

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISELE DOS SANTOS MORAIS

Efeito do Fenantreno na biologia de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino,  
1981 (Chironomidae: Diptera)

CURITIBA

2011

GISELE DOS SANTOS MORAIS

Efeito do Fenantreno na biologia de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino,  
1981 (Diptera:Chironomidae)

Monografia apresentada a disciplina  
Estágio em Zoologia como requisito  
parcial à conclusão de Curso de  
Ciências Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Departamento de Zoologia,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio  
Navarro da Silva

CURITIBA

2011

Ao meu Marido e meu filho Cristiano e Pedro  
A minha mãe e irmã, Elide e Gracyelle  
Por estarem sempre presente, sendo os pilares fundamentais desta conquista.

Ao professor Mário Navarro pela orientação, apoio, e principalmente compreensão. Aos meus colegas Débora Rebechi, Vinícius Richard e Maiara Vicentini, pela colaboração e incentivo em todas as etapas de realização do trabalho. A amiga e colega Betina Westphal pelo apoio, incentivo e amizade. A todos os colegas de laboratório pela paciência e compreensão. Ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária pelo espaço e equipamentos para a realização do projeto.

Eu não me envergonho de corrigir e mudar as minhas opiniões, porque não me envergonho de raciocinar e aprender.

Alexandre Herculano

## RESUMO

O aumento da poluição do ambiente aquático provocado por ações antrópicas, como despejo de efluentes industriais e domésticos, têm gerado amplas alterações no meio aquático. Isto provoca redução da biodiversidade pela alteração na composição química e física do ambiente, assim como modificações na estrutura e dinâmica das comunidades. Neste cenário os bioindicadores de alterações ambientais podem desempenhar um papel relevante no monitoramento da qualidade ambiental. Os quironomídeos são bioindicadores, sensíveis a qualquer alteração ocorrente no ambiente em que vivem, relacionados não apenas ao substrato, mas também com a massa de água onde vivem. Essas modificações, podem atuar direta ou indiretamente sobre as populações provocando efeito subletais (deformidades) por exposição crônica, ou efeito agudo causando a morte dos organismos. Assim, o objetivo do estudo foi determinar a faixa de mortalidade, assim como alterações na postura da espécie de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981, pela exposição crônica ao Hidrocarboneto Fenantreno a 97 %. Os organismos utilizados na experimentação foram retirados de uma colônia de *C. sancticaroli* estabelecida em laboratório por aproximadamente três anos. Para obter a faixa de mortalidade foram realizados bioensaios agudos de 96 horas, expondo larvas de terceiro instar final e quarto instar inicial. Foram testadas 34 concentrações no intervalo de 0,00375 a 5ppm. A avaliação de alterações na postura foi feita pela exposição crônica de uma geração de *C. sancticaroli* a concentração de 0,12ppm e 0,6ppm. *C. sancticaroli* apresentou maior faixa de sensibilidade ao Fenantreno por exposição aguda em elevadas concentrações, apresentando mortalidade acima de 50% em concentrações maior ou igual a 1ppm, obtendo-se mortalidade de 100% em concentrações maior ou igual de 2ppm. Em relação a postura não ocorreu alterações significativa para o número de ovos em massas ovígeras de fêmeas expostas ao contaminante sob a concentração de 0,12 ppm, enquanto que a exposição a concentração de 0,6ppm provocou a morte das larvas ainda no primeiro instar.

**Palavras chave:** *Bioensaio, Monitoramento Ambiental, HPAs*

## ABSTRACT

The pollution increases in the aquatic environment made for humans actions like factory or domestic detritus has been generated big alterations in the aquatic environment. This made reduction of biodiversity, because by change chemicals and physical of the water, and modifications in the structures community's dynamics. On this scene, the aquatics biomarkers alterations can be used on the monitoring quality environment. The Chironomidae are biomarkers, sensible to any alterations on their environment, and they are relationship with the substratum and the water around them. The humans or nature modifications can act directly or indirectly on the populations making sublethal effect (deformities) for chronic exposure or acute effect madding death the organism. The aim of this study was to evaluate of the mortality band and alterations in number of the eggs by mass *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981, by chronic exposure to Phenanthrene 97%. The organism utilized in the test was sourced of the *C. sancticaroli* cultivation, in laboratory for three years. The mortality band was evaluated by acute bioassay to 96 hours, was exposure third finish stage larvae and fourth early stage larvae. In the test was to used 34 concentrations between 0,00375 and 5 ppm. The determination of the number of the eggs by mass was through chronic exposure of the one generation of the *C. sancticaroli* on two concentrations, 0,12ppm and 0,6ppm. *C. sancticaroli* had the biggest sensibility for acute exposure to Phenanthrene in high concentrations, with mortality above of the 50 percent in concentrations more or even of the 1ppm, with mortality of the 100 percent in concentrations even or above 2ppm. The number of the eggs by mass of the exposure females to pollutant has not significant alteration on exposure the concentration of the 0,12ppm, while the concentrations of the 0,6ppm caused mortality of the larvae in the first stage.

