



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

DESENVOLVIMENTO DE *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) E SUA TOXICIDADE AO ÓXIDO DE GRAFENO

Luana Barbosa Bispo da **Silva**¹; Ana Lucia Silva **Marigo**²; Vera Lucia Scherholz Salgado de **Castro**³; Claudio Martin **Jonsson**⁴, Mariana Silveira Guerra Moura E **Silva**⁵

Nº 16418

RESUMO - O óxido de grafeno (OG) nanoestruturado apresenta aplicações em diversas áreas e os seus usos promissores têm despertado preocupações sobre o seu risco para a saúde humana e do meio ambiente. Por sua capacidade de precipitação, os sedimentos constituem o depósito final desse contaminante. A espécie *Chironomus sancticaroli* é um inseto bioindicador bentônico suscetível a qualquer alteração, não só no substrato/sedimento, como também na coluna d'água. Substâncias húmicas, como ácido húmico, são macromoléculas poliméricas que estão presentes na natureza e são originárias da decomposição da biota aquática. Estas moléculas podem alterar a biodisponibilidade do OG. No presente trabalho estudaram-se os estágios de desenvolvimento de *C. sancticaroli* para uso em testes ecotoxicológicos sob condições de cultivo no nosso laboratório e avaliou-se o efeito do OG na sobrevivência desse organismo-teste. Na presença ou na ausência de 20 mg L⁻¹ de ácido húmico, o OG não alterou significativamente ($P > 0,05$) a sobrevivência de *C. sancticaroli* mesmo em altas concentração como a de 100 mg L⁻¹. Este dado, juntamente com os de outros estudos, contribuiria no estabelecimento de níveis de segurança de nanomateriais em compartimentos ambientais.

Palavras-chaves: *Chironomus sancticaroli*, grafeno, bioensaio, nanocompostos, ecotoxicologia.

1 Autor, Bolsista Treinamento Técnico 3 (Fapesp): Graduação em Medicina Veterinária, FAJ, Jaguariúna-SP; luanabbds@hotmail.com

2 Colaborador: técnica da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; ana.marigo@embrapa.br

3 Colaborador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br

4 Colaborador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; vera-lucia.castro@embrapa.br

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; mariana.silveira@embrapa.br



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

ABSTRACT - Nanostructured graphene oxide (GO) has applications in many areas and its promising uses have raised concerns about their risk to the human health and the environment. Due its precipitation capacity, sediments are the final disposal of GO as a contaminant. *Chironomus sancticaroli* is a bioindicator benthic insect which is susceptible to any changes, not only in the substrate / sediment, as well as in the water column. Humic substances, such as humic acid, are polymeric macromolecules that are present in the environment and are originating from the decomposition of the aquatic biota. These molecules can alter the bioavailability of the GO. In the present study we investigated development stages of *C. sancticaroli*, for use in ecotoxicological tests, grown under our laboratory conditions. Also we evaluated the effect of the GO on the survival of this test-organism. In the presence or absence of 20 mg L⁻¹ of humic acid, GO not significantly affected ($P > 0.05$) the survival of *C. sancticaroli*, even at highest concentration tested (100 mg L⁻¹). This data, together with those of other studies, would help in establishing security levels of nanomaterials in environmental compartments.

Key-words : *Chironomus sancticaroli*, graphene, bioassay, nanocomposites, ecotoxicology.

1 INTRODUÇÃO

O grafeno e seus derivados têm-se revelado um nanomaterial promissor em diversas áreas, tendo aplicações no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, compósitos, biosensores, sistemas para transporte de fármacos (*drug-delivery*). Também apresenta aplicações ambientais, tais como na remoção de metais, poluentes orgânicos e microorganismos em água e ar contaminados. Os usos promissores destes materiais, como o óxido de grafeno, tem despertado preocupações sobre o seu risco para a saúde humana e do meio ambiente. A presença ambiental dos nanomateriais pode ser em decorrência de seu uso industrial e laboratorial, por descarte inadequado dos resíduos e/ou de seus produtos. (Li et al., 2011a). Surge assim, a necessidade da investigação dos possíveis impactos da nanotecnologia ao meio ambiente (Hu e Zhou, 2013).

