UNISANTA	–	Universidade Santa Cecília

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>10</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>17</b>
<b>COMPROVANTE DE ENVIO DE RELATÓRIO TÉCNICO.....</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>26</b>

## INTRODUÇÃO

O ecossistema aquático é altamente suscetível à poluição, assim como os organismos que o habitam e a deposição de poluentes em sistemas hídricos, mesmo que temporariamente e em baixas concentrações, contribui para a sua contaminação, uma vez que há uma tendência de acumulação dessas substâncias nos sedimentos e nos organismos aquáticos (DIAMOND et al., 2018; CAPPARELLI et al., 2019). Em regiões estuarinas, os organismos aquáticos são cada vez mais expostos a uma grande gama de compostos químicos, liberados em quantidades crescentes, devido à contínua expansão das atividades humanas (LI et al., 2016; GARBOSSA et al., 2016).

O rápido crescimento populacional, muitas vezes de forma desordenada, irregular e ilegal, afeta os ambientes marinhos e estuarinos resultando em alterações dos ciclos biogeoquímicos e na perda de biodiversidade (LINDEBOOM, 2002; CAMPANHA et al., 2010, MEDEIROS et al., 2012) e também, na deterioração dos ecossistemas e a perda de habitats como consequências destas ocupações (XUEMEI et al; 2014; VERAS et al., 2019). Além disso, fatores como a alta densidade populacional e a extração da água para o consumo aliados a precariedade da infraestrutura de saneamento (MEDEIROS et al., 2017) estão correlacionadas com a transmissão de doenças aos seres humanos (MITOSO et al., 2016). Assim, a preocupação com o meio ambiente e a poluição dos recursos hídricos tornou-se um problema de interesse público, atrelado ao fato de carência de políticas públicas para o setor e ausência de mecanismos de controle e fiscalização destes agentes poluidores (POSSETTI et al., 2017). Portanto, existe a necessidade do monitoramento ambiental dos corpos d'água, visando compreender as interações entre os poluentes e os seres vivos, bem como sua suscetibilidade aos poluentes (LINDE-ARIAS et al., 2008).

Apesar do direito humano à água e ao saneamento básico, definidos pela Assembleia Geral das Nações Unidas (2010), a qual o Brasil é signatário, a coleta e o tratamento de águas residuárias ainda não são supridos de maneira adequada (STEPPING, 2016), desta forma, parte do efluente não é coletado ou não recebe tratamento. Porém, parte destes efluentes recebe tratamento realizado por uma Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), sendo esse efluente caracterizado por uma mistura complexa de substâncias que se fundem e são liberadas no meio

ambiente após sua degradação e transformação (DIAMOND et al., 2011; OHLINGER et al., 2013; COORS et al., 2018) e a sua toxicidade está associada ao método de tratamento empregado, o tamanho da população e o regime climático da região (DIAMOND et al., 2011).

O tratamento de efluentes pelo método de lodo ativado (Figura 1) é eficaz na remoção de produtos químicos e fármacos muitas vezes superior aos outros tipos de tratamento, por exemplo, filtro por gotejamento e lagoas de decantação (GULKOWSKA et al., 2008; KASPRZYK-HORDERN et al., 2009). Porém, Gotvajn et al. (2009) ressaltam que mesmo os sistemas mais modernos de tratamento de efluente não são capazes de eliminar totalmente a ação de algumas substâncias xenobióticas inibidoras biológicas e genotóxicas, ocasionando danos à biodiversidade presente no corpo receptor dos efluentes. Assim, devido à preocupação com a destinação final do efluente, deve-se levar em consideração além das análises químicas do perfil desta água, a toxicidade biológica e a presença de fármacos (TONKES et al.; 1999, JORDÃO e PESSÔA, 2008, VERAS et al., 2019).

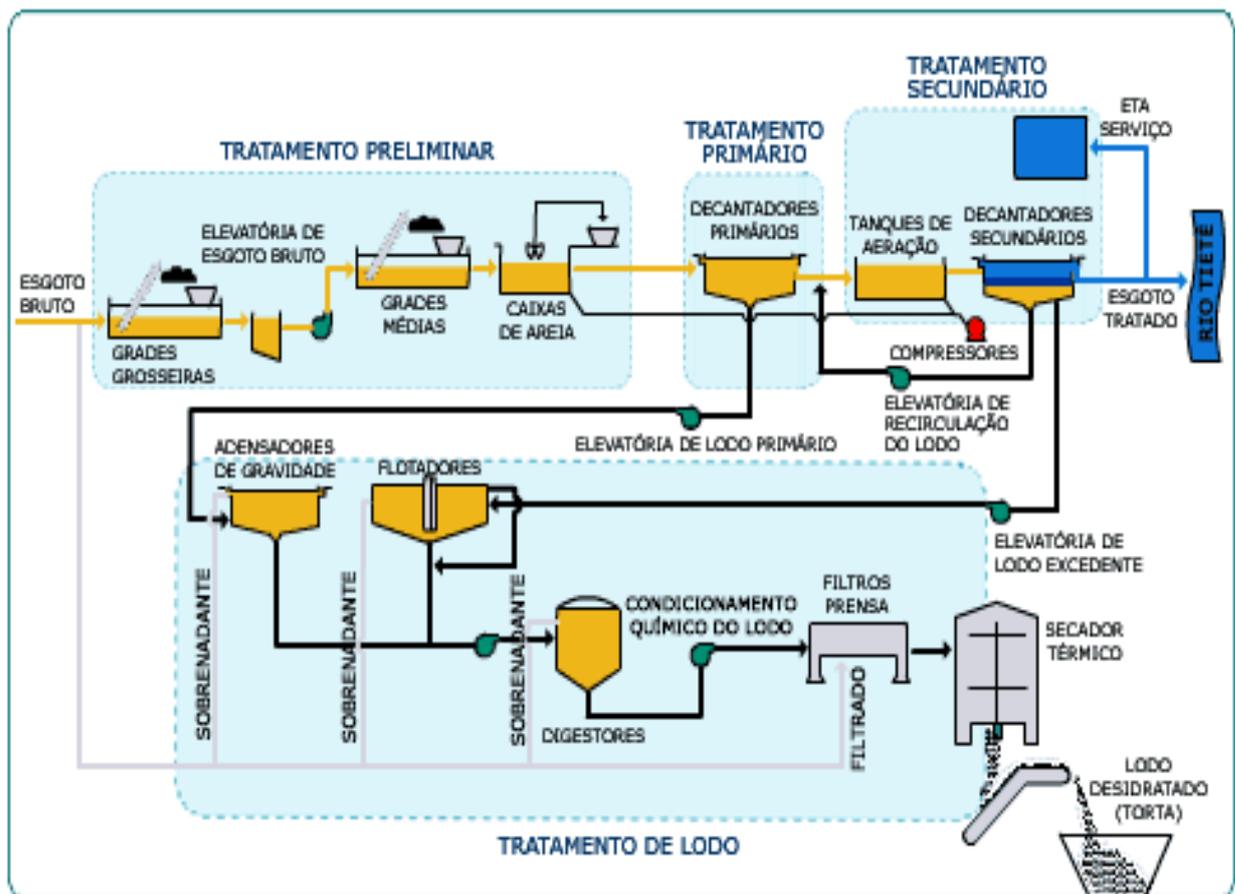


Figura 1. Modelo de tratamento com lodo ativado.

Fonte: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP)

Nesse sentido, a condução de testes de toxicidade de efluentes visam avaliar os efeitos potencialmente tóxicos sobre os organismos aquáticos (RA et al., 2006). Testes ecotoxicológicos realizados com o próprio efluente são reconhecidamente bons indicadores da sua qualidade, podendo ser avaliado o efeito tóxico resultante da interação entre as substâncias nele presentes, além de levar em consideração a biodisponibilidade dos contaminantes (RA et al., 2006; BERTOLETTI, 2013).

