



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
ISMAEL LUIZ GRACIANO FURMANSKI

DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE MATRIZES DE
***DAPHNIA MAGNA* DESTINADAS À ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE**

Tubarão
2019



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
ISMAEL LUIZ GRACIANO FURMANSKI

**DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE MATRIZES DE
DAPHNIA MAGNA DESTINADAS À ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE**

Relatório Técnico/Científico apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Prof. Jair Juarez João, Dr. (Orientador)

Tubarão

2019

ISMAEL LUIZ GRACIANO FURMANSKI

**DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE CULTIVO DE MATRIZES
DE *DAPHNIA MAGNA* DESTINADAS À ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE**

Este relatório técnico/científico foi julgado adequado à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Tubarão, 16 de dezembro de 2019.



Prof. Dr. Jair Juarez João (Orientador)
Universidade do Sul de Santa Catarina



Profª. MSc. Maria Lúcia Soares Cochlar (Avaliadora)
Universidade do Sul de Santa Catarina



Profª. Dra. Maria Ana Pignatel Marcon Martins (Avaliadora)
Universidade do Sul de Santa Catarina

Agradeço a Deus, meus pais, esposa, e à toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, e ao longo deste processo complicado e desgastante, me ter feito ver o caminho, nos momentos em que pensei em desistir.

À Instituição pelo ambiente criativo e amigável que proporciona e pelo espaço que privilegia o conhecimento e onde todas as ideias são bem recebidas.

Ao professor Jair Juarez João, pela orientação, apoio, confiança e incentivos que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo.

Agradeço a todos os professores que me proporcionaram o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À minha esposa Jéssica Cardoso pela compreensão e paciência demonstrada durante o curso e no período do projeto.

Meus agradecimentos a minha amiga Jéssica Elias Antunes, companheira de trabalhos e irmã na amizade que fez parte da minha formação e que vai continuar presente em minha vida com certeza.

A minha orientadora na empresa, Micheline Costa, pelo apoio e confiança.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Tudo o que fizerem, seja em palavra seja em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai.” (Colossenses 3:17)

RESUMO

A ecotoxicologia traz, através de testes com organismos vivos, efeitos produzidos por substâncias químicas potencialmente poluidoras e tóxicas, por este motivo, os ensaios toxicológicos vêm sendo crescentemente aplicados em licenças ambientais para determinar a qualidade dos efluentes que são descartados nos corpos hídricos. Um dos organismos teste mais utilizados é o microcrustáceo *Daphnia magna*, devido a cultura em laboratório sob condições controladas ser fácil, frente aos outros tipos de organismos teste existente. Como no local onde o estudo foi realizado não possuía este tipo de ensaio, objetivou-se implantar o cultivo e o teste de sensibilidade, conforme Norma Brasileira 12713/2016, para posteriormente serem empregados em ensaios de ecotoxicidade. Para início da cultura, foi feito a aquisição de um lote de efípios (ovos de resistência produzidos através da reprodução sexuada do organismo) de um piscicultor da cidade de São Paulo e, posteriormente, realizado a eclosão destes ovos. Para determinação das matrizes, foram isolados neonatos recém eclodidos em béqueres de 100 mL, assim foi possível identificar as fêmeas partenogenéticas eclodidas e descartados os machos e fêmeas sexuadas. Após a idade de reprodução, os neonatos (filhotes) nascidos, foram utilizados para realização do teste de sensibilidade, no qual foram expostos a um tóxico de concentração conhecida (Dicromato de Potássio), e o resultado obtido na forma de CE_{50} (concentração efetiva média) foi de $1,28 \text{ mg L}^{-1}$, indicando que a metodologia implantada no laboratório está dentro dos padrões estabelecidos pela norma brasileira de ecotoxicologia, na faixa de $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ a $1,7 \text{ mg L}^{-1}$, podendo assim, ser implantado o ensaio de ecotoxicidade com o organismo teste obtido no laboratório onde o estudo foi realizado.

Palavras-chave: *Daphnia magna*; Ecotoxicologia; Teste de toxicidade.

ABSTRACT

Ecotoxicology brings, through testing with living organisms, effects produced by potentially polluting and toxic chemicals, for this reason, toxicological tests have been increasingly applied in environmental licenses to determine the quality of effluents that are discharged into water bodies. One of the most widely used test organisms is the *Daphnia magna* microcrustacean, because laboratory culture under controlled conditions is easy compared to other types of existing test organisms. As the place where the study was carried out did not have this type of test, the objective was to implement the cultivation and the sensitivity test, according to Brazilian Standard 12713/2016, for later use in ecotoxicity tests. For the beginning of the culture, a lot of ehipian *Daphnias* (resistance eggs produced through the sexual reproduction of the organism) was acquired from a fish farmer from the city of São Paulo and, later, these eggs were hatched. In order to determine the matrices, newborns newly hatched in 100 mL beakers were isolated, thus it was possible to identify the hatched parthenogenetic females and the males and sexed females were discarded. After breeding age, newborns (pups) born were used to perform the sensitivity test, in which they were exposed to a known concentration toxicant (Potassium Dichromate), and the result obtained as CE_{50} (mean effective concentration) was 1.28 mg L^{-1} , indicating that the methodology implemented in the laboratory is within the standards established by the Brazilian ecotoxicology standard, in the range of 0.6 mg L^{-1} to 1.7 mg L^{-1} , and can therefore be implanted. the ecotoxicity test with the test organism obtained at the laboratory where the study was carried out.

Keywords: *Daphnia magna*; Ecotoxicology; Toxicity test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Matriz de <i>Daphnia magna</i> com embriões.....	20
Figura 3 - Exemplo de efípio de Daphnias.....	21
Figura 2 - Exemplo de daphnia com efípio	21
Figura 4 - Ciclo e vida dos organismos da ordem Cladocera.....	22
Figura 5 - Lote de efípios adquiridos.....	28
Figura 6 - Eclosão dos efípios	29
Figura 7 - Pipeta de Pasteur adaptada para manuseio das Daphnias	30
Figura 8 - Ensaio de sensibilidade	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Determinação da CE_{50} interpolação gráfica.....	34
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia</i> spp.....	19
Tabela 2 – Requisitos da água de diluição e cultivo.....	24
Tabela 3 - Soluções para preparo da água reconstituída para cultivo e diluição – Meio M4...24	
Tabela 4 - Volume de soluções para o preparo de 1 litro de água de cultivo.....	25
Tabela 5 - Preparo das diluições teste a partir da solução-estoque de dicromato de potássio..	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.1.1 Objetivos Específicos	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 INTRODUÇÃO AOS BIOTESTES	16
2.1.1 Organismos utilizados nos testes de ecotoxicidade.....	17
2.1.2 Tipos de Sistemas para teste.....	17
2.2 O MICROCRUSTÁCEO DAPHNIA MAGNA.....	19
2.2.1 Machos e efípios.....	21
2.3 REPRODUÇÃO E CULTIVO	22
2.3.1 Alimentação	23
2.3.2 Água de cultivo e diluição.....	24
2.3.3 Sensibilidade da cultura	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 TIPO DE PESQUISA	27
3.2 OBTENÇÃO DO MICROCRUSTÁCEO	27
3.3 ECLOSÃO DOS EFÍPIOS	28
3.4 CULTURA DAS <i>DAPHNIAS</i>	29
3.5 ENSAIO DE SENSIBILIDADE.....	31
3.6 RESULTADOS.....	32
3.6.1 Eclosão dos efípios.....	32
3.6.2 Cultivo	32
3.6.3 Validade dos resultados obtidos no ensaio de sensibilidade.....	33
4 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Testes de ecotoxicidade são ensaios realizados em laboratórios, sob condições específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de efluentes industriais. Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados.