Entre os componentes bióticos de um ecossistema aquático, os invertebrados bentônicos estão entre os mais utilizados em biomonitoramento, pois são ubíquos, e conseqüentemente afetados pelos impactos antrópicos nos recursos hídricos (Bonani, 2010). Além disso, sua natureza sedentária permite uma análise espaço-temporal eficiente dos efeitos de poluentes ou de perturbações físicas do meio (Rosenberg e Resh, 1993). Dentre os macroinvertebrados bentônicos, destaca-se a família Chironomidae (Diptera) que é cosmopolita e compõe a maior parte da biomassa de invertebrados, habitando todos os ambientes aquáticos (Cranston, 1995). Os insetos dípteros da família Chironomidae representam uma porção significativa dos organismos bentônicos e desempenham um importante papel, tanto na cadeia alimentar, como na ciclagem de resíduos nos sedimento (Viveiros 2012, apud USEPA, 2000). Nesta família, todo o ciclo larval (constituído por quatro ínstares) ocorre em ambiente aquático e em contato direto com o sedimento (Viveiros, 2012).

Apesar de serem animais bentônicos, estes organismos estão suscetíveis a qualquer alteração não só no substrato/sedimento como também na coluna d'água. Tais alterações podem influenciar indiretamente as populações, sofrendo efeitos agudos (morte ou imobilidade) como também efeitos teratogênicos crônicos (mutagenicidade e alterações do mento).



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

Assim, o uso deste grupo de organismos em avaliações ecotoxicológicas, como as nanopartículas, é importante porque permite a avaliação integral contemplando a interface água/sedimento. Por sua capacidade de precipitação, os sedimentos são o depósito final desses contaminantes antropogênicos, acumulando-se no ambiente aquático. Um habitat essencial para comunidades aquáticas, pois boa parte do ciclo de vida da maioria dos organismos invertebrados está associada a este compartimento (Obrtholserter et al., 2011).

As substâncias húmicas, como ácido húmico, estão presentes na natureza e são originárias de estágios de decomposição de restos de animais e vegetais. Consistem em macromoléculas poliméricas formadas principalmente por grupos carboxílicos e fenólicos. São capazes de solubilizar, em meio aquoso, materiais hidrofóbicos e nanomateriais. Assim, nanopartículas podem ter sua aglomeração reduzida devido à alteração de carga de superfície pela substância húmica (HYUNG et al., 2007, ZHANG et al., 2009), o que por sua vez pode alterar a biodisponibilidade do nanomaterial.

O ácido húmico é uma substância húmica que está presente nos compartimentos solo e água e é originária da decomposição de restos de animais e vegetais. Substâncias húmicas são capazes de solubilizar, em meio aquoso, materiais hidrofóbicos e nanomateriais devido à alteração de carga de superfície (HYUNG et al., 2007, ZHANG et al., 2009). Assim, a biodisponibilidade do nanomaterial em presença da substância húmica pode ser alterada.

No presente trabalho estudaram-se os estágios de desenvolvimento de *C. sancticaroli* para uso em testes ecotoxicológicos sob condições de cultivo no nosso laboratório. Também avaliou-se o efeito do OG na sobrevivência desse organismo-teste influenciada pela presença do ácido húmico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de toxicidade foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP. Foram realizados estudos de toxicidade aguda, cujas etapas seguem abaixo:

2.1 Observação dos estágios de desenvolvimento para uso em testes ecotoxicológicos

Foram retiradas desovas da bandeja plásticas da criação (36 cm de comprimento x 28 cm de largura x 8 cm de altura) contendo até 0,5 cm de areia tratada como substrato, com aeração branda dentro de uma gaiola. As desovas foram depositadas em novas bandejas (24,5 cm de comprimento x 16,5 cm de largura x 7,5 cm de altura) sem substrato, com tela presa a superfície da bandeja (para evitar a entrada acidental de outros insetos), e mantidas com aeração branda, ambiente aclimatado e monitorado (23° C a 26° C), com fotoperíodo 16 horas de luz, em água reconstituída, com a seguinte composição: (solução 1: cloreto de cálcio 14,6 g, água bidestilada 1,0 L; Solução 2: cloreto de potássio 0,37 g, sulfato de magnésio 7,4 g, bicarbonato de sódio 8,4 g, água bidestilada 1,0 L; Solução A: Na₂EDTA.2H₂O 5,0 g, Sulfato ferroso 1,991 g, ácido bórico 5,719 g, cloreto de manganês 0,721 g, cloreto de estrôncio 0,304 g, brometo de potássio 0,0369 g, molibdato de amônio 0,109 g, sulfato de cobre 0,0483 g, sulfato de zinco 0,0548 g, cloreto de cobalto 0,020 g,



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

iodeto de potássio 0,0065 g, selenito de sódio 0,00438 g, água bidestilada 1,0 L; solução C: silicato de sódio 0,122 g, nitrato de sódio 0,0274 g, fosfato de potássio monobásico 0,0143 g, fosfato de potássio dibásico 0,0184 g, água bidestilada 1,0 L; solução D: tiamina 0,075 g, biotina 0,00075 g, água bidestilada 1,0 L). A alimentação foi oferecida após 48 horas da eclosão das larvas com 3 ml de algas clorofíceas - *Pseudokirchneriella subcapitata*, e após esse período a alimentação diária fornecida constituiu-se de 7 mL de solução de ração de peixe (20 g de Tetramim® para cada litro de água reconstituída), e a cada três dias era feita a reposição de água reconstituída perdida por evaporação. Após sete dias da separação das desovas (larvas de 2º instar aproximadamente) eram iniciados os testes (Viveiros, 2012). Estas ações foram realizadas a fim de assegurar a fase larval até o término dos testes e para que todos estivessem sob as mesmas condições ambientais, evitando a presença de fatores que comprometessem os resultados

2.2 Preparo de amostras para teste

As soluções de exposição de óxido de grafeno (OG) na presença e ausência de ácidos húmicos foram preparadas no dia do teste com *Chironomus sancticaroli*, a partir de uma solução mãe de 1 mg/ml em água ultra pura. As soluções foram sonicadas no sonificador Unique Ultra Sonic Cleaner® durante 5 minutos antes da preparação. O experimento foi realizado com sete diferentes concentrações: Controle - água reconstituída, T1 - 20 mg/L Ácido húmico; T2 - 1mg/L OG; T3 - 10 mg/L OG; T4 - 100 mg/L OG; T5 - 1 mg/L OG + 20 mg/L Ácido húmico; T6 10 mg/L OG + 20 mg/L Ácido húmico; T7 - 100 mg/L OG + 20 mg/L Ácido húmico. O volume total de cada uma foi de 70 mL.

2.3 Coleta e ensaios ecotoxicológicos agudos

Trinta minutos antes da retirada das larvas da bandeja previamente cultivadas conforme descrito no item um, foi oferecida a alimentação. Após esse período, foram retiradas aleatoriamente 96 larvas de 2º instar sendo colocadas em oito placas testes, com uma larva por poço. Cada placa continha 12 poços com volume de 5 ml cada um. Foi utilizada uma placa para cada concentração teste. Os organismos foram expostos aos tratamentos por 48 horas. Nesse período realizou-se medições de pH, oxigênio dissolvido (OD) e condutividade elétrica no início (0 hora) e ao término do experimento (após 48 horas). Os organismos foram mantidos em sala climatizada, sob temperatura controlada (23º C a 26º C), em um ciclo 16 horas luz: 8 horas escuro e sem alimentação e aeração durante o período de exposição. Foram realizados testes para verificar mortalidade e/ou imobilidade dos animais em 24 horas e 48 horas, através de um toque sutil, verificando mobilidade e registrando o número de indivíduos móveis vivos em cada tempo de exposição. Também foi observado o desenvolvimento das larvas durante o teste agudo (passagem de larva para pupa) e anotado o número de indivíduos que por acaso tivessem empupado. Para o ensaio de toxicidade foi feito o monitoramento das variáveis biológicas da cultura a fim de se saber se estas variáveis estavam dentro dos padrões estipulados para a realização do teste (sobrevivência do lote após 7 dias maior que 80%). A imobilidade e/ou mortalidade da larva era diagnosticada após a falta de movimento por 15 segundos depois do estímulo mecânico. Após 48h confirmou-se as que morreram ou estavam