Os bioensaios são amplamente utilizados para avaliar os efeitos da introdução de xenobióticos em corpos aquáticos, sejam eles oriundos de efluentes doméstico, industrial ou de acidentes ecológicos. Em testes realizados com organismos vivos, pode-se observar efeitos agudos e crônicos. O primeiro denominado efeito agudo apresenta respostas rápidas e severas, geralmente associadas a concentração das substâncias tóxicas presentes na amostra testada, sendo capazes de levar a morte dos indivíduos em um curto período. Já o segundo denominado efeito crônico, refere-se a resposta observada a um estímulo a longo prazo, geralmente observado em situações em que as concentrações tóxicas permitem a sobrevivência dos organismos, porém podem afetar suas funções biológicas a médio e longo prazos (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

Alguns organismos bioindicadores são amplamente utilizados nestes testes e resultados obtidos com mais de uma espécie são mais confiáveis (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; BERTOLETTI, 2013), avaliando com maior segurança os possíveis impactos no corpo receptor. Dentre os organismos comumente utilizados nesses bioensaios, podemos citar o microcrustáceo, pulga d'água *Daphnia similis* (Claus, 1876) e o peixe guarú ou barrigudinho *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider, 1801). As *Daphnia* spp. são organismos de água doce, abundantes em águas continentais, com tamanho médio de 0,5 a 5,0 mm de comprimento. Geralmente, apresentam reprodução partenogênica, onde as fêmeas produzem células diploides que originam outras fêmeas, geneticamente idênticas. Apresentam uma câmara incubatória na parte dorsal e as neonatas são liberadas para o ambiente após cerca de quatro dias, tornando-se capazes de reproduzir entre cinco a dez dias após o nascimento (BUIKEMA e SHERBERGER, 1977; EBERT, 2011; MINER et al., 2012; KOTOV, 2015).

A família Poeciliidae abriga cerca de 200 espécies, amplamente distribuída em países da América e África (LUCINDA, 2003). Os peixes desta família são amplamente utilizados em ensaios biológicos devido a sua alta prolificidade e curto

tempo de geração, resistência ao ambiente laboratorial (COOMAN et al., 2005; REZNICK et al., 2017, OLKOVA et al., 2018; LEE et al., 2019). A fase larval dos peixes caracteriza-se por ser uma etapa de rápido desenvolvimento ontogênico, alta taxa de crescimento específico e grande sensibilidade a alterações nos parâmetros de qualidade de água (WESTERNHAGEN, 1988). A avaliação da mortalidade e toxicidade na fase larval é de extrema relevância, uma vez que impactos ocasionados nessa etapa podem causar decréscimo na população adulta (OLKOVA et al., 2018; LEE et al., 2019).

Além da observação dos efeitos na sobrevivência dos peixes expostos à substâncias tóxicas, podemos utilizar os biomarcadores histológicos, pois são de baixo custo e eficientes para diagnosticar a condição vital dos peixes e, por consequência, avaliar a condição ambiental dos ecossistemas aquáticos (PEREIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016). Por meio da histologia, é possível avaliar os efeitos de poluentes orgânicos e inorgânicos sobre os peixes (SANTOS-FILHO et al., 2014) e observar resultados significativos quanto ao efeito da exposição desses organismos em condições estressoras do ambiente que habitam (YANCHEVA et al., 2015).

Muitos autores relatam alterações histológica em órgãos de peixes que vivem em ambientes contaminados ou em seu entorno (TRIEBSKORN et al., 2008; LUKIN et al. 2011; OLIVA et al., 2013; DANE & SISMAN, 2015) acometendo principalmente brânquias (DANE & SISMAN, 2015; VIEIRA et al., 2017), fígado (PAULO et al., 2012; JORDANOVA et al., 2016; VIEIRA et al., 2017), rins (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; HAMED et al., 2017), órgãos reprodutores (HARAYASHIKY et al., 2013; KAPTANER et al., 2016) e tecido ósseo (SLOOFF, 1982; WESTERNHAGEN et al., 1998; MUTLAK et al., 2018). Portanto, estudos histológicos podem elucidar alterações em tecidos orgânicos e, desta forma, a compreensão dos efeitos provocados pela exposição a águas contaminada gerando informações sobre a qualidade dos corpos d'água bem como o impacto ocorrido sobre as espécies de peixes residentes em áreas com deposição de efluentes.

Assim, esse estudo visou verificar os efeitos do efluente tratado em organismos pertencentes a dois níveis tróficos diferentes, o microcrustáceo, pulga d'água (*Daphnia similis*) e larvas do peixe guaru (*Poecilia vivipara*) expostas experimentalmente à diferentes gradientes de efluente doméstico tratado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de estudo

O efluente tratado analisado é despejado pela companhia responsável pelo tratamento de esgoto municipal no rio Itapanhaú, no ponto de coleta (23°49'02.2"S 46°09'08.0"W) (Figura 2), através de tubulação na margem do rio, ficando parcialmente submersa no momento da maré cheia. Segundo a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), o método utilizado para tratamento de esgoto na cidade é lodos ativados em batelada. O rio Itapanhaú localiza-se no Parque Estadual da Serra do Mar, situando-se na 7ª Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs) – da Baixada Santista no município de Bertioga-SP, sendo classificado pela CETESB (2018) como classe 1, aquele que suas águas, dentre outras destinações, podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado.

A coleta foi realizada dia 12 de maio de 2019, no final do período da tarde, por volta das 16h15, com boas condições do tempo. No momento da coleta, o rio Itapanhaú estava com maré baixa e o efluente doméstico tratado foi coletado diretamente da tubulação que desemboca no rio, sem que houvesse contato entre o efluente coletado da tubulação e o rio Itapanhaú. Na ocasião da coleta não era feriado no município de Bertioga-SP e o município possui uma população de 61.736 habitantes (CESTEB, 2018), ocasião em que há um aumento exponencial da sua população, devido estar localizada numa região litorânea.



**Figura 2. Ponto de coleta do efluente doméstico tratado.**

## Avaliação da qualidade de água

Concomitantemente à coleta do efluente doméstico tratado, foram coletadas alíquotas para avaliação dos parâmetros de qualidade de água utilizando-se frascos de vidro, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e enviadas para o laboratório de análise de água (Controle Analítico de Análises Técnicas Ltda, relatório nº 24418/2019). Os parâmetros avaliados e os métodos utilizados encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1. Métodos utilizados para obtenção dos resultados para os parâmetros de qualidade de água avaliados.**

Parâmetro	Método
<b>Demanda biológica de Oxigênio (DBO)</b>	SMEWW 5210B Ed. 22
<b>Demanda Química de Oxigênio (DQO)</b>	SMEWW 5220D Ed. 22
<b>Oxigênio dissolvido</b>	SMEWW 4550O-G
<b>Fosfato</b>	SMEWW 4500P Ed. 22
<b>Amônia</b>	SMEWW 4500 NH3 - F Ed. 22
<b>Nitrito</b>	HACH 8507 Ed. 10 <sup>a</sup>
<b>Nitrato</b>	HACH 8039 Ed. 9 <sup>a</sup>
<b>Coliformes termotolerantes</b>	SMEWW 9221 A, C Ed. 22

*SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*

## Material Biológico e delineamento experimental

O uso dos animais experimentais obedeceu às leis, diretrizes e políticas brasileiras de bem-estar animal, conforme a Lei Federal nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santa Cecília (UNISANTA), sob protocolo nº 06/2018. Os experimentos laboratoriais com as larvas de *Poecilia vivipara* foram conduzidos no município de Bertioga/SP e os demais experimentos laboratoriais com o microcrustáceo *Daphnia similis* foram conduzidos no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília (UNISANTA), no município de Santos/SP.