**Palavras chave:** *Bioassay, Environment monitoring, PHAs.*

## SUMÁRIO

<b>1.Introdução</b> .....	2
1.1 Família Chironomidae.....	4
1.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	6
1.2.1 Fenantreno.....	7
<b>2. Objetivo Geral</b> .....	9
2.1 Objetivo Específico.....	9
<b>3. Material e Métodos</b> .....	10
3.1 Material biológico.....	10
3.2 Manutenção da colônia.....	10
3.3 Testes de toxicidade aguda.....	10
3.4 Testes de toxicidade crônica.....	11
<b>4. Resultados e Discussões</b> .....	13
4.1 Testes de toxicidade aguda.....	13
4.2 Testes de toxicidade crônica .....	14
<b>5. Conclusão</b> .....	17
<b>Referência</b> .....	18

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o rápido aumento das atividades agrícolas, mineração, construções de represas, uso inadequado do solo e o despejos de efluentes industriais e domésticos não tratados, têm gerado amplas alterações no ambiente aquático. Isto provoca redução da biodiversidade pela alteração na composição química e física do ambiente, assim como modificações na estrutura e dinâmica das comunidades. Com o aumento da poluição do meio aquático tornou-se necessário o acompanhamento das alterações da qualidade da água e do sedimento (CALLISTO, *et al.* 2001, KLEINE, P. & TRIVINHO-STRIXINO, S. 2005 e BONANI, 2010).

Os métodos mais eficientes no monitoramento ambiental devem se basear em análises que visam determinar o estresse provocado sobre os organismos e os efeitos dos poluentes, possibilitando relacionar a causa e o efeito. Dessa maneira, apenas a utilização de análises químicas e físicas não são adequadas, pois geram respostas momentâneas sendo necessária análises constantes, que são geralmente custosas, o que inviabiliza o uso exclusivos dessas ferramentas para o monitoramento temporal e eficiente. Outra desvantagem é que se as análises foram feitas longe do local de despejos não é possível detectar efeitos sutis do contaminante no ambiente (BUSS *et al.*, 2008, FREIRE, *et al.*, 2008, PRATT & COLER, 1976).

A utilização de organismos Bioindicadores no monitoramento ambiental é essencial para a geração de informações mais completas permitindo uma avaliação integrada dos efeitos provocados por diversas fontes de poluição. Uma vez que os organismos estão em grande parte ou durante toda vida expostos as variações decorrentes no ambiente (FREIRE, *et al.*, 2008, WELLS *et al.*, 2008).

Bioindicadores são organismos, espécies ou comunidades que respondem a situações adversas no ambiente, alterando funções vitais ou acumulando toxinas, escolhidos devido a sensibilidade ou tolerância a diversos parâmetros, como a presença de poluentes (FRANCO *et al.*, 2000).

Dentre os organismos da biota aquática os macroinvertebrados são os mais utilizados. Estes representam uma grande diversidade de espécies que respondem de forma diferenciada ao estresse ambiental (BONANI, 2010).



Possuem ciclo de vida relativamente longo, amostras de fácil obtenção e fácil cultivo em laboratório (MONTEIRO *et al* , 2008). Também apresentam métodos de coletas adequados e bem estabelecidos (CALLISTO & ESTEVES, 1998). Dentre eles destaca-se a família Chironomidae ( BONANI, 2010).

Segundo, Callisto (1998), alguns grupos de espécies de bioindicadores estão diretamente relacionados a um tipo de agente tóxico ou a um fator natural potencialmente poluente, como Oligochaeta em altas densidades e Chironomus (Diptera) em ambientes com grande concentração de matéria orgânica.

O uso combinado de análises químicas tanto para água quanto para o sedimento associado aos bioindicadores possibilita a detecção da causa e dos efeitos dos xenobióticos no ecossistema aquático, sendo atualmente muito utilizado no monitoramento ambiental (DORNFELD, 2006, BUSS *et al.*, 2008).

A toxicidade do poluente pode ter efeito agudo ou crônico sobre os organismos expostos. Segundo resolução CONAMA 357/ 2005, efeito agudo é o efeito deletério provocado por um agente tóxico em um curto período de tempo. Entre eles estão os metais e clorofórmios (SILVA, 2005). Efeito crônico é o efeito deletério causado por agente tóxicos que provocam alterações em funções biológicas como reprodução e crescimento, por exposição durante uma parte ou todo o período do ciclo de vida, por exemplo PCBs (Bifenila Policlorados), HPA (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) e dioxinas que provocam alterações na reprodução e deformidades, as quais podem se estender por mais de uma geração (CONAMA 2005, SILVA, 2005).

Ambos os efeitos, crônicos e agudos podem ser determinados através de testes toxicológicos, nos quais um determinado número de indivíduos, de uma população conhecida, é exposta a contaminantes por tempo estipulado. Posteriormente é determinada a mortalidade ou sobrevivência, assim como alterações morfológicas e fisiológicas, como efeitos comportamentais nos organismos expostos (SILVA, 2005).

## 1.1 A Família Chironomidae

A família Chironomidae (Diptera) compreende 11 subfamílias *Prodiamesinae*, *Buchonomyiinae*, *Chilenomyiinae*, *Usumbaromyiinae*, *Podonominae*, *Aphroteniinae*, *Telmatogetoninae*, *Diamesinae*, *Tanypodinae*, *Orthoclaðiinae* e *Chironominae* e 355 gêneros, apresentando uma ampla distribuição geográfica. No Brasil ocorrem cinco subfamílias *Telmatogetoninae*, *Tanypodinae*, *Podonominae*, *Orthoclaðiinae* e *Chironominae* todas podendo ser encontradas no estado de São Paulo (MENDES, H. F. & PINHO, L. C., 2006).