imóveis. As larvas faltantes eram consideradas como mortas. Após o final do teste foi calculada a porcentagem de imóveis em 24 e 48 horas em cada concentração teste. Foram realizados dois testes agudos, sob as mesmas condições ambientais a fim de aumentar o numero amostral (teste 1 e teste 2).

2.4 Avaliação dos instares a partir da medição da cápsula cefálica

Além do teste toxicológico, também foi avaliado o desenvolvimento da cultura matriz, por meio da medição do comprimento da cápsula encefálica de larvas de *C. sancticaroli*. As medidas foram comparadas com o trabalho de Strixino (1982), de onde foi obtida a população teste. Para tanto, foram retiradas aleatoriamente larvas da bandeja previamente cultivadas conforme descrito no item 1, e após 48 horas da oviposição colocadas em um placa de petri com álcool 70% durante 30 segundos para fixação. Em seguida depositadas em uma lâmina para visualização da cápsula cefálica no aumento de 8x na lupa estereoscópica binocular, MR.Optika, MD SZP-10. A avaliação do tamanho da cápsula cefálica foi realizada através da medição ventral da cápsula cefálica a partir do cento do mento até a base da cápsula cefálica sendo fotografadas, medidas e registradas através do software Optika View version 7.1.1.5 (Figura 1)

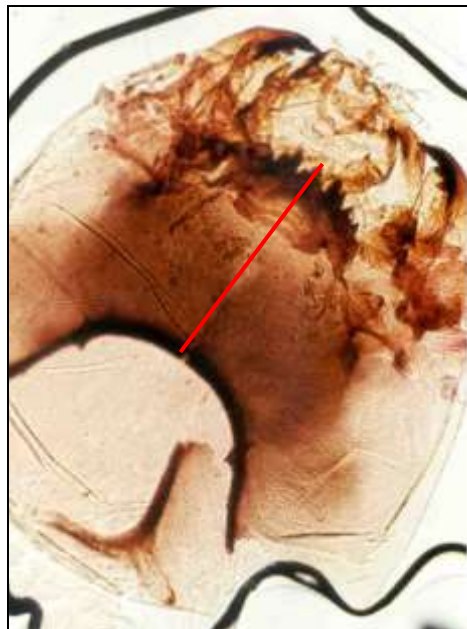


Figura 1 – Vista ventral da cápsula encefálica de *Chironomus sancticaroli* mostrando a área da medição para detecção do ínstar larvar. Foto: Monica Luiza Kuhlmann



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

2.5 Avaliação de dados

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis do módulo “One Way ANOVA” contido no programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (StatPoint Technologies 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os valores das variáveis físicas e químicas de qualidade de água, bem como suas médias e desvio padrão para os dois testes de toxicidade aguda realizados. As médias de pH ficaram dentro da faixa preconizada OECD (2011). E o oxigênio dissolvido apresentou concentrações superiores a 5 mg/L, recomendado pela Resolução CONAMA 357/05 (Brasil, 2005) para criação de organismos aquáticos.

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas em 0 hora e após 48 horas de exposição ao óxido de grafeno.