### *Poecilia vivipara* (Bloch & Schneider, 1801)

Para a avaliação da resposta dos organismos expostos ao efluente tratado em relação a taxa sobrevivência e a morfologia das brânquias, larvas de *P. vivipara*

obtidas a partir de desova natural foram cultivadas em água (pH  $7,0 \pm 0,4$  e  $27^{\circ}\text{C} \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ ) até atingirem o comprimento inicial de  $7,3 \pm 0,8\text{mm}$  e  $1,7 \pm 0,7\text{mg}$  de peso úmido, quando foram transferidas para as unidades experimentais (100 ml) para aclimação. Após 24 horas, substitui-se a água de cultivo pelas diluições do efluente testadas: 100%, 75%, 50%, 25% e 0% e mantidas por 96h de acordo com as diretrizes da Norma ABNT NBR ISSO 15088 (ABNT, 2016). Foi utilizada a água de cultivo dos organismos para obtenção das diluições do efluente e no controle negativo (0%). Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições cada e com quatro larvas por frasco, em sistema estático. Cada unidade experimental consistiu em um recipiente plástico, com volume total de 150 ml, preenchidos até o volume de 100 ml do efluente bruto ou nas diluições testadas. Permaneceram em banho-maria a fim da manutenção da temperatura. As larvas não foram alimentadas durante o período experimental (96h).

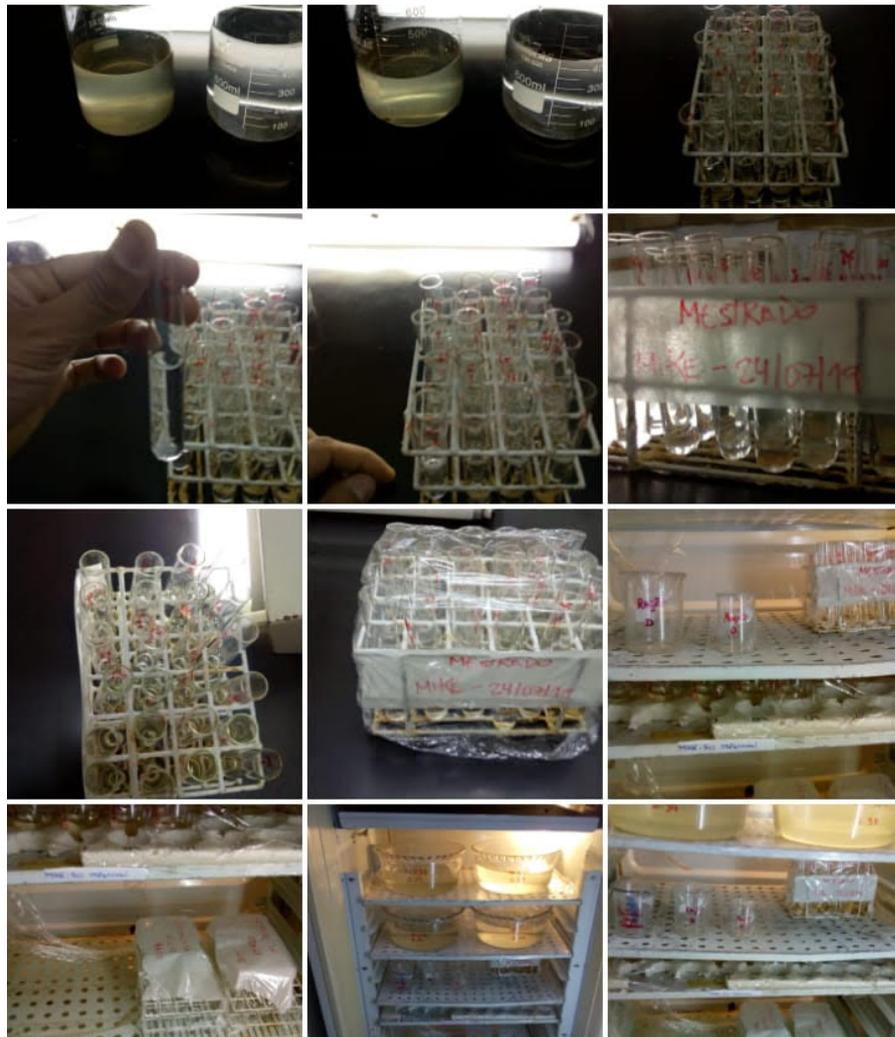
Para avaliação histológica, as larvas coletadas (n=8) foram eutanasiadas com aprofundamento de anestésico em solução de óleo de cravo 5% (RANZANI-PAIVA et al., 2013) e fixadas em solução de formol tamponado 10% por 24h e mantidos em álcool a 70%. Posteriormente, foram incluídas em parafina. Cortes histológicos longitudinais, com cinco micrômetros de espessura, foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica e submetidos à coloração diferencial entre núcleo e citoplasma corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para descrição histológica sob microscópio óptico. Com os dados de sobrevivência obtidos, foram calculadas as concentrações de efeito (CE) através do método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON et al., 1977), através do software TSK (SANATHANAN et al., 1987).

#### *Daphnia similis* (Claus, 1876)

Para os ensaios com o microcrustáceo *D. similis*, adotamos as mesmas diluições utilizadas para o teste com o peixe *P. vivipara*: 100%, 75%, 50%, 25%, 10% e 0%.

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados de acordo com o procedimento descrito em ABNT NBR 12713/2016 (Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Cinco neonatas de *D. similis* foram colocadas em tubos de ensaio de 10 ml contendo as diluições testadas com quatro réplicas cada (Figura 3). Foi utilizada a água de cultivo dos organismos para obtenção das diluições do efluente e no controle positivo

(0%). Os testes foram mantidos por 48h em câmara de germinação, com fotoperíodo de 12 horas, temperatura média de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e em jejum. Ao final do teste, foi quantificado os organismos mortos/imóveis nos tubos de ensaio. Com os dados obtidos foram calculadas as concentrações de efeito (CE) através do método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON et al., 1977), através do software TSK (SANATHANAN et al., 1987).



**Figura 3. Ensaio de toxicidade aguda.**

Os ensaios de toxicidade crônica foram realizados de acordo com o procedimento descrito em ABNT NBR 13373/2017 (Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), que consistiu na exposição individual de neonatas de *D. similis* com idade entre 6 e 24 horas, às concentrações testadas. Para tanto, uma neonata de *D. similis* foi colocada em um béquer com volume de 50 ml com as diluições testadas com dez réplicas cada

(Figura 4) durante 21 dias. Durante este ensaio, os organismos foram mantidos na câmara de germinação, com temperatura média de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com alimentação em dias alternados à base de alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, na quantidade de  $150 \mu\text{g/L}$ . A cada 2 dias, as soluções-teste eram trocadas e realizada a observação dos organismos e a contagem de neonatas, quando presentes, em cada unidade experimental. Foram obtidos os valores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido de cada concentração antes e depois de cada ensaio (Apêndice 1).



Figura 4. Ensaio de toxicidade crônica.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram comparados através de análise de variância One-way Anova, seguida de teste post hoc de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram processadas utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism 8.0.0*, para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA).

## RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir da avaliação dos parâmetros físico-químicos e biológicos de efluente testado encontram-se descritos na Tabela 2.