Os quironomídeos são popularmente conhecidos como vermes de sangue, pela coloração vermelha no estágio de larva (ocasionada pela presença de hemoglobina na hemolinfa de alguns gêneros como *Polypedilum* e *Chironomus*) ou mosquito não picador (devido ao aparato bucal reduzido) (CRANSTON, 1995)

O ciclo de vida possui quatro estágios, ovo, larva (com quatro instar), pupa e adulto. Os imaturos vivem em ambientes dulcícolas onde, geralmente representam os macroinvertebrados mais abundantes (SILVA, 2005)

Os ovos são depositados na água reunidos em uma massa ovígera mucilaginosa que permanece presa ao substrato por um pedúnculo, também constituído por mucilagem (CORBI & STRIXINO, 2006). O número de ovos por massa ovígera pode sofrer variações dentro da mesma espécie podendo ocorrer deposição de 500 a 1045 ovos em *Chironomus sancticaroli* (STRIXINO & STRIXINO, 1982). Com a eclosão dos ovos as larvas passam por quatro mudas, seguidos por um pequeno período de pupa terminando na emergência do imago (SILVA, 2005).

O ciclo de vida pode sofrer variações com alterações da temperatura, tendo em média de 17 dias em temperatura entre 19°C a 26°C para a espécie de *Chironomus sancticaroli* (STRIXINO & STRIXINO, 1995).

As larvas apresentam características típicas de dípteros nematóceros como cabeça completa bem desenvolvida, não retrátil, e com mandíbulas com movimentos oblíquos a horizontal, corpo segmentado, alongado, estreito e sem pernas torácicas (CORREIA, 2004).

No primeiro instar as larvas de *Chironomus* possuem hábito planctônico permanecendo na coluna de água e alimentando-se de bactérias. No segundo instar iniciam a construção de tubos utilizando material, como grãos de areia, presente no ambiente e se alimentam de matéria orgânica. Cada instar possui duração diferenciada sendo o 4º instar o mais longo (BONANI, 2010). Segundo Strixino & Strixino (1982) as larvas de *C. sancticaroli* possuem o primeiro instar com duração de quatro dias, o segundo dois dias, o terceiro também com dois dias enquanto o quarto instar tem duração de seis dias.

As larvas vivem associadas ao fundo ou a vegetação marginal dos corpos de água. Desempenham um importante papel na cadeia alimentar servindo como alimento para diversas espécies de peixes. Em lagos são os principais responsáveis pelo metabolismo secundário disponibilizando a matéria orgânica para os outros organismos presentes no ecossistema. Deste modo, se o sedimento se encontra contaminado com algum composto químico, será diretamente transferido para os outros animais da cadeia trófica, mesmo que estes não estejam em contato direto com o sedimento (SILVA, 2005).

Potencialmente os quironomídeos também disputam o papel primário na bioacumulação, pois armazenam em seus tecidos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros numerosos organoclorados persistentes (BONANI, 2010).

A supremacia numérica e a ampla distribuição geográfica são devidas a adaptações presentes nas larvas principalmente relacionadas a respiração, o que permite a sobrevivência deste organismos em ambientes aonde outros insetos não conseguem se estabelecer (CORREIA, 2004).

No estágio de larva os quironomídeos são capazes de retirar o oxigênio dissolvido na água através de túbulos anais e túbulos proximais originados por prolongamentos do corpo. Outra importante adaptação é a presença de hemoglobina como pigmento respiratório, que torna os quironomídeos tolerantes a ambientes com baixa concentração de oxigênio. Nestes locais os quironomídeos podem ser os únicos representantes da classe Insecta (Silva, 2005).

Esses insetos também podem ser encontrados em locais inóspitos, com elevada concentração de matéria orgânica, (CALLISTO, 1998) alterações de pH, salinidade, extremos de temperatura (SANSEVERINO & NESSIMIAN, 2008), profundidade e correnteza, (CORREIA, 2004).

Na fase adulta os quironomídeos apresentam peças bucais reduzidas (CRANSTON, 1995), não se alimentando e apresentando um acentuado dimorfismo sexual. Nos machos as antenas são proeminentes geralmente plumosas enquanto que nas fêmeas as antenas não apresentam plumagem (CORREIA, 2004). Vivem um curto período tendo apenas a função de reprodução (SILVA, 2005).

A espécie de *Chironomus sancticaroli* foi descrita por Susana Trivinho Strixino e Giovanni Strixino em 1981 a partir de exemplares coletados na região de São Carlos, São Paulo. *C. sancticaroli* apresenta 16 a 18 gerações ao ano, sendo esta variação ocasionada pelas alterações decorrentes na temperatura ambiental (STRIXINO & STRIXINO, 1985).

Os quironomídeos são organismos sensíveis a qualquer alteração que ocorrente no ambiente em que vivem, relacionado não apenas ao substrato, mas também com a massa de água que os envolve. Essas modificações, seja de origem antrópica ou natural pode atuar direta ou indiretamente sobre as populações provocando efeito subletais (deformidades) por exposição crônica, ou efeito agudo causando a morte dos organismos (BONANI, 2010).