	0 hora				48 horas			
	pH	OD mg/L	Temp °C	Condut. µS/cm	pH	OD mg/L	Temp °C	Condut. µS/cm
Controle	7,81	6,65	24,9	508	8,24	6,27	25,8	895
T1	7,66	6,55	24,8	494	8,19	6,04	25,7	510
T2	7,73	6,35	24,9	501	7,99	5,89	25,7	513
T3	7,63	6,85	24,9	496	8,05	6,1	25,7	512
T4	7,06	7,04	24,9	449	7,83	5,9	25,6	467
T5	7,65	6,5	24,9	494	7,88	6,59	25,6	511
T6	7,65	7,02	25	489	7,85	6,06	25,5	503
T7	7,01	6,95	25,1	443		6,09	25,6	455
Média:	7,52	6,74	24,92	484,25	8	6,12	25,65	545,75
DP:	0,31	0,26	0,09	24,32	0,16	0,24	0,1	149,18



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

2º teste

	0 hora				48 horas			
	pH	OD mg/L	Temp °C	Condut. µS/cm	pH	OD mg/L	Temp °C	Condut. µS/cm
Controle	7,99	7,95	28,7	507	8,1	6,91	25,7	572
T1					8,05	6,8	25,9	538
T2	8,01	7,23	28,9	504	8,01	6,87	24,9	545
T3	7,94	7,07	28,8	501	8	7,11	24,3	540
T4	7,35	7,65	28,4	452	7,8	7,46	25,8	499
T5	7,98	7,23	28,5	499	8,03	7	25,5	525
T6	7,89	6,59	28,4	493	7,95	7,04	25,7	536
T7	7,2	7,06	28,6	448	7,86	7,43	25,2	488
Média:	7,77	7,25	28,61	486,29	7,98	7,08	25,38	0,53
DP:	0,34	0,44	0,2	25,19	0,1	0,22	0,59	0,02

No primeiro teste agudo realizado, a porcentagem de sobrevivência foi menor no tratamento com 10 mg/L de óxido de grafeno (40%). Já no segundo teste, a porcentagem de sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli* foi alta, sendo igual ou superior a 70% (Tabela 2).



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli* após 24 e 48 horas de exposição ao óxido de grafeno (N = 12 larvas, em duplicata). AH – ácido húmico; OG – óxido de grafeno.

	Tratamento	24 hrs	48 hs
Cont	Controle	100%	92%
Cont	Controle	100%	100%
T1	20mg/L AH	100%	100%
T1	20mg/L AH	100%	92%
T2	1mg/L OG	100%	100%
T2	1mg/L OG	100%	100%
T3	10 mg/L OG	100%	100%
T3	10 mg/L OG	100%	100%
T4	100 mg/L OG	75%	75%
T4	100 mg/L OG	100%	100%
T5	1 mg/L OG + 20 mg/L AH	100%	100%
T5	1 mg/L OG + 20 mg/L AH	100%	100%
T6	10 mg/L OG + 20 mg/L AH	100%	100%
T6	10 mg/L OG + 20 mg/L AH	100%	100%
T7	100 mg/L OG + 20 mg/L AH	83%	83%
T7	100 mg/L OG + 20 mg/L AH	92%	92%

A Figura 1 apresenta graficamente a porcentagem de sobrevivência das larvas no controle e nos sete tratamentos testados. Pode-se perceber pela figura que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; $p = 0,0865$) entre os tratamentos e o grupo controle.

Em outros estudos com o organismo *Hydra attenuata*, foi observado efeitos adversos como desintegração e morte em concentrações 100 mg/L oxido de grafeno (Ferreira et al. 2015)

No presente estudo estão sendo realizados testes crônicos a fim de avaliar se o óxido de grafeno provoca efeitos sub-letais, tais como deformidade do mento em *C. santicaroli*, além de letais como a sobrevivência.