**Tabela 2. Resultado dos parâmetros de qualidade de água avaliados no efluente coletado. (OD: Oxigênio Dissolvido; NH<sub>3</sub>: Amônia; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrito; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrato; (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup>: Fosfato; CT: (Coliformes termotolerantes); pH: potencial Hidrogeniônico.**

Efluente doméstico tratado	
<b>DBO</b>	83 mg/L
<b>DQO</b>	186 mg/L
<b>OD</b>	3,56 mg/L
<b>CT</b>	4,9x10 <sup>3</sup> NMP/mL
<b>NH<sub>3</sub></b>	1,16 mg/L
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	0,236 mg/L
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	80,20 mg/L
<b>(PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup></b>	14,40 mg/L

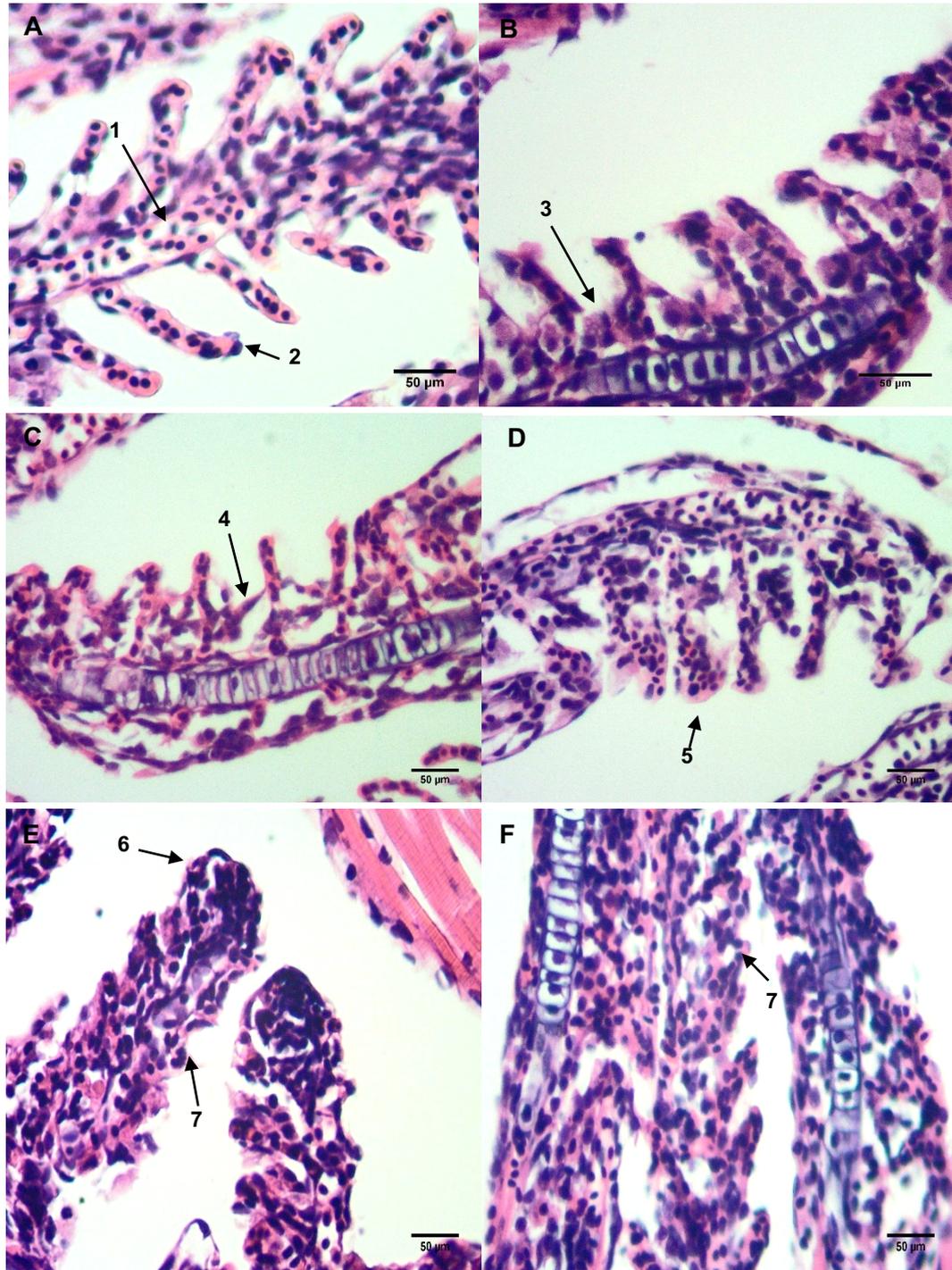
Em relação à mortalidade das larvas de *P. vivipara*, após exposição às diferentes diluições testadas pelo período de 96h (Tabela 3), observou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o controle 0% e as concentrações de 25% e 50% em relação aos tratamentos em que havia maior concentração do efluente 75% e 100%. A mortalidade total das larvas de *P. vivipara*, nas concentrações 100% e 75%, ocorreu com 72h de exposição. Ao final do período de exposição, não houve diferença estatística na mortalidade final dos tratamentos 50%, 25% e 0%

**Tabela 3. Mortalidade final (%) das larvas de *Poecilia vivipara* após 96h de exposição ao efluente doméstico tratado. DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação.**

	0%	25%	50%	75%	100%
<b>Média</b>	18,8 <sup>a</sup>	50,0 <sup>a</sup>	50,0 <sup>a</sup>	100,0 <sup>b</sup>	100,0 <sup>b</sup>
<b>DP</b>	12,5	28,9	35,4	0,0	0,0
<b>CV</b>	0,67	0,58	0,71	0,00	0,00

\*Letras diferentes na horizontal representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações testadas

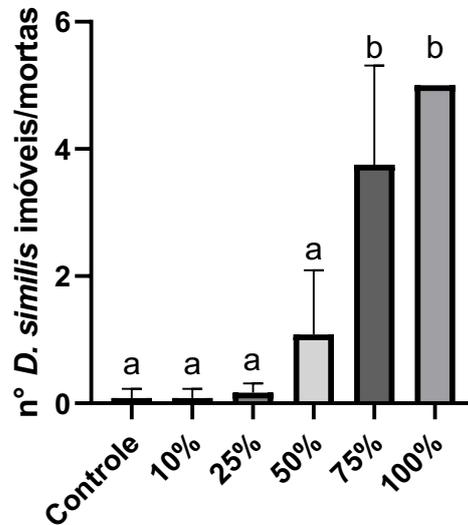
As avaliações histológicas evidenciaram influência do efluente mesmo na diluição mais baixa (25%) e foi observado que a gravidade das lesões é diretamente proporcional ao volume de efluente testado, ocasionando principalmente o descolamento epitelial, hiperplasia e fusão lamelar (Figura 5).



**Figura 5. Cortes de filamentos branquiais de larvas de *Poecilia vivipara*. A: Grupo controle: 1. Lamela branquial, 2. Filamento branquial; B: 25% Efluente: 3. Espessamento do tecido proliferativo filamental e lamelar; C: 50% Efluente: 4. Descolamento epitelial; D: 50% Efluente: 5, Hiperplasia; E: 75% Efluente: 6. Aneurisma, 7. Fusão lamelar F: 100% Efluente: 7. Fusão lamelar. (HE)**

Em relação aos testes para avaliação de efeito agudo realizados com o microcrustáceo *D. similis*, foi observado a mortalidade total na diluição 100%, não diferendo estatisticamente da diluição 75% de efluente tratado. Já nas outras diluições

testadas, não observamos diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os outros três tratamentos e o controle (0% - água do cultivo) (Figura 6).



**Figura 6.** Total de neonatas *D. similis* (média  $\pm$  desvio padrão) imóveis/mortas após exposição ao efluente tratado em diferentes diluições por 48 horas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as diluições testadas.

Os valores médios encontrados nos três ensaios de toxicidade realizados estão descritos e apresentados, a partir dos dados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda ( $n=3$ ) foi estimada a Concentração Efetiva (CE50) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultados dos ensaios de toxicidade aguda em 48 h. CE: Concentração Efetiva, IC: Intervalo de Confiança, DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação.

Ensaio	CE 50,48h	IC
1	74,10	(70,52 – 77,68)
2	50,02	(46,44 – 53,60)
3	54,01	(50,43 – 57,59)
<b>Média</b>	59,43	–
<b>DP</b>	12,90	–
<b>CV</b>	0,21	–

No ensaio de toxicidade crônico realizado com a *D. similis*, foi observado a mortalidade total dos organismos nas diluições de 75% e 100%. Nos demais tratamentos, ocorreu o aumento da reprodução das neonatas, com ênfase nos tratamentos de 25% e 50%, que apresentaram maior reprodução em comparação ao tratamento controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 7).