## **1.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos**

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos químicos formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio, organizados em anéis (YUAN, *et. al.*,1999, NETTO, *et al.*2000, MEIRE *et. al.* 2007,). As HPAS possuem pouca solubilidade em água, que em geral, diminui com o aumento do número de anéis apresentando alta afinidade a compostos lipídicos. A volatilidade dessas substâncias está diretamente ligada ao peso molecular, sendo maior quanto menor o peso molecular (NETTO, *et al.*2000). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos existem mais de 100 diferentes HPAs. Entretanto apenas 16 são consideradas importantes para o monitoramento ambiental (Tabela I).

São naturalmente encontrados no ambiente sendo resultado, principalmente do metabolismo secundário das plantas, atuando como forma de defesa contra parasitoides e herbivoria (MEIRE, *et al.* 2007). Associam-se a moléculas presente no ambiente formando misturas complexas sendo rapidamente

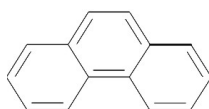
disponibilizados aos organismos. Devido ao caráter lipofílico acumulam-se principalmente no tecido adiposo, pele, pulmões, e trato digestivo provocando alterações nos processos fisiológicos dos organismos presentes no ambiente (VEINTEMILLA,2006, MEIRE *et al.*, 2007). Em elevadas concentrações podem atuar, também como agente mutagênico e cancerígeno estando associado a um aumento de incidência de diversos tipos de câncer nos seres humanos (NETTO, *et al.*2000,MEIRE R. O., *et al.* 2007).

Podem ter a concentração elevada a partir da combustão incompleta da matéria orgânica, incêndios florestais, (MEIRE *et al.* 2007) tráfico de automóveis, derramamento de produtos derivados de petróleo e pela incineração de lixo, fotocopiadoras e fumaça de cigarro (NETTO, *et al.*2000, BISPO,2005 M. LÉON PAUNEM, *et al.*, 2007, PIMNENTEL, 2009) . Entretanto as maiores emissões estão relacionadas a processos ligados a produção de aço e alumínio e por resíduos industriais sólidos (MEIRE *et al.* 2007). Permanecem no ambiente por meses ou anos podendo ser encontradas no solo, na água e no ar (VEINTEMILLA, 2006).

As HPAs são utilizadas em pesquisas, fabricação de tintas, plásticos, pesticidas sendo algumas utilizadas na medicina (U.S.EPA, 2008).

### 1.2.1 Fenantreno

O Fenantreno é uma HPA formada por três anéis aromáticos com fórmula química de  $C_{14}H_{10}$  e peso molecular de 178,22 g/ mol (Figura1). No ambiente é encontrado no estado sólido, incolor como um cristal ou com coloração amarela possuindo um caráter hidrofóbico e lipofílico (U.S.EPA, 2008, VEINTEMILLA, 2006).



**Figura 1.** Estrutura química do Fenantreno

Este composto é utilizado para fazer tinturas, plásticos, pesticidas, explosivos e entorpecentes (U.S.EPA, 2008).

Apresenta alta solubilidade em água, tempo de permanência no ambiente de aproximadamente dois dias, pode ser ingerida pelos organismos se

acumulando na cadeia alimentar, além disso pode atuar como agente mutagênico, o que torna importante o estudo dos efeitos do Fenantreno sobre os organismos aquáticos (NETTO, *et al.*2000).

**Tabela I.** Propriedades físico-químicas dos HPAs. Número de anéis aromáticos; **PM**, peso molecular (g.mol<sup>-1</sup>); **S**, solubilidade (mg.L<sup>-1</sup>); **PV**, pressão de vapor (Pa – Pascal); **H**, constante de Henry (Pa m<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>); **Log K<sub>oa</sub>**, coeficiente de partição (octanol/água). Fonte: MEIRE, *et al.* 2007

HPAs	Nº. de anéis	PM g.mol <sup>-1</sup>	S Mg.L <sup>-1</sup>	PV (Pa)	H (Pa m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	Log K <sub>oa</sub>
Naftaleno	2	128	31	10,4	43,01	3,37
Acenaftileno	3	150	16,1	0,9	8,4	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	0,3	12,17	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	0,09	7,87	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	0,02	3,24	4,57
Antraceno	3	178	0,045	0,001	3,96	4,54
Fluoranteno	4	202	0,26	0,00123	1,037	5,22
Pireno	4	202	0,132	0,0006	0,92	5,18
Benz [a]antraceno	4	228	0,011	2,80.10 <sup>-5</sup>	0,581	5,91
Criseno	4	228	nd	5,70.10 <sup>-7</sup>	0,065	5,86
Benz[b]fluoranteno	5	252	0,0015	nd	nd	5,80
Benz [k]fluoranteno	5	252	0,0008	5,20.10 <sup>-8</sup>	0,016	6,00
Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	7,00.10 <sup>-7</sup>	0,046	6,04
Indeno[1,2,3-d]pireno	6	278	nd	nd	0,003	nd
Dibenzo[a,h]antraceno	5	278	0,0006	3,70.10 <sup>-10</sup>	nd	6,75
Benzo[g,h,i]perileno	6	268	0,00026	nd	0,075	6,50

## **2.OBJETIVO GERAL**

Determinar a taxa de mortalidade da espécie de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae), assim como alterações na postura provocadas pela exposição ao Fenantreno.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a faixa de mortalidade da espécie *Chironomus sancticaroli* pela exposição aguda ao Fenantreno.
- Avaliar alterações na postura dos adultos de *Chironomus sancticaroli* pela exposição crônica ao Fenantreno

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico**

Para os testes foram utilizadas larvas de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae), provenientes de uma colônia mantida a aproximadamente três anos, em sala de criação sob responsabilidade do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

#### **3.2 Manutenção da colônia**

A colônia é mantida em aquários contendo água desclorada e areia como substrato, sob condições de laboratório (25°C e fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) com aeração constante. A alimentação é feita com 5g de ração de cachorro triturada da marca Dog Chaw® adicionada a cada sete dias.