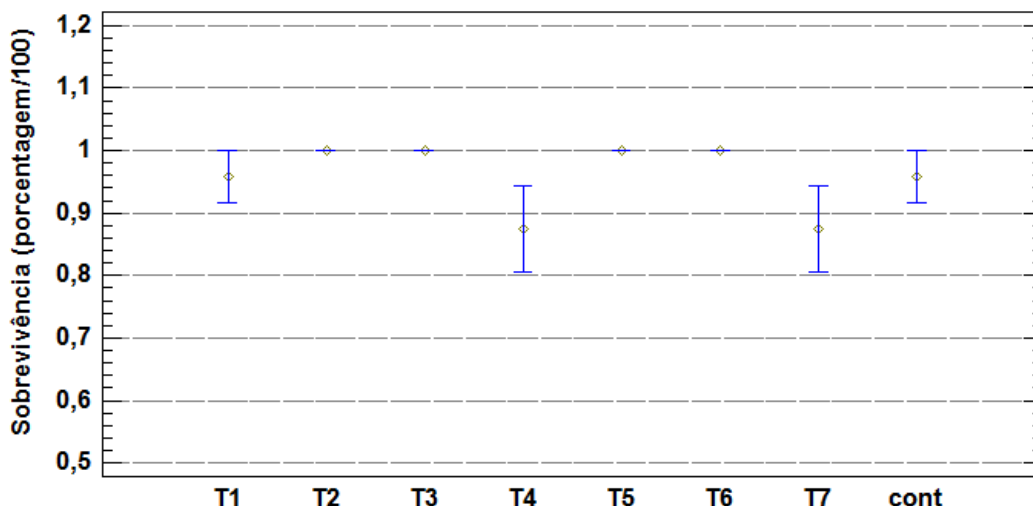


Figura 1. Sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli* no segundo teste agudo após 48 horas de exposição ao óxido de grafeno. Os pontos correspondem às médias de 12 observações (\pm erro padrão), em duplicata.

A figura 2 apresenta os tamanhos da cápsula encefálica (em mm) ao longo do tempo de desenvolvimento, quando criados em temperatura média de 25°C. O quarto e último instar larvar foi atingido no 14º dia, e com exceção do primeiro e do 4º instares, que foram mais longos, em média cada instar durou dois dias.

Os dados obtidos para este parâmetro indicam um tamanho de cápsula cefálica de semelhante em ordem de grandeza ao da cultura da Embrapa Meio Ambiente em relação à cultura da UFSCar (Strixino,1982) (Tabela 3).

Isto assegura o uso da cultura matriz de *C. sancticaroli* da Embrapa Meio Ambiente para uso em testes toxicológicos, uma vez que o correto instar larvar para o começo dos testes é importante na validação de resultados e também para a comparação de resultados entre diferentes laboratórios.