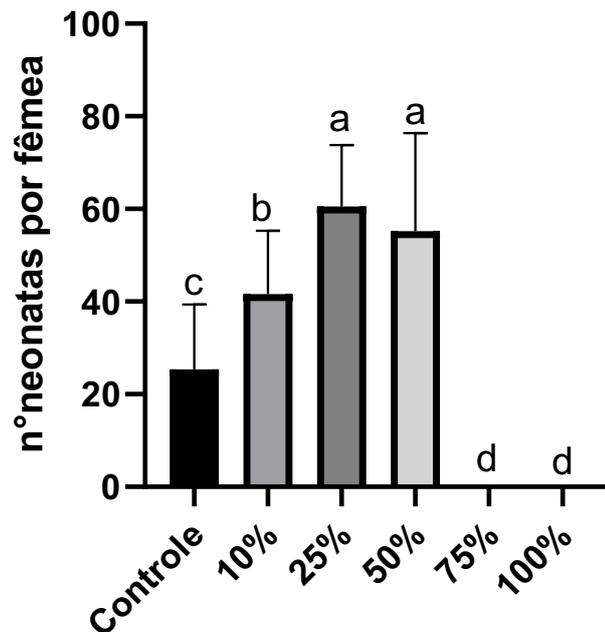


Figura 7. Total de neonatas por fêmea de *D. similis* (média  $\pm$  desvio padrão) após exposição ao efluente tratado em diferentes diluições por 21 dias. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as diluições testadas.

## DISCUSSÃO

As respostas dos organismos aquáticos são dependentes das características químicas dos xenobióticos depositados nesse ambiente, bem como sua concentração, tempo de exposição e tipo de organismo (YADA e TORT, 2016). Desta maneira, dentro da fauna presente nesse ecossistema, podemos encontrar diferentes níveis de susceptibilidade. Neste estudo, utilizamos dois organismos amplamente empregados em bioensaios ecotoxicológicos, o microcrustáceo *D. similis* e larvas do peixe *P. vivipara*.

Foi observado que a exposição ao efluente puro (100%) e na diluição de 75% ocasionou a mortalidade total das larvas de *P. vivipara* nas primeiras 72h de observação. Contrariamente ao observado, Osti et al. (2007) e Bertoletti (2009) que verificaram inexistir diferenças significativas nas médias da concentração de letalidade de todos os peixes estudados. Porém, no presente estudo, foram utilizadas larvas que são mais susceptíveis a alterações na qualidade de água, como presença de xenobióticos, mudanças bruscas de temperatura, pH e amônia (WESTERNHAGEN, 1988; SANTOS et al., 2017). O uso de formas larvais em estudos ecotoxicológicos é de suma importância, uma vez que a fase larval dos peixes se caracteriza por ser uma

etapa em que há grande desenvolvimento ontogênico com a diferenciação de órgãos e ossificação do esqueleto (YÚFERA, 2018). Além disso, a mortalidade massiva de formas jovens pode comprometer a abundância da espécie em sua fase adulta.

As brânquias constituem um órgão “chave” para o estudo das ações dos poluentes no meio aquático porque estão continuamente em contato com a água e possuem uma superfície de contato relativamente grande (ARELLANO et al., 1999). Os efeitos observados no tecido branquial neste estudo são os mais comumente encontrados em peixes expostos à xenobióticos (CANTANHÊDE et al., 2014), e são considerados indicativos de resposta imunológica do tecido branquial. Além de causar distúrbios na respiração, essas alterações ocasionam um balanço iônico negativo e alterações no hematócrito e hemoglobina (PEURANEN et al., 1994). Segundo Greco et al. (1995), essas alterações aumentam a distância de difusão sangue-água, diminuem a distância intralamelar e resultam na redução da capacidade das brânquias em difundir os gases respiratórios.

Um dos principais objetivos do tratamento de efluentes é a diminuição do potencial poluidor da água residuária, visando à remoção da carga orgânica de maneira eficiente, tornando-o menos tóxico (CAMPOS et al., 2016). Porém, na presente pesquisa, observamos a total mortalidade quando neonatas de *D. similis* foram expostas ao efluente tratado sem diluição (100%) e na menor diluição de 75%. Já nas maiores diluições, não foi observado diferenças estatísticas na sobrevivência das neonatas, uma vez que os componentes tóxicos estavam em menores concentrações, mostrando-se não letais. A diluição do efluente lançado no rio avaliado ocorre naturalmente e sofre grande influência da maré, uma vez que ele se encontra em uma área de mangue. Assim, podemos inferir que ao longo do curso do rio, os efeitos na sobrevivência dos organismos tendem a ser atenuados, sendo potencialmente danosos no entorno do local de despejo.

Organismos microcrustáceos do gênero *Daphnia* são abundantes em ambientes com altas concentrações de matéria orgânica, alimentando-se de bactérias, leveduras e microalgas (OCAMPO et al., 2010). Constatamos que o efluente testado atende a essas características e pode ter influenciado na taxa de reprodução da *D. similis*. No teste crônico, foi observado que os organismos dos tratamentos com diluições de 10%, 25% e 50%, embora com uma carga maior do efluente, exibiram uma taxa de reprodução maior em relação ao tratamento controle (0%). O aumento dos níveis de nutrientes no corpo de água receptor, especialmente

concentrações elevadas de fosfato e nitrato, pode estimular a produtividade primária da microalga utilizada na nutrição das *D. similis*, aumentando a disponibilidade de alimento para esses organismos, acarretando maior taxa de reprodução, quando comparadas ao controle.

Semelhante aos resultados obtidos nas taxas reprodutivas de *D. similis*, Rodriguez et al. (2006) também avaliaram a influência da deposição de efluentes na reprodução de *Daphnia* spp. e observaram aumento da taxa de reprodução (~78%) desses organismos em comparação ao controle. Os autores atestaram que este fato pode estar relacionado a presença de protozoários no efluente e as *Daphnia* spp. podem ter se utilizado deles como fonte de alimento.

Entretanto, o excesso desses nutrientes na água pode ocasionar a eutrofização do ambiente, o que compromete toda a comunidade aquática, promove alta mortalidade de peixes e acarreta prejuízos econômicos e sociais pela diminuição do pescado (COMPTON et al., 2011), bem como impactos ambientais (SCHINDLER, 2012). De fato, segundo o relatório da CETESB (2018), houve piora na qualidade do Rio Itapanhaú e perda da abundância de espécies (21%), o que pode estar ligado a fatores químicos (aumento da contaminação) ou físicos (arraste por chuvas mais intensas e menor heterogeneidade dos habitats). Além disso, o Canal de Bertioga, local onde o Rio Itapanhaú desagua, foi considerado uma área altamente impactada (CETESB 2019). No relatório divulgado pela Cetesb (2019), de acordo com a média anual, esse local foi classificado como “Eutrófico”, indicando um ambiente altamente impactado por ações antrópicas, como despejo de efluentes, seja de maneira regular ou irregular, devido à ocupação humana desordenada.

Por fim, segundo os estudos de Bulich (1982), que utilizou dados de  $CE_{50}$  para níveis de toxicidade nos ensaios com os organismos *Daphnia* spp., a média dos resultados obtidos no presente estudo, conforme apresentado na Tabela 6, caracterizam-se como moderadamente tóxica, o que denota que os organismos apresentaram sensibilidade ao efluente tratado, corroborando com os estudos realizados na ETE de São Cristóvão localizada no município de Fortaleza, Estado do Ceará, que apresentaram resultados semelhantes (COELHO, 2006; VASCONCELOS et al., 2014).