#### **3.3 Testes de toxicidade aguda**

Foram realizados testes toxicológicos agudos para a calibração da concentração letal  $CL_{2}$  e  $CL_{50}$ .

Massas ovígeras providas da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli* foram colocadas separadamente em bandejas de plástico, com água desclorada, mantidas sob condições de laboratório (25°C e fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) com aeração constante. A alimentação foi feita com ração de peixe, macerada, da marca Tretamim® de mesmo modo que a colônia.

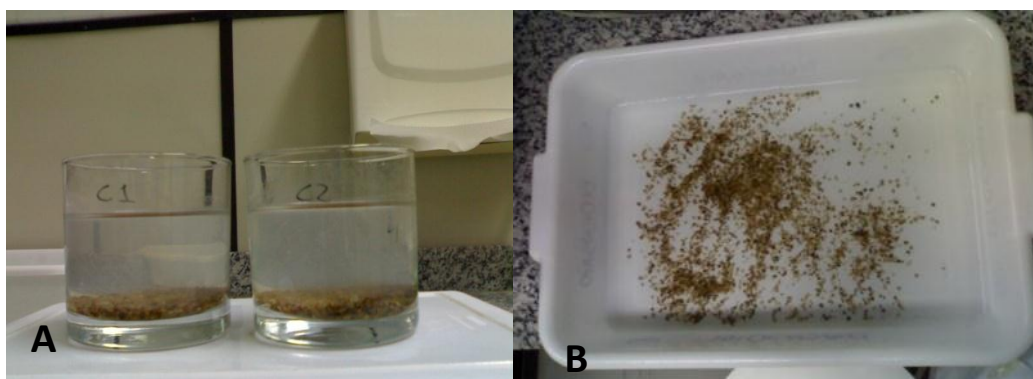
Os testes foram realizados em copos de vidro de 200ml utilizando-se areia como substrato (24g em cada copo)(Figura1).Cada concentração apresentou quatro réplicas com 10 larvas do final do 3° instar e início do 4° instar cada, totalizando 40 larvas por concentração.



Foram realizadas leituras de 96h contabilizando-se o número de larvas mortas e larvas vivas. As larvas mortas eram caracterizadas por se apresentarem alongadas e brancas.

Os copos permaneceram em uma câmara de germinação (BOD) sob condições constante de temperatura a 25°C e de fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro (Figura 2).

Foram testadas 34 concentrações de Fenantreno a 97% da marca Sigma®, para a determinação da faixa de mortalidade, no intervalo de 0,00378 ppm a 5 ppm, totalizando 1280 larvas utilizadas. A determinação da  $CL_{50}$  foi feita através do programa GW Basic Probit utilizando-se as concentrações 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,5, 1,7, 1,9 e 2,1 (todas em ppm), sendo definidas a partir da obtenção da faixa de mortalidade. Esses ensaios tiveram quatro repetições, totalizando 1200 larvas.



**Figura 2:** Copos utilizados na realização dos ensaios agudos (A). Bandeja de leitura (B).

### 3.4 Testes de toxicidade crônica

Massas ovígeras foram retiradas dos aquários da colônia matriz de *Chironomus sancticaroli* e expostas a duas concentrações de Fenantreno a 97% da marca Sigma®, ceno (concentração de efeito não observado) calculada pela  $CL_{50}/10$ , segundo CETESB 1992 e a  $CL_2$  igual a 0,6 ppm.

Os testes foram conduzidos em aquário de (20x30x10cm) com água destilada, contendo uma fina camada de areia (375g) sendo recobertos por uma tela fina (Figura 3). Estes permaneceram em uma câmara de germinação

(BOD) com temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro sob aeração constante até a emergência do imago.

A cada dois dias foram feitas a troca de água dos aquários. Devido que a meia vida do Fenantreno é de dois dias a cada troca de água o composto foi novamente adicionado de forma a manter a concentração constante durante todo o período do experimento.

Os adultos foram retirados dos aquários com auxílio de um sugador e colocados separadamente em gaiolas (controle, réplica um e réplica dois) contendo um frasco com água para a postura. Foi realizado um controle diário retirando-se as massas ovígeras depositadas nos frascos e efetuando-se em seguida a contabilização dos ovos de cada massa sob lupa.



**Figura 3:** Aquário utilizado nos ensaios crônicos (A). Gaiolas de oviposição (B)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Testes de toxicidade aguda

Os testes toxicológicos agudos demonstraram que a faixa de maior mortalidade da espécie de *Chironomus sanctlicaroli* pela exposição ao Fenantreno foi elevada em concentrações iguais ou maiores a 1ppm, apresentando mortalidade de 75% a 1ppm, 97,9 % a 1,9 ppm, obtendo-se mortalidade de 100% dos indivíduos em concentrações iguais ou acima de 2 ppm (Figura 4).