Em relação a imensidão de compostos químicos que chegam as águas, somente as análises físico-químicas que são tradicionalmente realizadas, tais como Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), são muito limitadas e os resultados da análise química não permitem uma avaliação das substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente. Por esta razão, órgãos ambientais incluem os biotestes como parâmetro de controle nas licenças industriais de atividades potencialmente poluidoras, usando este tipo de ensaio para monitoramento da qualidade das águas e identificação de fontes causadoras de poluição.

Nesse sentido, fez-se necessário a implantação de uma metodologia de cultivo destinada ao ensaio de ecotoxicidade, estabelecendo os procedimentos básicos necessários para manejo da cultura, mantendo a qualidade nos níveis estabelecidos pela legislação vigente, por meio do ensaio de sensibilidade com uma substância de referência, que deve ser expresso sempre em Concentração Efetiva que causa efeito a 50% dos organismos-testes (CE_{50}).

Para determinação da CE_{50} , foi utilizado como substância de referência o dicromato de potássio, e um método gráfico para obtenção dos resultados, a fim de chegar a conclusões quanto a viabilidade da metodologia implantada.

Por fim, observou-se o desenvolvimento do cultivo das matrizes e com os resultados obtidos foi possível determinar a continuidade da metodologia para a realização do ensaio de ecotoxicidade.

1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos prejudiciais causados por substâncias tóxicas sobre os organismos vivos. Esses efeitos são determinados por meio de ensaios de ecotoxicidade (também chamados de ensaios de toxicidade ou ecotoxicológicos), nos quais uma quantidade conhecida de organismos é exposta ao efluente com a substância tóxica por períodos conhecidos de tempo (variáveis), onde os efeitos são avaliados quanto à taxa de sobrevivência ou mortalidade dos organismos.

Alguns empreendimentos possuem licenças ambientais que especificam a realização dos testes de toxicidade para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora dos efluentes, pois somente as análises físico-químicas, não são capazes de diferenciar entre as substâncias que afetam, ou não, os sistemas biológicos no ambiente e, portanto, não constituem suficiência para a determinação do potencial de risco ambiental destes contaminantes. Um dos ensaios amplamente requerido por licenças ambientais é o de toxicidade por *Daphnia magna*.

Nesse sentido, a questão central deste trabalho é: **a implantação da metodologia de cultivo de matrizes de *Daphnia magna* em um laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas no Sul de Santa Catarina garante a confiabilidade dos resultados para o ensaio de ecotoxicidade de acordo com os dispositivos legais? Em estudo realizado na cidade de Tubarão em 2019.**

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a metodologia, em função dos parâmetros legais, dos resultados sobre a identificação, reprodução e cultivo de matrizes de *Daphnia magna* proveniente de um meio não-ideal em um laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas.

1.2.1.1 Objetivos Específicos

- a) Fazer a eclosão dos ovos de resistência;
- b) Separar as matrizes para início do cultivo;
- c) Determinar as condições de ambiente para cultura e reprodução do microcrustáceo;
- d) Descrever materiais e reagentes necessários para a realização do cultivo;
- e) Validar a metodologia implantada avaliando a sensibilidade dos microcrustáceos de acordo com a legislação;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO AOS BIOTESTES

Um dos principais problemas relacionado ao uso dos recursos hídricos é o seu consumo desenfreado, o que leva à poluição e inutilização das reservas de água em diversos lugares e regiões, trazendo a escassez da água de boa qualidade para os diversos usos indispensáveis que ela possui.

A poluição dos recursos hídricos é causada pelo lançamento, direto ou indireto, de despejos industriais insuficientemente tratados. Isso ocorre devido ao crescimento econômico, que vem subindo exponencialmente, onde a proteção dos recursos hídricos fica em segundo plano.

Inúmeras substâncias são despejadas pelas indústrias nas águas dos rios provocando modificações negativas do seu estado físico-químico e biológico. A fim de evitar a degradação deste recurso tão importante para a vida, são necessárias políticas preventivas relacionadas ao tratamento de poluentes, bem como constante monitoramento dos corpos d'água seguindo critérios bem estabelecidos.

A qualidade hídrica pode ser determinada através de análises químicas, que identifica e quantifica as substâncias químicas presentes na água, e biológicas, que avalia os efeitos que as substâncias causam.

Em virtude da imensidão de compostos químicos que potencialmente podem chegar às águas, a análise química é muito limitada. Assim, por exemplo, um laboratório bem equipado com aparelhos de medição modernos determina e quantifica, nas suas análises rotineiras, quando muito, 250 a 300 substâncias isoladas – diante 30 a 100 mil substâncias (ou até mais) que ocorrem normalmente em rios de medianamente a muito poluídos, ou em efluentes industriais [...]. Em geral, os resultados da análise química não permitem uma avaliação dos efeitos das substâncias sobre os seres vivos. Essa lacuna na análise química ambiental é preenchida pelos métodos biológicos de medição; além disso, especificamente com os testes ecotoxicológicos, o controle da qualidade das águas ganha outra dimensão. (KNIE; LOPES, 2004, p.15)

Nesses ensaios ecotoxicológicos, os organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados.

2.1.1 Organismos utilizados nos testes de ecotoxicidade

A escolha dos organismos para ensaios ecotoxicológicos com efluentes deve ser criteriosa. No Brasil a resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) nº 430 de 2011 estabelece que os ensaios ecotoxicológicos deverão ser realizados em organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes, no entanto, essa resolução não especifica quais organismos devem ser empregados.