Outro fator preponderante para os danos causados nos organismos estudados foram os índices observados no presente estudo de oxigênio dissolvido (3,56 mg/L) (OD), demanda biológica de oxigênio (83 mg/L) (DBO) e demanda química de

oxigênio (186 mg/L) (DQO), que indicam a presença de poluentes de origem orgânica no ambiente, que em excesso causam danos aos organismos (PINHO, 2001; BRESEGHELO et al., 2004; PAULO et al., 2012). Além dos possíveis xenobióticos presentes no efluente estudado, segundo Westernhagen (1988), o baixo nível de oxigênio dissolvido na água, comum em regiões com alta carga poluidora, pode interferir na embriogênese e desenvolvimento inicial de larvas de peixes.

Conforme podemos observar os parâmetros indicadores de qualidade da água, apesar do efluente tratado encontrar-se dentro do enquadramento proposto pela Resolução Conama 430 (2011), a exposição dos organismos a esse efluente influenciou negativamente a sobrevivência dos peixes e crustáceos no experimento realizado. A amônia é um tóxico bastante restritivo à vida dos peixes, muitas espécies não suportam concentrações acima de 1 mg/L (MIRON et al., 2008). Em peixes, a exposição ao nitrito pode causar efeitos danosos no transporte do oxigênio, uma vez que penetra nas hemácias e oxida o Ferro, resultando em uma meta-hemoglobina, que não consegue se ligar ao oxigênio (BALDISSERTTO, 2018).

Na presente pesquisa, a concentração do nitrato no efluente tratado (100%) foi de 80,20 mg/L, que certamente trouxe consequências danosas aos organismos estudados (*P. vivipara* e *D. similis*). Em excesso, o nitrato pode desencadear uma série de consequências para os organismos aquáticos, sendo causador de mutações, alterações comportamentais e anomalias gênicas (CAMARGO et al., 2005). Além disso, de acordo com Baldisserotto (2018), o mecanismo de toxicidade deste componente para peixes ainda é pouco compreendido e, supostamente, após sua metabolização, ele seja convertido em nitrito, de maior toxicidade. Em estudos conduzidos com *D. magna*, observou-se que o nitrato foi letal em concentrações de 3155 mg/L (SCOTT e CRUNKLINTON, 2000) e 250 mg/L (MACEDA-VEIGA et al., 2015), quantidades menores do que encontradas no efluente tratado testado. Porém, nesse estudo, além do nitrato, existe a influência dos demais componentes do efluente atuando de forma sinérgica, ocasionando assim a letalidade, mesmo este micronutriente estando abaixo do encontrado em outros estudos (SCOTT e CRUNKLINTON, 2000; MACEDA-VEIGA et al., 2015).

O método empregado para tratamento do efluente, antes do seu despejo no Rio Itapanhaú, é o lodo ativado que apresenta boas taxas de remoção de carga orgânica, porém não é capaz de eliminar por completo xenobióticos tóxicos à biota aquática (GOTVAJN et al., 2009). Porém, no presente estudo, mesmo após o

tratamento do efluente, foram observados efeitos danosos sobre os organismos testados, principalmente nas concentrações mais elevadas do efluente tratado.

Segundo a Resolução Conama 430, a emissão de efluentes nos corpos d'água não pode interferir na qualidade e enquadramento do corpo receptor. De fato, o Rio Itapanhaú ainda pertence à classe 1 e a emissão do efluente tratado não alterou a sua classificação. Porém, vale ressaltar, que de acordo com os relatórios anuais da CETESB, nos últimos anos este rio apresentou piora na qualidade de água, perda da biodiversidade além da eutrofização do canal de Bertioga, local onde há o desague deste rio (CETESB 2019).

Portanto, os resultados apresentados na pesquisa tornam-se extremamente relevantes, uma vez que foram obtidas taxas de letalidade e alterações nos sistemas orgânicos dos animais avaliados, sendo um indicativo do comprometimento da fauna residente no local de despejo do efluente tratado. Desta maneira, sugere-se que haja maior intensificação e monitoramento do efluente tratado lançado neste ponto do Rio, revisando-se a capacidade suporte deste corpo receptor. Além disso, ainda são escassos os estudos que avaliam os fatores sinérgicos que ocorrem nos organismos vivos expostos aos efluentes depositados nos corpos d'água.

## **CONCLUSÃO**

Neste estudo, observou-se que a exposição *P. vivipara* e *D. similis* ao efluente tratado coletado, nas concentrações de 75% e 100%, demonstrou-se letal nas larvas de peixe. Foram observadas alterações no tecido branquial das larvas, mesmo nas menores concentrações testadas. Por outro lado, quando diluído (10%, 25% e 50%), o efluente não afetou a sobrevivência desses organismos e ocasionou acréscimo na taxa de reprodução da *D. similis*. Desta maneira, reforçamos que são necessárias mais pesquisas conduzidas tanto *in situ* quanto testes laboratoriais, visando compreender de forma holística as consequências que o despejo do efluente tratado neste ponto do Rio Itapanhaú e em seu entorno.

**COMPROVANTE DE ENVIO DE RELATÓRIO TÉCNICO**

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AUDITORIA AMBIENTAL  
MESTRADO EM AUDITORIA AMBIENTAL

MIKE DE SOUZA MOREIRA

EFEITOS BIOLÓGICOS ADVERSOS DOS ORGANISMOS *POECILIA VIVIPARA* E  
*DAPHNIA SIMILIS* APÓS A EXPOSIÇÃO AO EFLUENTE DOMÉSTICO TRATADO

Relatório técnico apresentado a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Auditoria Ambiental, sob a orientação do Prof. Dr. Bruno Lopes da Silva Ferrette e coorientação da Profa. Dra. Olívia Cristina Camilo Menossi.

RECEBIDO  
CETESP - CIA. AMBIENTAL  
DO ESTADO DE SÃO PAULO  
AGÊNCIA AMBIENTAL DE SANTOS  
Em: 02/03/2020  
Hora: 08:00 hs  
Assinatura: M. Souza  
No Registro 2403-7

SANTOS/SP  
2020

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustácea).** 4. Ed. São Paulo, 2016.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13373: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustácea).** Ed. São Paulo, 2017.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088: Ecotoxicologia aquática-Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae).** 2016.
- ADAM, M. L. et al. Environmental degradation at a public park in Southern Brazil as revealed through a genotoxicity test (MN) on peripheral blood cells from *Poecilia vivipara* (Teleostei). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 211, n. 1-4, p. 61-68, 2010.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, Carmen. **Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 44, n. 1, p. 62-72, 1999.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** 3ª Ed. Santa Maria: UFSM, 2018. 352 p.
- BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. 2ª Edição. São Paulo: CETESB, 2013.42 p.
- BERTOLETTI, E. **Sensibilidade de algumas espécies de peixes de água doce utilizadas no Brasil.** Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 4, n. 1-3, p. 9-13, 2009.
- BRASIL. **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de maio de 2011. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 29 maio de 2019.
- BRESEGHELO, L., et al. **Effects of sodium fluoride in gill epithelium of Guppy fish (*Poecilia vivipara*).** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, vol. 41, p. 274-280. 2004.
- BUIKEMA JR, Arthur L.; SHERBERGER, Sara R. *Daphnia*. Carolina Tips, XL (10), p. 37-40, 1977.
- BUIKEMA, A. L.; SHERBERGUER, S.R. ***Daphnia*.** Carolina Tips, v.15, n.10, p.1-5, 1977.
- BULICH, Anthony A. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. 1982.
- CAMARGO, J. A.; ALONSO, A.; SALAMANCA, A. **Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates.** Chemosphere, v. 58, n. 9, p. 1255-1267, 2005.
- CAMARGO, M.M.P; MARTINEZ, C.B. R. **Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream.** Neotropical Ichthyology, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CAMPANHA, M. B., et al. **Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil.** Química Nova, p. 1831-1836, 2010.

CAMPOS, F.; PIVELI, R., P. **Redução da toxicidade aguda de lixiviado de aterro sanitário em co-tratamento com esgoto doméstico pelo processo integrado de lodo ativado com biofilme em leito móvel.** Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, v. 11, n. 2, p. 316-326, 2016.