A análise dos dados através do Programa Probit obteve-se a concentração letal CL50 de 1,12 ppm.

Estudos realizado por NETTO, *et al.*(2000) e VIENTILLA (2006) demonstraram que o Fenantreno possuem meia vida de dois dias. Assim, no presente estudo as larvas não permaneceram expostas a concentração total do contaminante durante todo o experimento, apenas nas primeiras 48h. O Fenantreno apresenta caráter lipofílico se associando ao substrato, como as larvas de *C. sanctlicaroli* vivem associadas ao fundo, a utilização do sedimento também reduziu a exposição dos organismo ao contaminante. Dessa forma a sensibilização da espécie de *Chironomus sanctlicaroli* com morte de mais de 50% dos indivíduos ocorreu apenas em elevadas concentrações.

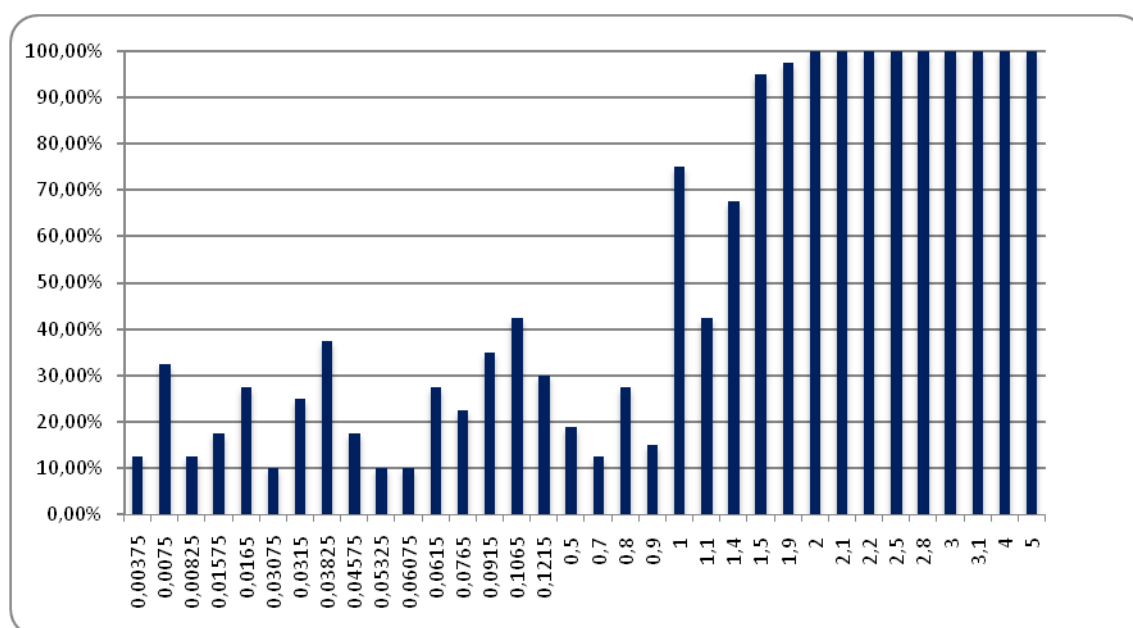


Figura 4. Porcentagem de larvas mortas de *Chironomus sanctlicaroli* submetidas a diferentes concentrações de Fenantreno sob condições de laboratório.

## 4.2 Testes de toxicidade crônica

O Bioensaio crônico apresentou resultados relativos a fecundidade apenas para os organismos que foram expostos a concentração ceno ( $CL_{50}/10$ ) igual a 0,12 ppm. A exposição a concentração  $CL_2$  igual a 0,6 ppm provocou a morte dos organismos logo após a eclosão dos ovos não sendo possível obtenção de massas ovíferas.

No controle ocorreu a emergência de 86 machos e 85 fêmeas, enquanto que dentre os organismos expostos emergiram 109 machos e 99 fêmeas. A partir destes adultos foram obtidas 44 massas ovíferas (Figura 5) no controle e 42 massas a partir de fêmeas expostas ao contaminante (Tabela II), apresentando respectivamente médias de 545, 67 com desvio padrão de 254,41 e 546, 57 ovos por massa ovífera com desvio padrão de 217,25.



**Figura 5:** Massa ovífera do controle de *Chironomus sancticaroli* com 1340 ovos.

A análise dos dados pelo Teste T, através do programa estatístico Past, com 95% de confiança com, demonstrou que não ocorreu diferença significativa entre o número de ovos nas massas ovíferas do controle relacionadas as massas ovíferas de fêmeas expostas a contaminação, obtendo-se um  $T = -0,017$  para  $p = 0,32$ . Os mesmo ocorreu em relação aos adultos que tiveram um  $T = -0,41$  para os machos para  $p = 0,3$  e  $-0,3$  para  $p = 0,5$  para as fêmeas.

Apesar dos organismos ficarem sobre exposição ao composto durante todo o ciclo de vida o Fenantreno não provocou alterações na fecundidade da espécie de *Chironomus sancticaroli*. Isto pode ter sido determinado pela baixa contração de contaminante a qual os organismos foram expostos.

**Tabela II:** Quantidade de massas relacionados ao número de ovos por massa ovígera de *Chironomus* das réplicas do controle e da concentração ceno.