Entretanto, segundo Costa et al (2008), existe alguns organismos-teste que foram normatizados e padronizados internacionalmente, e que são listadas a seguir:

- a) Algas: O uso de algas como indicador biológico é importante porque, como produtores primários, elas se situam na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. As algas verdes e unicelulares de água doce *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata* são frequentemente utilizadas em testes de toxicidade porque crescem rapidamente e suas culturas são facilmente preparadas em laboratório.
- b) Crustáceos e peixes: Crustáceos de água doce da ordem *Cladocera* e do gênero *Daphnia*, são bastante utilizados em testes de toxicidade. Várias espécies de daphnia são utilizadas em testes de toxicidade, mas, a mais utilizada é a *Daphnia magna*, pois existe um grande número de informação sobre as técnicas de cultivo. O teste com peixes é utilizado a espécie *Danio rerio*, por ser capaz de se adaptar facilmente a variadas condições ambientais artificiais e naturais.
- c) Bactérias: Dentre o teste que utilizam bactérias, a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, sem dúvida, é a mais utilizada, e seu teste recebe o nome de Microtox.

2.1.2 Tipos de Sistemas para teste

Os testes ecotoxicológicos podem ser realizados de 3 maneiras distintas, como teste estático, semi-estático e dinâmico.

O método mais aplicado é o estático. Neste, a amostra não é trocada e os organismos-testes permanecem expostos à mesma solução-teste durante o período do ensaio.

Dependendo da duração do teste e da composição da amostra, podem ocorrer mudanças químicas, por exemplo, em forma de degradação de matéria orgânica. Isto é pouco provável no teste de 30 minutos com fotobactérias, mas a possibilidade cresce no teste de algas com um tempo de exposição de 72 horas [...]. Se elas, no entanto, são conhecidamente significativas, deve ser escolhida uma outra forma de teste, como o semi-estático ou o teste de fluxo contínuo de amostra. (KNIE; LOPES, 2004, p. 24-25)

Nos testes semi-estáticos, o período de renovação das soluções-testes dependerá da espécie de organismo-teste, sendo empregado em amostras pouco estáveis que sofrem alterações biológicas por degradação.

No teste semi-estático, a solução de teste é substituída em intervalos definidos por outra com as mesmas características, preparada imediatamente antes da troca, para qual os organismos são transferidos. É muito recomendável analisar a amostra antes e depois do ensaio, para avaliar a possível perda de substâncias ou suas mudanças químicas. (KNIE; LOPES, 2004, p.25)

Por fim, temos os testes dinâmicos, que utilizam renovação permanente de amostra, e podem apresentar resultados mais confiantes do que os anteriores, porém, são sistemas que dão muitas despesas comparado aos semi-estático e estático.

Nos sistemas dinâmicos, os organismos são expostos a um fluxo contínuo da amostra. O método é especificamente adequado na medição de meios instáveis (por exemplo, com substâncias voláteis), de amostras com substâncias de baixa solubilidade, para questões de bioacumulação e biotransformação, no caso de substâncias submetidas a elevada degradação biótica e abiótica e para o monitoramento contínuo da qualidade de águas e efluentes. (*id ibid.*, p.27).

Para o ensaio de ecotoxicidade para *Daphnia magna*, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) instrui através da Norma Brasileira (NBR) 12713:2016 traz uma tabela com todos os requisitos necessários para execução do teste, conforme apresentado na Tabela 1:

Tabela 1 - Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* spp.

Requisitos	Espécie	
Organismo-teste	<i>Daphnia similis</i>	<i>Daphnia magna</i>
Idade dos neonatos	6 h a 24 h	2 h a 26 h
Ensaio	Estático	
Período de exposição	48 h	
Água de Diluição	Água natural ou reconstituída	
Volume mínimo da solução-teste/ Recipiente	10 mL (2mL/organismo)	
Número mínimo de soluções-teste*	Cinco, mais controle	
Número mínimo de organismos por recipiente teste	20	
Temperatura	18° C a 22° C	
Fotoperíodo	Escuro ou 12 h a 16 h de luz	
Alimentação	Nenhuma	
Efeito Observado	Imobilidade	
Expressão dos resultados	CE ₅₀ , FT ou tóxico e não tóxico	
* Não aplicável para resultados qualitativos e em FT		

Fonte: ABNT NBR 12713 (2016, p. 7).

Conforme apresentado pela norma através da Tabela 1, o ensaio com *Daphnia magna* pode ser realizado através do método estático com exposição de 48 h, apenas os filhotes (neonatos) de 2 h a 26 h podem ser usados nos ensaios de ecotoxicidade e os resultados podem ser expressos em Concentração efetiva de 50% (CE₅₀), Fator de diluição (FT) ou como tóxico e não tóxico.

2.2 O MICROCRUSTÁCEO DAPHNIA MAGNA

Mundialmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, a *Daphnia Magna* é uma das espécies oficialmente escolhidas para o monitoramento de efluentes industriais e agentes tóxicos; no registro de praguicidas; na avaliação de novas formulações químicas; e na determinação de concentrações máximas permitidas de agentes tóxicos ao meio aquático (MARANHO e NIEWEGLOWSKI, 1995, p. 37). Segundo Knie e Lopes:

Daphnia magna STRAUS, 1820 (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm. Ele atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares. Em condições ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas. As Daphnias são vulgarmente conhecidas como pulgas d'água. (KNIE; LOPES, 2004, p.110).

Margalef ainda descreve com mais detalhes sobre o microcrustáceo:

Popularmente conhecida como pulga d'água, as espécies do gênero *Daphnia* apresentam as seguintes características comuns: são filópodos pequenos, comprimidos lateralmente, cujo corpo, com exceção da cabeça é envolto por uma carapaça bivalva, com antenas grandes que servem de remos. Possuem de quatro a seis patas reduzidas dentro da carapaça que servem para a apreensão de alimento e oxigenação. Sua reprodução é rápida por partenogênese, ocorrendo numa bolsa incubadora localizada entre a região dorsal do intestino e a carapaça, onde os ovos desenvolvem-se em filhotes, que só são liberados quando em condições de viverem independentemente (MARGALEF, 1983, citado por MARANHO e NIEWEGLOWSKI, 1995, p. 36).

A escolha deste microcrustáceo se deve por ser uma espécie adequada aos sistemas de teste estático, semi-estáticos e dinâmicos, bem como, seu fácil manuseio, por causa de seu tamanho grande em comparação com outros microcrustáceos. A cultura sobre condições controladas é relativamente simples e sem grandes complicações e seu uso já é internacionalmente reconhecido há décadas em laboratórios de toxicidade.

A seguir, temos a representação de uma matriz do microcrustáceo, vista com ajuda de lente aumentada:

Figura 1 - Matriz de *Daphnia magna* com embriões.



Fonte: Knie & Lopes, 2004, p. 110.

Podemos observar na Figura 1, uma matriz de *Daphnia magna* com os embriões em sua incubadora dorsal.