CANTANHÊDE, S. M. et al. **Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís-MA.** Arq. bras. med. vet. zootec, p. 593-601, 2014.

CAPPARELLI, M. V., P. K. et al. **Seasonal environmental parameters influence biochemical responses of the fiddler crab *Minuca rapax* to contamination in situ.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 216, p. 93-100, 2019.

CARIELLO, Mariana Stefanon. **Efeito do naftaleno na microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e no microcrustáceos estuarinos *Nitokra* sp e *Leptocheirus plumulosus*.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CETESB – **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** Disponível em <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/contaminantes/amonia/>. Acesso em 31 de maio de 2019.

CETESB – **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** Disponível em <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/>. Acesso em 31 de maio de 2019.

CETESB – **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.** Disponível em <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-das-%C3%81guas-Interiores-no-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>. Acesso em 31 de maio de 2019.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. 2015. (2v) Série Relatórios/CETESB,** São Paulo: 2015.

CHAPMAN, P. M. **Whole effluent toxicity testing - usefulness, level of protection, and risk assessment.** Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, v. 19, n. 1, p. 3-13, 2000.

CHAPMAN, P. M., et al. **Refinery water (intake and effluent) quality: update of 1970s with 1990s toxicity testing.** Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, v. 13, n. 6, p. 897-909, 1994.

COELHO, Ricardo dos Santos. **Avaliação da toxicidade de fluidos de usinagem através da ecotoxicologia aquática.** 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COMPTON, J. E., et al. **Ecosystem services altered by human changes in the nitrogen cycle: a new perspective for US decision making.** Ecology letters, v. 14, n. 8, p. 804-815, 2011.

CONAMA – **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Disponível em <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em 29 de maio de 2019.

COOMAN, K. et al. **Use of *Daphnia* spp. for the ecotoxicological assessment of water quality in an agricultural watershed in South-Central Chile**. Archives of environmental contamination and toxicology, v. 48, n. 2, p. 191-200, 2005.

COORS, A.; DE MEESTER, L. **Efeitos sinérgicos, antagônicos e aditivos de múltiplos estressores: ameaça de predação, parasitismo e exposição a pesticidas em *Daphnia magna***. Jornal de Ecologia Aplicada, v. 45, n.6, p.1820-1828, 2008.

DIAMOND, J., et al. **Use of prospective and retrospective risk assessment methods that simplify chemical mixtures associated with treated domestic wastewater discharges**. Environmental toxicology and Chemistry, v. 37, n. 3, p. 690-702, 2018.

Diamond J, Latimer H, Thornton K, Munkittrick K, Kidd K, Bartell S. 2011. **Prioritizing contaminants of emerging concern for ecological screening assessments**. Environ Toxicol Chem 30:2385–2394 HAMED et al., 2017.

EBERT, D. **A genome for the environment**. Science, v. 331, n. 6017, p. 539-540, 2011.

GARBOSSA, L.H.P et al. **Thermotolerant coliform loadings to coastal areas of Santa Catarina (Brazil) evidence the effect of growing urbanisation and insufficient provision of sewerage infrastructure**. Environmental monitoring and assessment, v. 189, n. 1, p. 27, 2017.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. In: CETESB série manuais. CETESB, 1990.

GOTVAJN, A. Z.; TISLER, T.; ZAGORC-KONCAN, J. **Comparison of different treatment strategies for industrial landfill leachate**. Journal for Hazardous Materials, v. 162, n. 2-3, p. 1446-1456, 2009.

GRECO, A, M. et al. **The effects of soft water acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss***. Journal of Experimental Biology, v. 198, p. 2557-2567, 1995.

GULKOWSKA, A. et al. **Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China**. Water research, v. 42, n. 1-2, p. 395-403, 2008.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. **Método aparado de Spearman-Karber para estimar concentrações letais medianas em bioensaios de toxicidade**. Ciência e Tecnologia Ambiental, v. 11, n.7, p.714-719, 1977.

HARAYASHIKI, Cyntia Ayumi Yokota. **Efeitos tóxicos do herbicida ROUNDUP no peixe *Poecilia vivipara* (Bloch e Schneider, 1801)**. 2013. Dissertação de Mestrado.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes**. In: **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, p.20-32, 1987.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. Rio de Janeiro: ABES, 4. Ed. 2009.

JORDANOVA, M. et al. **Histopathology investigation on the Vardar chub (*Squalius vardarensis*) populations captured from the rivers impacted by mining activities**. Ecotoxicology and environmental safety, v. 129, p. 35-42, 2016.

KAPTANER, B, et al. **Alterations in histology and antioxidant defense system in the testes of the lake Van fish (*Alburnus tarichi* **Güldenstädt, 1814**)**. Environmental monitoring and assessment, v. 188, n. 8, p. 474, 2016.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. **A remoção de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, desreguladores endócrinos e drogas ilícitas durante o tratamento de águas residuais e seu impacto na qualidade das águas receptoras**. Water research, v. 43, n. 2, p.363-380, 2009.

KOTOV, A. A. **A critical review of the current taxonomy of the genus *Daphnia* OF Müller, 1785 (Anomopoda, Cladocera)**. Zootaxa, v. 3911, n. 2, p. 184-200, 2015.

LEE, B.Y. et al. **The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology**. Aquatic Toxicology, v. 210, p. 69-84, 2019.

LI, Y.; LI, Y.; WU, W. **Threshold and resilience management of coupled urbanization and water environmental system in the rapidly changing coastal region**. Environmental Pollution, v. 208, p. 87-95, 2016.

LINDE-ARIAS, A. R. et al. **Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul**. Environmental pollution, v. 156, n. 3, p. 974-979, 2008.

LINDEBOOM, H. **The coastal zone: An ecosystem under pressure**. IN: Oceans 2020: Science, Trends, and the Challenge of Sustainability. FIELD, J. G.; HEMPEL, G.; SUMMERHAYES, C. (Eds.). Island Press, Washington. 2002. p.49-84

LUCINDA, P. H. F. **Family Poeciliidae**. Check list of the freshwater fishes of South and Central America, v. 555, p. 581, 2003. MACEDA-VEIGA, A. et al. **Chronic effects of temperature and nitrate pollution on *Daphnia magna*: Is this cladoceran suitable for widespread use as a tertiary treatment?** Water research, v. 83, p. 141-152, 2015.

LUKIN, A. et al. **Assessment of fish health status in the Pechora River: effects of contamination**. Ecotoxicology and environmental safety, v. 74, n. 3, p. 355-365, 2011.

MACEDA-VEIGA, Alberto et al. **Chronic effects of temperature and nitrate pollution on *Daphnia magna*: Is this cladoceran suitable for widespread use as a tertiary treatment?**. Water research, v. 83, p. 141-152, 2015.

MEDEIROS, Laila Carine Campos et al. **Water-soluble fraction of petroleum induces genotoxicity and morphological effects in fat snook (*Centropomus parallelus*)**. Ecotoxicology and environmental safety, v. 144, p. 275-282, 2017.

MEDEIROS, L, G. A.; TRESMONDIZ, A. C. C. L.; DC QUEIROZ, B. P. V. São Paulo state, Brazil. River Basin Management VII, v. 172, p. 201, 2012.

MINER, B. et al. **Linking genes to communities and ecosystems: *Daphnia* as an ecogenomic model**. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 279, n. 1735, p. 1873-1882, 2012.

MIRON, Denise dos S. et al. **Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae)**. Aquaculture, v. 277, n. 3-4, p. 192-196, 2008.

MITOSO, A. Q.; DINIZ, A. C.. IV-314-ANÁLISE DO SANEAMENTO AMBIENTAL NA BACIA DO TUCUNDUBA, BELÉM-PA.