Número da massa obtida	Número de ovos por massa ovígera			
	Controle 1	Controle 2	Ceno 1	Ceno 2
1	737	488	730	536
2	730	560	736	562
3	768	549	651	470
4	675	513	741	665
5	666	719	648	720
7	707	609	598	590,6
8	623	585	632	696
9	232	352	217	409
10	236	554	680	201
11	570	553	667	136
12	453	615	532	185
13	541	520	600	524
14	342	468	1200	473
15	732	157	720	378
16	1340	191	720	528
17	728	128	600	548
18	598	187	642	
19	1187	780	642	
20	211	620	218	
21	215		478	
22	780		549	
23	471		206	
24	272		718	
25	502		116	
Média	596,5	481,47	593,38	476,35

Segundo Netto *et al.* (2000) os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são rapidamente metabolizados pelos organismos, sendo eliminados principalmente pela urina e pelas fezes. Assim a baixa concentração facilitou a metabolização do composto pelos organismos, inibindo a acumulação de

Fenantreno nos tecidos, o que poderia causar alterações na produção, provocando redução no número de ovos por massa ovígera.

Nos organismos expostos a concentração de 0,6 ppm (CL<sub>2</sub>) ocorreu efeito deletério, ainda no primeiro instar larval. Isso demonstra que o Fenantreno em concentrações relativamente baixas pode não ocasionar danos na fecundidade da espécie, mas em elevadas concentrações pode provocar um amplo efeito podendo ocasionar a eliminação dos organismos no ambiente.

Em relação ao número de ovos foi encontrada uma faixa de 128 a 1340 no controle e 116 a 1200 de fêmeas expostas ao contaminante apresentando variação em relação ao encontrado no trabalho de descrição da espécie de Strixino & Strixino (1981) de 500 a 1045 ovos. Entretanto a variação foi semelhante para o controle e para as massas de fêmeas expostas ao contaminante provavelmente não relacionado aos efeitos provocados pelo hidrocarboneto. Este resultado pode ser conseqüência da utilização de material biológico mantido sob condições de laboratório durante longo período de tempo, que pode afetar a variabilidade genética, diferente de avaliações de populações obtidas diretamente do campo. Por outro lado, a utilização de organismos com reduzida variabilidade genética pode fornecer resultados mais homogêneos do comportamento da espécie frente a xenobióticos.

Contudo os ensaios de toxicidade crônica demonstraram que em concentração de 0,12ppm o Fenantreno não provoca nenhum efeito na fecundidade da espécie de *Chironomus sancticaroli* para a geração exposta, que manteve o número de ovos por massas ovígera. Entretanto as massas de ovos não foram acompanhadas posteriormente e portanto, não foi possível determinar a viabilidade dos ovos que necessitaria de estudos posteriores.

## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie *Chironomus sancticaroli* sob exposição aguda de 96h ao Fenantreno apresenta mortalidade abaixo de 50% em concentrações menores que 1ppm, tendo 100% de mortalidade em concentrações iguais ou maiores que 2 ppm.

A concentração letal CL<sub>50</sub> do Fenantreno para a espécie de *C. sancticaroli* é igual a 1,12 ppm.

A fecundidade da espécie *Chironomus sancticaroli* não sofre alterações sob exposição crônica a uma concentração de 0,12 ppm.

As larvas de *Chironomus sancticaroli* possuem maior sensibilidade ao Hidrocarboneto Fenantreno no estágio de primeiro instar, apresentando 100% de mortalidade em concentrações de 0,6 ppm e menor sensibilidade no estágio do final do terceiro instar e início do quarto apresentando mortalidade acima de 100% em concentrações iguais ou maiores que 2 ppm.

A partir dos resultados obtidos, pode-se estabelecer que os quironomídeos são bons bioindicadores para a contaminação do Fenantreno, podendo apresentar redução na densidade populacional quando expostos a elevadas concentrações no estágio de primeiro instar larval. Entretanto não apresentam alterações na postura em baixas concentrações, o que torna necessário a o estudo posteriores de diferentes variáveis dentro da biologia da espécie, como crescimento, biomassa e, também da viabilidade dos ovos provindos de fêmeas que foram expostas ao contaminante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE, H. P. **Análise Cienciométrica Global de Bioindicadores: Um Panorama das Tendências Entre os Anos 1998 a 2007.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e da Saúde – Pontifícia Universidade Católica de Goiás) Goiânia (Go), 2010.

BONANI, F. **Avaliação de Deformidades Morfológicas em Larvas de Chironomus (Diptera, Chironomidae) na Bacia do Rio Piracicaba e sua Aplicação no Biomonitoramento.** Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais – Ecologia- Universisade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2010

BISPO, J. R. L. **Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Água Produzida por Extração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama.** Dissertação (Mestrado em Química – Universidade Federal de Sergipe), São Cristovão, 2005

BUSS D. F., OLIVEIRA, R. B.. & BAPTISTA, D. F. **Monitoramento Biológico de Ecossistema Aquáticos Continentais.** Oecologia Brasilienses., 12 (3): 339-345, 2008.

CALLISTO M., GONÇALVES JR. J. F. & MORENO, PABLO. **Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores.** Minas Gerais, 2001.

CALLISTO, M. & F. A. ESTEVES, 1998. **Biomonitoramento da macrofauna bentônica de Chironomidae (Diptera) em dois Igarapés amazônicos sob influência das atividades de uma mineração de bauxita.** pp. 299-309. In Nessimian, J. L. & Carvalho (eds). Ecologia de Insetos Aquáticos. Series Oecologia Brasiliensis, vol. V. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Bras.