2.2.1 Machos e efípios

A reprodução das matrizes de forma assexuada se dá em um meio ideal, descrito no cap. 2.3 deste trabalho, mas, quando as condições estiverem desfavoráveis, isto irá interferir na reprodução das matrizes, o que pode acabar no aparecimento de machos e consequentemente efípios, que são ovos de resistência que resultam da reprodução sexuada. Sendo assim, quando isto ocorre, é um indicador de que algo está errado na metodologia de cultivo e precisa ser revisado. Existem diferenças claras entre os machos e as matrizes, e para a identificação do aparecimento de machos na cultura, podemos seguir o ensinamento:

Os machos se distinguem facilmente das fêmeas, pois são menores, possuem o corpo mais afilado e nadam mais rapidamente. Além disso, as fêmeas se caracterizam pela bolsa incubadora, na qual estão quase sempre contidos ovos ou embriões, bem visíveis. (KNIE E LOPES, 2004, p. 125).

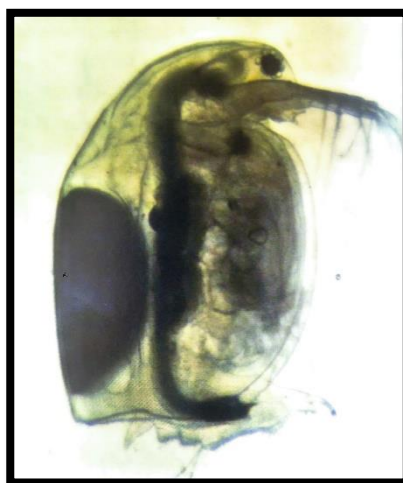
O percentual de machos em um ambiente de cultivo não pode ser superior a 10% da população total, se isso acontecer, todo o lote terá que ser descartado não podendo ser usado para testes de toxicidade. Nas figuras apresentadas abaixo, podemos observar as características de um efípio:

Figura 3 - Exemplo de efípio de *Daphnias*.



Fonte: Graf e Resgalla (2017, p. 44).

Figura 2 - Exemplo de daphnia com efípio



Fonte: Knie e Lopes (2004, p. 124).

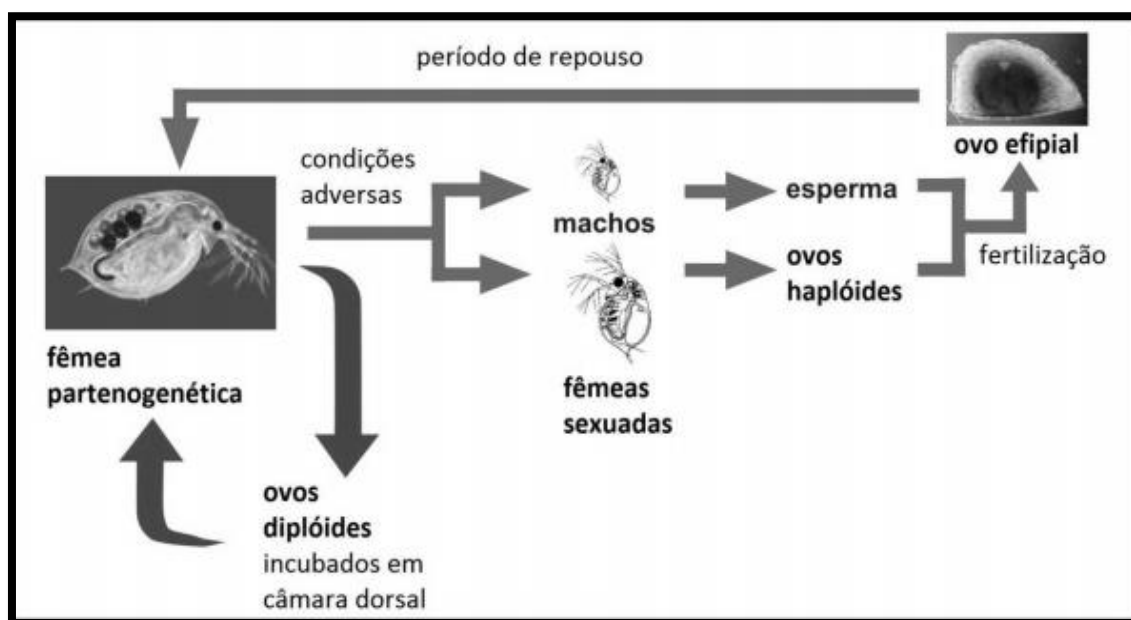
Podemos observar na figura 2 que diferente de uma matriz que se reproduz por partenogênese, o efípio ocupa todo o espaço de sua incubadora, sendo gerado apenas um por vez, e que para geração de um efípio, apenas fêmeas que nascem sexuadas podem gerar este tipo de ovo.

2.3 REPRODUÇÃO E CULTIVO

O cultivo das *Daphnias* pode ser feito em laboratório, demoram cerca de 15 dias para atingir a idade de reprodução e possuem ciclo de vida de aproximadamente 45 dias. A alimentação, temperatura e fotoperíodo são padronizados e devem ser monitorados. O meio de cultivo é composto por sais e nutrientes os quais estão em quantidades adequadas para atender às necessidades vitais das *Daphnias*. São alimentadas geralmente com a alga verde fresca *Desmodesmus subspicatus*, cultivada em laboratório, a qual também pode ser utilizada em ensaios ecotoxicológicos. (KNAPIK E ANDREATTA, 2013, p. 22).

Para entendermos melhor, a figura 4 traz uma ilustração sobre o ciclo de reprodução das *Daphnias*:

Figura 4 - Ciclo e vida dos organismos da ordem Cladocera



Fonte: Ávila, (2012, p. 19).

A o início da cultura pode ser iniciada a partir de uma ou mais matrizes de Daphnia, já que sua reprodução se dá de forma assexuada, conforme o ensinamento descrito:

A cultura pode ser iniciada com apenas uma fêmea (matriz), uma vez que as Daphnias se reproduzem por partenogênese. No entanto, recomenda-se um número maior de matrizes, preferencialmente com idade de até 40 dias, a fase da vida mais produtiva das Daphnias. Para começar a cultura, as matrizes são mantidas isoladamente em recipientes de 100 mL, preferencialmente em béqueres de vidro. Tal procedimento permite a observação do desenvolvimento de cada daphnia, o que possibilita a seleção das mais aptas à reprodução, e a exclusão daquelas que mostram algum tipo de deficiência. A visualização dos organismos pode ser facilitada colocando-se os recipientes de cultura sobre uma caixa de luz. (KNIE e LOPES, 2004, 115).

Os neonatos (filhotes) são transferidos para outros recipientes, e a partir do sétimo dia eles já começam a se reproduzir, com poucos filhotes por matriz, e após 12 dias, o número aumenta. A partir da terceira geração, os neonatos já podem ser padronizados e usados em ensaios de toxicidade e podem dar continuidade a cultura.