MUTLAK, F. M. et al. **Morphological Deformities in fresh and marine water fishes, Basrah, Iraq**. Marsh Bulletin, v. 13, n. 2, p. 100-114, 2018.

OCAMPO, L. E.; BOTERO AGUIRRE, M., C.; RESTREPO BETANCUR, L. F. **Evaluación del crecimiento de un cultivo de *Daphnia magna* alimentado com *Saccharomyces cerevisiae* y um enriquecimiento com avena soya**. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, v. 23, p. 78-85, 2010.

OHLINGER, KN; YOUNG, T. M.; SCHROEDER, E. D. **Preveno a formação de estruvitana digestão**. Pesquisa sobre Água, v. 32, n.12, p.3607-3614, 1998.

Oliva, M., Vicente-Martorell, J. J., Galindo-Riano, M. D., & Perales, J. A. **Histopathological alterations in *Senegal sole, Solea senegalensis*, from a polluted Huelva estuary (SW, Spain)**. Fish Physiology and Biochemistry, 39, 523–545. 2013.

OLIVEIRA S.R.S et al. **Lesões histopatológicas como biomarcadores de contaminação aquática em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes, Cichlidae) em uma área protegida do Maranhão**. Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, v. 9(1), p. 12-26, 2016.

OLKOVA, A. S. et al. **The importance of maintenance conditions of *Daphnia magna* Straus as a test organism for ecotoxicological analysis**. Environmental toxicology and chemistry, v. 37, n. 2, p. 376-384, 2018.

One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was performed using **GraphPad Prism version 8.0.0** for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA.

OSTI, S. C., et al. **Comparative studies of deltamethrin acute toxicity in exotic and Brazilian fish**. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 2, p. 101-6, 2007.

PAULO, D. V.; FONTES, F. M.; FLORES-LOPES, F. Alterações histopatológicas observadas no fígado de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) como ferramenta de avaliação da qualidade ambiental do rio Cachoeira, BA. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 131-140, 2012.

Paulo. 2ª Edição. São Paulo: CETESB, 2013.42 p.

PEREIRA, D.P., et al. 2014. **Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil)**. Biosci. J., Uberlandia, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, July/Aug. 2014.

PEURANEN S., et al. **The effects of iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout (*Salmo trutta*)**. Annales Zoologici Fennici, v.31, p. 389–396, 1994.

- PINHO, AG., 2001. **Estudo da qualidade das águas do Rio Cachoeira-Região Sul da Bahia. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz.** 133 p. Tese de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.
- POSSETTI, R. B. et al. **Avaliação do impacto do efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE) do município de Araraquara–SP: macroinvertebrados aquáticos como bioindicadores.** Revista Brasileira Multidisciplinar, v. 20, n. 2, p. 06-14, 2017.
- POWER, E. A.; BOUMPHREY, R. S. **International trends in bioassay use for effluent management.** Ecotoxicology, v. 13, n. 5, p. 377-398, 2004.
- PRISM, GraphPad. Graphpad software. **San Diego, CA, USA,** 1994.
- RA, J. S. et al. **Whole effluent toxicity (WET) tests on wastewater treatment plants with *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum*.** Environmental monitoring and assessment, v. 129, n. 1-3, p. 107-113, 2007.
- RANZANI DE PAIVA, M.J. T. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes.** Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013.
- REZNICK, D. N. et al. The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. PloS one, v. 12, n. 3, 2017.
- RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M.; CID, A. **Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna*.** Ecotoxicology, v. 15, n. 7, p. 559-572, 2006.
- SANATHANAN, L. P.; GADE, E. T.; SHIPKOWITZ, N. L. Trimmed logit method for estimating the ED50 in quantal bioassay. Biometrics, p. 825-832, 1987.
- SANTOS-FILHO, F. M, et. Al. 2014. **Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana.** Atas de Saúde Ambiental. São Paulo, v. 2, n. 1, p. 9-22, 2014.
- SANTOS, Régis Vinícius Souza; RAMOS, Sandra; BONECKER, Ana Cristina Teixeira. **Can we assess the ecological status of estuaries based on larval fish assemblages?.** Marine pollution bulletin, v. 124, n. 1, p. 367-375, 2017.
- SCHINDLER, D. W. **The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 279, n. 1746, p. 4322-4333, 2012.
- SCOTT, G.; CRUNKILTON, R. L. **Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia*, and *Daphnia magna*.** Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, v. 19, n. 12, p. 2918-2922, 2000.
- SLOOFF, W. **Skeletal anomalies in fish from polluted surface waters.** Aquatic toxicology, v. 2, n. 3, p. 157-173, 1982.
- STEPPING, Katharina. **Urban sewage in Brazil: drivers of and obstacles to wastewater treatment and reuse.** Governing the water-energy-food nexus series. Discussion Paper, 2016.
- TONKES, M.I; DE GRAAF, P. J.F; GRAANSMA, J. **Assessment of complex industrial effluents in the Netherlands using a whole effluent toxicity (or WET) approach.** Water Science and Technology, v. 39, n. 10-11, p. 55-61, 1999.
- TRIEBSKORN, Rita et al. **Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II:**

**metal accumulation and histopathology in fish.** Environmental monitoring and assessment, v. 141, n. 1-3, p. 177-188, 2008.

VASCONCELOS MAGALHÃES, G. V.; SALES DE PAULA, E.; STEFANUTTI, R.. Avaliação da toxicidade em efluentes de fossa séptica para *Daphnia magna* e *Daphnia similis*. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación, desarrollo y práctica**, v. 7, n. 3, p. 272-282, 2014.

VERAS, T. B. et al. **Analysis of the presence of anti-inflammatory drugs in surface water: A case study in Beberibe river-PE, Brazil.** Chemosphere, v. 222, p. 961-969, 2019.

VIEIRA, Carlos Eduardo Delfino et al. **A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas.** Science of the Total Environment, v. 586, p. 598-609, 2017.

WESTERNHAGEN, von H. **Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae.** Fish Physiology vol XIA. Chapter 4. 1988.p. 253-346

WHO, World Health Organization **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum.** Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf?sequence=1>, acesso em 29 de maio de 2019.

XUEMEI, B.; PEIJUN, S.; YANSUI, L. **Realizing China's urban dream.** Nature, v. 509, n. 1799, p. 158-160, 2014.

YADA, T.; TORT, L. **Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions.** Fish Physiology. Academic Press, 2016. p. 365-403.

YÚFERA, Manuel (Ed.). **Emerging Issues in Fish Larvae Research.** Springer, 2018.

## APÊNDICE

**Apêndice 1. Valores de pH e oxigênio dissolvido (OD) das concentrações avaliadas durante os ensaios agudos.**

Tratamento	1° Agudo Inicial		1° Agudo Final		2° Agudo Inicial		2° Agudo Final		3° Agudo Inicial		3° Agudo Final	
	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH	OD	pH
0%	6,9	7,6	6,4	7,5	7,8	7,8	7,4	7,5	6,8	7,8	6,3	7,7
10%	5,9	7,1	6,2	7,2	7,8	7,4	7,2	7,3	6,4	7,8	6,4	7,6
25%	6,9	7,8	6,4	7,2	7,8	5,8	6,8	6,9	6,5	7,8	6,5	7,4
50%	5,9	7,4	6,1	7,2	7,7	5,4	6,5	6,5	5,9	7,3	6,4	7,2
75%	6,4	6	6,3	6,1	7,9	5,7	6,3	6,1	6,3	7,6	5,9	7,4
100%	6,1	6	6,2	6,3	7,6	5,4	7,1	5,9	6,6	7,3	6,1	7,1

**Apêndice 2. Valores de pH e oxigênio do efluente testado em cada troca realizada durante o ensaio crônico.**

Troca	OD	pH
1	6,9	7,1
2	5,1	7,3
3	7,7	6,5
4	7,1	7,3
5	7,3	6,7
6	7,5	6,9
7	8,2	7
8	7,1	6,8
9	7,3	7,4
10	6,9	7,3