ORBI, J. J., STRIXINO, S. T. **Ciclo de Vida de Duas Espécies de *Goeldichironomus* (Diptera, Chironomidae).** Revista Brasileira de Entomologia 50 (1): 72-75, 2006.

CORREIA, L. C. S. **Contribuição para o Gênero *Chironomus* Meigen, 1803 na Região Neo Tropical.** Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais – Concentração em Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2004

**CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA).** Resolução 357/05. Relatório de águas interiores do Estado de São Paulo- 2005.

CRANSTON, P. S. In: ARMITAGE, P., CRANSTON, P. S. and PINDER, L. C. V. **The Cironomidae: The biology and ecology of non-biting midges.** London: Chapman & Hall, 1995.

DORNFELD, C.B. **Utilização de *Chironomus sp* (Diptera, Chiromidae) para a Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais.** Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental – Universidade Federal de São Carlos), São Carlos, São Paulo, 2006.

**ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY - EPA 2008.** Quality criteria for water. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

FRANCO, R. M., RAIMUNDI E. A., RAMOS, F. C., ANTONELLO, R., BOCCHESE, M. G. HAMMERSCHMITT, V. L. & FRANCO G. M. S. **Análise da Qualidade da Água Através do Uso de Mcroinvertebrados Bentônicos em Riacho da Fazenda Tamanduá Vargem Bonita (SC), Brasil,** 2000.

FREIRE, M. M., SANTOS, V. G., GINUINOL, I. S. F., & LINDE, A. R. Biomarcadores na Avaliação da Saúde Ambiental. In Oecologia. Brasilienses., 12(3): 347-354, 2008.

KLEINE1, P. & TRIVINHO–STRIXINO2, S. **Chironomidae and other aquatic macroinvertebrates of a first order stream: community response after habitat fragmentation.** Acta Limnol. Brasilienses., 17(1):81-90, 2005

**MENDES, H. F. & PINHO, L. C.** Diptera: Chironomidae. 2006. <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/chironomidae/chiroindex.htm> *In*: Levantamento e biologia de Insecta e Oligochaeta aquáticos de sistemas lóticos do Estado de São Paulo, <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce>.

MEIRE, R.O., AZEREDO, A. & TORRES, J. P. M. **.Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.** Oecol. Bras., 11 (2): 188-201, 2007.

MONTEIRO, T. R., OLIVEIRA, L. G. & GODOY, B. S. **Biomonitoramento da Qualidade de Água Utilizando Macroinvertebrados Bentônicos: Adaptação do Índice Biotico BMWP' A Bacia do Rio Meio Ponte – GO.** UFGO. *Oecol. Bras.*, 12 (3): 553-563, 2008

PAUMEN, M. L., BORGMAN, KRAAK, M. H. S. GESTEL, C. A. M. & ADMIRAAL, WIM. **Life Cycle Responses of the Midge *Chironomus riparius* to polycyclic Aromatic Compound Exposure.** In Environmental Pollution 152 (2008) 225 e 232.

**NETTO, P. A. D., MOREIRA J .C., ARBILLA, G, FERREIRA L. F. V., OLIVEIRA S. A & BAREK, J.** Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus Derivados Nitratos (NHPAS): Uma Revisão Metodológica, ***Nova Química* 23(6), 2000, 765-773.**

PIMENTEL, P. F. **Fenantreno Remanescente para a Avaliação de Biodisponibilidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Solos.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa) Viçosa, Minas Gerais 2009.

PRATT, J. M. & COLER, R. A., 1976. **A procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers.** *Water Research*, 10:1019-1025

SILVA, A. M. **Avaliação Ecotoxicológica do Agrotóxico Permetrina através de Ensaios de Toxicidade com Invertebrados Aquáticos.** Dissertação (Mestrado em Ciências – Tecnologia Nuclear- Autarquia associada a Universidade de São Paulo), São Paulo, 2005.

STRIXINO, G. & STRIXINO, S. T., 1985. **A Temperatura e o Desenvolvimento Larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae).** In *Revista Brasileira de Zoologia*, São Paulo 3 (4): 177-180, 1985.

STRIXINO, G. & STRIXINO, S. T. **Ciclo de Vida de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino.** *Revista Brasileira de Entomologia* 26 (2): 183 – 189, 1982.

STRIXINO, G. & STRIXINO, S. T. **Nova Espécie do Gênero de *Chironomus* Meigen do Sul do Brasil (Diptera: Chironomidae).** *Revista Brasileira de Entomologia* 25 (4): 333-340.

VEINTEMILLA, C. A. C. **Impactos do Fenantreno sobre o Tambiqui *Colossoma macropamum* Cuvier, 1818: CL<sub>50</sub>, Crescimento e Hematologia.** Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais – Concentração em Ecologia- Universidade Federal do Amazonas), Manaus, 2006.

YUAN, S. Y., S.H. WEI, B.V. CHANG. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture.** *Chemosphere* 41 (2000) 1463±1468

WELLS, P.G.; DEPLEDGE, M.H.; BUTLER, J.N.; MANOCK, J.J. & KNAP, A.H. 2001. **Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine**

**contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 42(10): 799-804.**