Os organismos devem ser mantidos em ambientes com temperatura na faixa de 18 a 22 °C e com fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, em torno de 1.000 Lux, em béqueres de vidro. Tais condições podem ser obtidas com incubadores, salas climatizadas ou banho-maria, não sendo necessário aeração para o cultivo.

2.3.1 Alimentação

Segundo Knie e Lopes (2004), as daphnias devem ser alimentadas diariamente, sendo que, nos finais de semana, pode ser utilizado uma porção maior na última dose semanal, compensando o intervalo de 2 dias do final de semana. Vários tipos de algas verdes unicelulares podem ser utilizados para alimentação de *Daphnia magna*, como, por exemplo, *Scenedesmus subspicatus*, atualmente chamada de *Desmodesmus subspicatus*. As algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento (ABNT NBR 12713, 2016, p. 24).

O tipo de alimento usado é muito importante para evitar a degeneração da cultura dos microcrustáceos, como nos mostra o ensinamento:

A cultura de Daphnias em água artificial a base de poucos sais, sem elementos-traços vitais, provoca a longo prazo sintomas carenciais. [...] Devido à alimentação com algas em forma de suspensão, na qual estão sempre presentes pequenas quantidades de substâncias vitais para as Daphnias, os sintomas podem ficar ocultos por um certo tempo [...]. Na tentativa de combater os sintomas, frequentemente a alimentação é complementada com ração para peixes, fermento ou algas desidratadas, usadas como alimentos para artêmias. No entanto, esses tipos de complemento não são

aconselháveis, uma vez que sua composição, bem como a origem e qualidade da matéria-prima são desconhecidas. (KNIE e LOPES, 2004, p. 119-120).

A utilização de alimentos, como fermento biológico ou algas desidratadas pode acelerar o processo, por isso, quando elas são alimentadas com os mesmos, é muito importante a complementação com algas unicelulares cultivadas no próprio laboratório.

2.3.2 Água de cultivo e diluição

A natureza da água na qual os organismos-testes são cultivados ou mantidos e também a que é usada para a preparação das amostras, tem fundamental importância para os bioensaios. (*id ibid.*, p. 32).

Segundo a norma ABNT NBR 12713 (2016, p. 3), a água utilizada para diluição pode ser reconstituída ou natural, conforme os requisitos da Tabela 2:

Tabela 2 – Requisitos da água de diluição e cultivo.

Característica	<i>Daphnia similis</i>	<i>Daphnia magna</i>
Dureza total mg CaCO ₃ L ⁻¹	40 a 48	175 a 225
pH	7,0 a 7,6	7,6 a 8,0

Fonte: ABNT NBR 12713 (2016, p. 3).

Segundo ELENDET & BIAS (1990) citado por KNIE e LOPES (2004, p. 112), a água de cultivo é composta pelo Meio Básico, composto de sais característicos das águas naturais e pelo Meio M4, composto por elementos-traço e vitaminas. O recipiente para estocar a água precisa limpo periodicamente, bem como o equipamento utilizado para fazer a aeração da água preparada.

Todas as soluções, bem como a forma de preparo e conservação, estão dispostas em tabela pela norma ABNT NBR 12713 (2016, 21 – 23), conforme está descrito a seguir:

Tabela 3 - Soluções para preparo da água reconstituída para cultivo e diluição – Meio M4.

Solução	Reagente	Quantidade (g)	Preparo
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL

3	KCl	5,8	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL
4	NaHCO ₃	64,8	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL
5	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,21	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL
	LiCl	6,12	
	RbCl	1,42	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3,04	
	CuCl ₂ .2H ₂ O *	0,335	
	ZnCl ₂ *	0,26	
	CoCl ₂ .6H ₂ O *	0,2	
6	NaNO ₃	0,548	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL
	H3BO ₃	5,719	
	NaBr	0,032	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,126	
	NH ₄ VO ₃	0,00115	
	KI	0,0065	
	Na ₂ SeO ₃	0,00438	
7	Na ₂ SiO ₃	21,465	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL, deixando em agitação até o clareamento da solução
8	Na ₂ EDTA.7H ₂ O **	0,5	Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água processada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121 °C durante 15 min
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1991	
9	KH ₂ PO ₄	0,286	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL
	K ₂ HPO ₄	0,368	
10	Hidrocloreto de tiamina	0,75	Dissolver e adicionar água processada para completar 1000 mL. Congelar em volume adequado no máximo até 30 dias
	Cianocobalamina (vitamina B12)	0,01	
	D (+) Biotina	0,0075	

* Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel-alumínio.

** O EDTA é foto degradável.

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 12713:2016.

A água de cultivo pode ser preparada a partir das soluções apresentadas pela Tabela 3, onde os volumes indicados de cada solução pela norma estão dispostos a seguir:

Tabela 4 - Volume de soluções para o preparo de 1 litro de água de cultivo.

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume (mL)	3,2	0,8	0,8	0,8	0,1	0,5	0,2	5	0,5	0,1*
*Descongela e adicionar imediatamente										

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 12713:2016.

Assim que a água é preparada, ela deve ser aerada de 12 a 24 horas, para total solubilização dos sais, estabilização do pH e saturação do oxigênio dissolvido. Após a aeração, o meio deverá apresentar as características descritas na tabela 2 deste capítulo.

Ainda se necessário, caso o meio não atinja alguma das características desejadas, o pH poderá ser ajustado com solução de ácido clorídrico (HCL) 1N ou hidróxido de sódio (NaOH) 1N e a dureza pode ser alterada mudando a proporção das soluções 1 a 4 da tabela 4.

2.3.3 Sensibilidade da cultura

Segundo Knie e Lopes (2004), a qualidade da cultura das *Daphnias* se refletem na sensibilidade, cujo estabilidade é essencial para que se tenha a confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade realizados e por isso devem ser feitos periodicamente, como por exemplo, um ensaio cada intervalo de 15 dias.

O ensaio de sensibilidade consiste na exposição dos neonatos à concentração de uma substância de referência, durante um período de 24h ou 48 h.

Ao final do ensaio, é determinada através do tratamento estatístico a relação entre concentração/efeito, expresso em Concentração Efetiva (CE), ou seja, que causa a imobilidade a um percentual de organismos (CE_x ; $x = \%$ do efeito observado). Também é considerado organismo imóvel aquele flutuante na superfície, mesmo que apresente movimento.

A ABNT NBR 12713 recomenda como substância de referência para o teste de sensibilidade o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e indica para *Daphnia magna* a faixa de 0,6 mg L⁻¹ a 1,7 mg L⁻¹ de CE_{50} em 24 horas.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE PESQUISA

A resposta à questão central da pesquisa e o alcance dos objetivos específicos exigiu um rigoroso planejamento para que fosse garantida a fidedignidade dos resultados obtidos. Nesse sentido optou-se pelo método de abordagem quantitativo e indutivo (tratou especificamente do cultivo, em condições investigadas, da *Daphnia magna*) com procedimento experimental e nível explicativo.

O tipo de procedimento, de acordo com Demo (2012) promove uma intervenção direta na realidade, contribui para a teorização de práticas, determina alternativas concretas comprometendo-se com soluções adequadas. Isso pois, não se faz uma boa prática sem teoria, método e empiria, o que determina a necessária volta permanente ao questionamento teórico, e vice-versa.

Dessa forma, o estudo realizado buscou resultados imediatos a partir da resposta à questão primeira através da manipulação de variáveis, o que justifica o nível explicativo do mesmo. Kerlinger (2003) defende que, o isolamento de variáveis para análise em ambientes previamente determinados pode conter aspectos positivos ou negativos. Positivo, quando o isolamento do objeto de estudo do ambiente externo garante credibilidade aos resultados e autonomia do pesquisador sobre o próprio objeto em análise. Negativo diz respeito ao fato que, estando o objeto fora de seu meio natural, as análises realizadas poderão estar afetadas comprometendo os resultados, fato não verificado na investigação que trata este estudo.

3.2 OBTENÇÃO DO MICROCRUSTÁCEO

Para obtenção do microcrustáceo, foi adquirido um lote de efípios (ovos de resistência) e um alimento específico para *Daphnias*, comercializado por um piscicultor da cidade de São Paulo, onde o mesmo realiza vendas destes ovos de resistência, bem como o microcrustáceo vivo, com a finalidade de servir como alimento vivo para peixes ornamentais.

Os ovos foram entregues via correios em embalagem plástica, e foram armazenados em geladeira, entre as temperaturas de 5 a 10 °C, até o dia de início da eclosão para que recebessem um choque térmico entre a temperatura de armazenamento e a temperatura da água de cultivo produzida.

Figura 5 - Lote de efípios adquiridos.



Fonte: do autor, 2019.

Na Figura 5, uma foto tirada do lote de efípios recebido e uma porção de alimento próprio para daphnias para início do cultivo.

3.3 ECLOSÃO DOS EFÍPIOS

De acordo com Stross (1969) e Wider (1997), citados por Graf (2012, p. 35), o armazenamento dos ovos de resistência em temperaturas de até 4° C e a presença de alimento é um dos gatilhos naturais para a eclosão dos efípios no ambiente. Com base nessas informações, os efípios foram mantidos em geladeira, sob regime de até 4°C e um período de aproximadamente um mês, e após isso, foi realizado a eclosão, retirando os ovos e colocando em um recipiente de vidro com aproximadamente 1 litro de água de cultivo e alimento, estabelecido pela norma, com temperatura de 20°C e iluminação constante, condições essas alcançadas através de uma incubadora.

Figura 6 - Eclosão dos efípios



Fonte: do autor, 2019.

A Figura 6 mostra como foi realizado o método de eclosão utilizado para o início do cultivo.

3.4 CULTURA DAS *DAPHNIAS*

A metodologia de cultivo seguiu a Norma Brasileira NBR 12713 (2004) (Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda Método de ensaio com *Daphnia* spp.).

As vidrarias foram lavadas com solução de ácido clorídrico 10%, água da torneira, detergente neutro e água destilada, secadas em estufa e auto clavadas para serem utilizadas exclusivamente no laboratório de ecotoxicologia.

Como os organismos obtidos foram de um meio onde não eram destinados a este tipo de ensaio, para começar a cultura, as daphnias que eclodiram foram isoladas antes que chegassem a fase de reprodução em béqueres de vidro de 100, assim somente as matrizes conseguiram se reproduzir, sendo possível a partir deste ponto, separar as mais aptas para a reprodução.

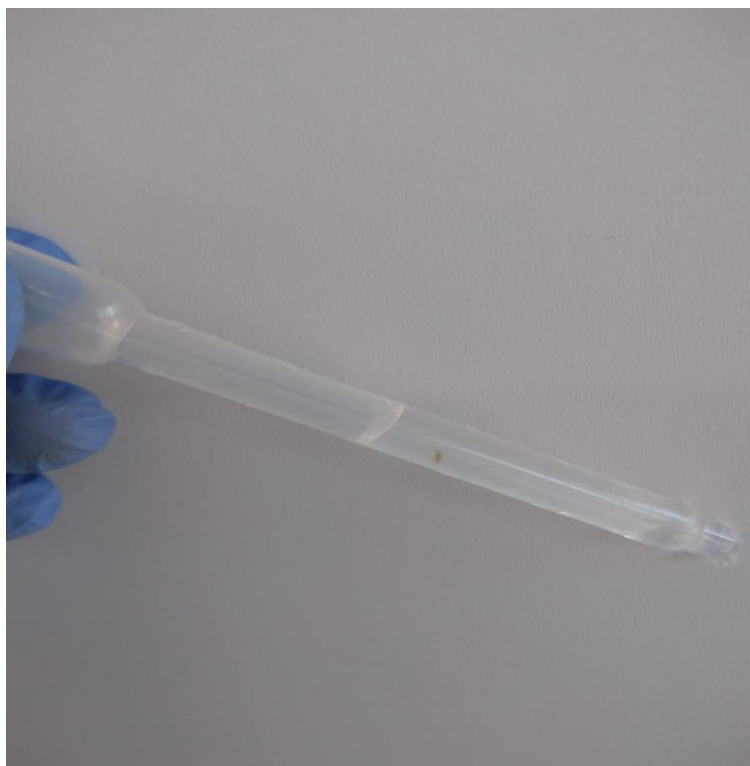
Utilizou-se água de cultivo (cuja preparação está descrita na Tabela 3), com dureza total entre 250 ± 25 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e pH entre $7,8 \pm 0,2$. A água de cultivo depois de preparada foi aerada, com um bomba de aquário, durante 24 horas para a completa solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Os valores de pH, dureza e oxigênio

dissolvido foram medidos e anotados sempre que era feito um lote novo, para melhor controle e garantir a qualidade da água de cultivo.

Os organismos foram mantidos em ambiente com temperatura na faixa de 18 a 22 °C e com fotoperíodo de 16 horas de luminosidade, em torno de 1.000 Lux, em béqueres de vidro sempre cobertos com filme plástico para não ocorrer contaminação externa, onde foi mantido em média 25 organismos por litro, tais condições de temperatura e fotoperíodo foram obtidas com uma incubadora.

Durante 2 vezes por semana, foram realizados a troca dos béqueres e água de diluição para remoção das carapaças, excrementos e neonatos (filhotes) excedentes. Para o manuseio dos organismos, foi adaptado uma pipeta de *Pasteur*, cortando a ponta mais afunilada, para que não agredisse tanto os organismos testes, conforme Figura 7.

Figura 7 - Pipeta de Pasteur adaptada para manuseio das *Daphnias*



Fonte: do autor, 2019.

Para alimentação dos microcrustáceos, utilizou-se o alimento fornecido pelo piscicultor, visto que não possível obter de imediato a alga *Scenedesmus subspicatus*, os organismos eram alimentados uma vez a cada dois dias, em quantidade mínima que deixava a água com uma tonalidade leve esverdeada.

3.5 ENSAIO DE SENSIBILIDADE

A sensibilidade dos organismos testada conforme metodologia descrita na NBR 12713/2004. O experimento foi conduzido expondo 5 daphnias a uma substância de referência em copos plásticos descartáveis (realizado em duplicata) com volume de 25 mL cada recipiente, totalizando 10 indivíduos e o controle com a exposição de daphnias somente em água de diluição. A figura 8 ilustra a forma como foi realizado o ensaio:

Figura 8 - Ensaio de sensibilidade



Fonte: do autor, 2019.

Utilizou-se como substância de referência o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a partir de uma solução-estoque preparada de 10 mg L^{-1} , adicionados volumes conforme Tabela 5:

Tabela 5 - Preparo das diluições teste a partir da solução-estoque de dicromato de potássio.

Identificação	Identificação Duplicata	Concentração da solução-teste mg L ⁻¹	Volume solução-estoque mL	Volume da água de diluição mL	Volume final mL
C1	C2	controle	---	50	50
1	2	0,4	2	48	50
3	4	0,85	4,25	45,75	50
5	6	1	5	45	50
7	8	1,4	7	43	50
9	10	1,7	8,5	41,5	50

Fonte: do autor, 2019.

Após 24 horas em incubadora com fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 18°C a 20 °C, foram observados o número de organismos que não apresentaram mobilidade, calculando em seguida a CE₅₀.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Eclosão dos efípios

Após 3 dias de incubação, os efípios eclodiram, porém a taxa de eclosão acabou sendo baixa, visto que uma média de apenas 25 organismos eclodiram do meio, sendo possível isolar apenas 8 para identificação das matrizes, devido a quantidade insuficiente de béqueres fornecidos. Foi possível observar também que alguns organismos nasceram com deficiência natatória, sendo necessário descartá-los. Em geral, a taxa de eclosão foi baixa, porém resultou em um tempo rápido de eclosão, o que era esperado, visto que a literatura indica que o início da cultura pode ser realizado com apenas uma matriz.

3.6.2 Cultivo

Foi realizado ensaios de dureza, pH e oxigênio dissolvido para controle dos parâmetros necessários para a qualidade da água necessário para o cultivo.

Para determinação da dureza, foi realizado o método seguido pelo próprio laboratório onde foi realizado o estágio, seguindo o *Standard Methods for the Examination of*

Water and Wastewater. Este método consiste na titulação da amostra (água de cultivo) com EDTA, onde o ponto de viragem é observado com auxílio do indicador Negro de Eriocrômio-T adicionado a amostra, onde a dureza obtida foi de 268 mg/L de CaCO_3 , ficando na faixa estabelecida pela norma de $250 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$ de CaCO_3 .

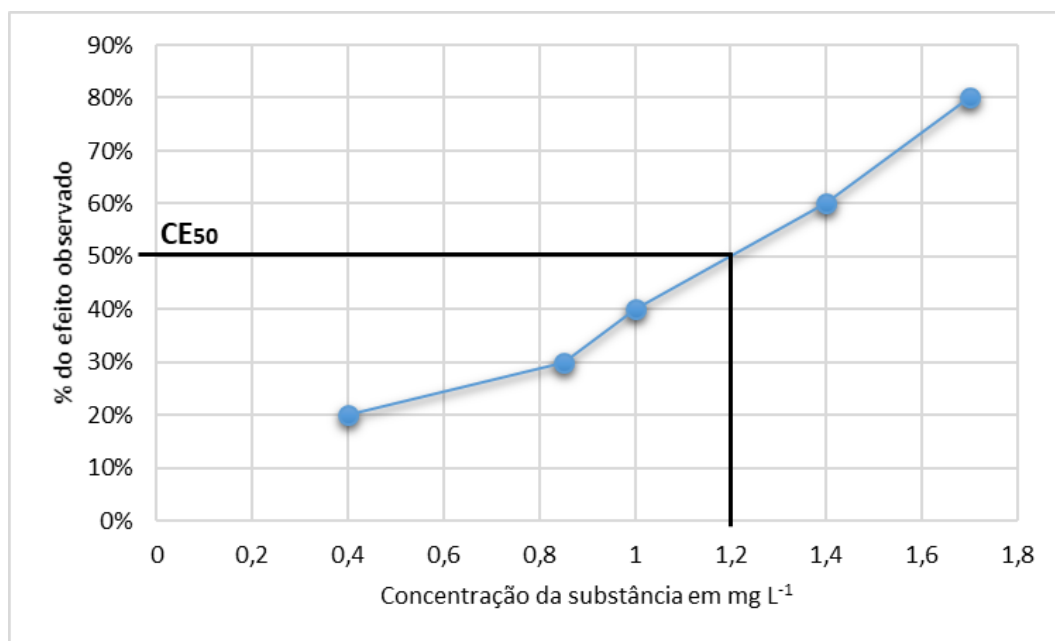
O pH após o tempo de aeração, se manteve entre 8,0 a 8,4, medido sempre com pHmetro digital devidamente calibrado pelo INMETRO. O valor ideal indicado pela norma é de $7,8 \pm 0,2$. Com os valores obtidos, se fez necessário realizar a correção com uma solução de ácido clorídrico (HCL) 1N para que o valor do pH entrasse na faixa indicada pela norma, ficando entre 7,6 a 7,9.

O oxigênio dissolvido foi medido diariamente com oxímetro, estando sempre acima do mínimo de 1 mg L^{-1} estabelecidos pela norma.

Por fim, dos 8 organismo isolados antes de chegarem a fase de reprodução, 5 se reproduziram por partenogênese (reprodução assexuada), os outros 3 foram descartados por serem machos e fêmeas sexuadas, foi obtido uma média de 7 a 8 neonatos por matriz no seu quinto e sexto dia de vida, totalizando uma média de 60 a 70 neonatos nascidos para realização do teste de sensibilidade.

3.6.3 Validade dos resultados obtidos no ensaio de sensibilidade

Os ensaios de sensibilidade foram realizados para avaliar a sensibilidade dos organismos quando expostos à substância de referência. A qualidade da água de cultivo e de diluição também foi avaliada indiretamente pelos resultados obtidos no Gráfico 1 de sensibilidade.

Gráfico 1 - Determinação da CE_{50} interpolação gráfica.

Fonte: do autor, 2019.

Como é possível observar através do Gráfico 1, o valor da CE_{50} obtido foi de aproximadamente 1,20 mg L⁻¹ de dicromato de potássio, comparando esse valor com os limites estabelecidos pela NBR 12713, esse valor ficou na faixa de 0,6 mg L⁻¹ e 1,7 mg L⁻¹ de dicromato de potássio, viabilizando a metodologia utilizada e assim podendo utilizar os organismos cultivados nos ensaios de ecotoxicidade em efluentes.

4 CONCLUSÃO

A obtenção dos efípios de um meio desconhecido se mostrou favorável para início de uma cultura de matrizes para ensaios de ecotoxicidade. Apesar da taxa de eclosão destes ovos de resistência ter sido baixa com o método utilizado, fotoperíodo de 16 horas entre 18 a 20 °C, ele foi satisfatório, visto que para iniciar a cultura, apenas uma matriz seria necessária.

Entre os organismos isolados foi possível obter 5 matrizes partenogenéticas, iniciando assim a cultura de matrizes de *Daphnia magna* através dos métodos encontrados nas normas brasileiras e literatura.

O sistema de cultivo das matrizes foi realizado conforme estabelecido pela norma de ecotoxicologia aquática ABNT NBR 12713:2016, as condições de temperatura, água de cultivo e ambiente produzidos em laboratório mostrou-se favorável na obtenção dos neonatos provenientes de matrizes.

A qualidade da cultura pôde ser determinada através do ensaio de sensibilidade utilizando dicromato de potássio como substância de referência e o valor da CE_{50} de 1,2 mg L⁻¹ deste estudo estiveram dentro da faixa-limite estabelecida pela norma, que determina valores entre 0,6 mg L⁻¹ a 1,7 mg L⁻¹.

Por fim, os testes de ecotoxicidade mostram-se ser uma ferramenta muito útil na avaliação da qualidade ambiental e na estimativa de riscos para o meio ambiente por agentes químicos. Os órgãos ambientais estão crescentemente incluindo os biotestes para servir como parâmetro de controle em licenças ambientais de atividades industriais potencialmente poluidoras.

Portanto, segundo os resultados obtidos perante este estudo, o laboratório de análises no qual realizou-se este estudo, possui a estrutura física e técnica para a realização do ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna* para avaliação da toxicidade em escala laboratorial e real, em condições ideais de cultivo.

Para a continuidade do trabalho, com o intuito de tornar o método mais eficiente, gerando consequentemente mais rentabilidade para a empresa, sugere-se a realização de métodos mais avançados para obtenção de uma eclosão com maior número de neonatos. E também, ensaios de sensibilidade com outras substâncias tóxicas e efluentes de referência além do citado neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713: **ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2004.

ALVES, Ana Claudia B.; SILVANO, Jacira. Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) ao dicromato de potássio. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 65, n. 1, 2006.

ÁVILA, Arthur Cardoso de. **Resiliência de invertebrados aquáticos via propágulos dormentes em arrozais no sul do Brasil: Uma perspectiva ecológica**. Arthur. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Unisinos, São Leopoldo, 2012.

BEATRICI, Aline Cristina. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas**. 2001. 18 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

BRANDOLT, Thelma Duarte; LOBO, Eduardo A. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA UTILIZANDO BIOENSAIOS COM *Daphnia magna* EM ÁGUA DE LAVOURA DE ARROZ NO MUNICÍPIO DE MOSTARDAS, RS, BRASIL. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 14, n. 2, p. 47-51, out. 2010. ISSN 1982-6753.

BRENTANO, Débora Monteiro. **DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Daphnia magna*: AVALIAÇÃO DE EFLUENTES TRATADOS DE UM ATERRO SANITÁRIO**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pósgraduação em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina - Ufsc, Florianópolis, 2006.

BRUZACA, David Nunes Aguiar. **Desempenho da *Daphnia magna* (Straus, 1820) cultivada em efluente de Tilápia do Nilo cultivada em sistema de bioflocos com diferentes relações C:N**. 2019. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Pesca, Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

CARAPETO, Cristina. **POLUIÇÃO DAS ÁGUAS Causas e efeitos**. Lisboa: Universidade Aberta, 1999. 170 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **430**: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357. Publicação Dou Nº 92, 2011. Disponível em:

<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

COSTA, Carla Regina et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DELLATORRE, Cristiane Pohl; SIQUEIRA, Paloma. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE METAIS EM *Daphnia magna***. 2015. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBI, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

DEMO, Pedro. **Pesquisa e construção de conhecimento: metodologia científica no caminho de Habermas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Tempo brasileiro, 2012.

KERLINGER, Fred Nichols. **Metodologia da pesquisa em ciências sociais: um tratamento conceitual**. 9. ed. Tradução: Helena Mendes Rotundo. São Paulo: EPU, 2003. 378 p.

KNAPIK, Luís Felipe Onisanti; ANDREATTA, Morgana. **AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE TRÊS SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA AO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna***. 2013. 65 f. TCC (Graduação) - Curso de Curso de Tecnologia em Processos Ambientais, Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

Knie, J. L.W. & Lopes, E.W.B. 2004. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA:GTZ. 289p.

LANZER R., MÜLLER M., DUMCKE M., RASERA K. **Comparação de Testes Ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphnia magna* (Straus, 1820) Utilizando Remazol Brilliant Blue R e Água de Arroio Urbano**. 2007. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

MARANHO, Lucineide Aparecida; NIEWEGLOWSKI, Ana Márcia Altoé. **INFLUÊNCIA DA DUREZA DA ÁGUA NO ESTUDO DA REPRODUÇÃO DE *Daphnia magna* (STRAUS, 1820)**. 1995. 52 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Universidade Federal do Paraná, 1995.

MENDONÇA, Vilalba Soares de. **APLICABILIDADE DE TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna* E *Vibrio fischeri*, NO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS DE BACIAS HIDROGRÁFICAS: O CASO DO RIO IPOJUCA EM PERNAMBUCO**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Gestão e Políticas Ambientais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

MONTEIRO, Suianne Priscilla Passos Barbosa. **DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE TESTE DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO COMO ORGANISMO-TESTE *Daphnia magna***. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Saneamento Ambiental, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

NETO José Policarpo Costa, BARBIERI Ricardo, IBÁÑEZ Maria do S. R., CAVALCANTE Paulo R. S., PIORSKI Nivaldo Magalhães, 2001/2002, **LIMNOLOGIA DE TRÊS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CARACTERÍSTICOS DA BAIXADA MARANHENSE**.