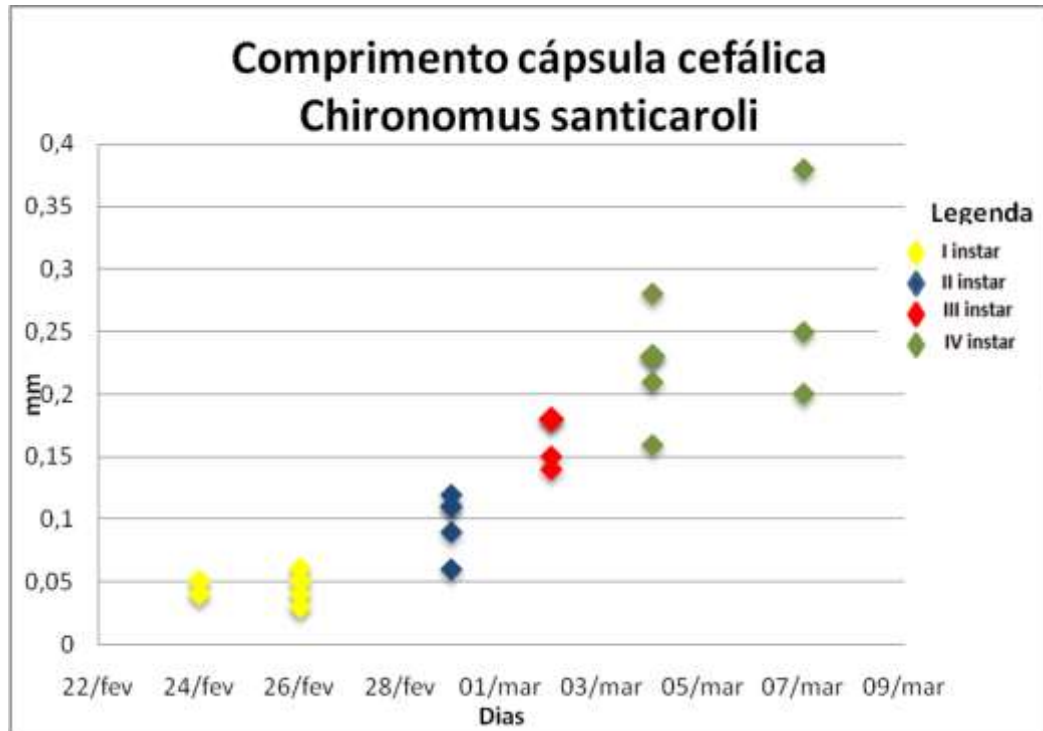


Figura 2. Comprimento da cápsula encefálica de *C. sancticaroli* (em mm) ao longo do tempo.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão do comprimento da cápsula encefálica de *C. sancticaroli* (em mm) ao longo do tempo em comparação com artigo de ciclo de vida do *C. sancticaroli* por (Strixino, 1982).

	Dias	Cultura Embrapa Meio Ambiente	Cultura Strixino (1982)
I instar	4	0,045±0,009	0,060±0,002
II instar	2	0,098±0,021	0,105±0,004
III instar	2	0,160±0,02	0,181±0,008
IV instar	2	0,240±0,065	0,302±0,018

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o OG não altera significativamente a sobrevivência de *C. sancticaroli*, mesmo em altas concentração como a de 100 mg L⁻¹. A presença do material húmico, na concentração de 20 mg L⁻¹, não contribuiu para manifestar efeito adverso do material-teste nas concentrações avaliadas.

Portanto, a concentração efetiva média (CE50-48h) > 100 mg L⁻¹, determinada com base no parâmetro avaliado, categorizaria o material-teste (USEPA, 1985) como “praticamente não tóxico” para *C. sancticaroli*.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa TT1.

REFERÊNCIAS

BONANI, F. Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento. **Dissertação de Mestrado. São Carlos, UFSCar.** p. 80, 2010.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União, Brasília,** 2005.

CRANSTON, P.S. INTRODUCTION. IN: ARMITAGE, P.D., CRANSTON, P.S., PINDER, L.C. The Chironomidae: biology non-biting midges. **London, UK: Chapman & Hall,** p. 1-7, 1995.

FERREIRA, S.B, VALLIM J,H, CLEMENTE,Z, MARTINEZ, D, CASTRO,V.L. Avaliação ecotoxicológica de nanomateriais de carbono em *Hydra attenuata*. **Anais do 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015.** Campinas-SP 2015. 8p.

HU X; ZHOU Q. Health and ecosystem risks of graphene. *Chem Rev.* Hyung H, Fortner JD, Hughes J B, Kim JH. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. **Environ Sci Technol.** 2007; v. 41, n. 1, p. 179-84, 2013.

HYUNG, H; FORTNER, J.D; HUGHES, J.B; KIM, J.H. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. **Environ Sci Technol.** v. 41, n. 1, p. 179-84, 2007.

OBERHOLSTER, P. J.; MUSEE, N.; BOTHA, A. M.; CHELULE, P. K.; FOCKE, W. W.; ASHTON, P. J. Assessment of the effect of nanomaterials on sediment-dwelling invertebrate *Chironomus tentans* larvae. **Ecotoxicology and environmental safety,** v. 74, n. 3, p. 416-423, 2011.

OECD. GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test. p.17, 2011.

STATPOINT TECHNOLOGIES. **Statgraphics Centurion XVII** (Version 17.1.04), StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA, 2014.

STRIXINO, Suzana T. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*. 26. ed. São Carlos: **Rev. Bras. Ent.,** 1982.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Hazard Evaluation Division. **Standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater invertebrates.** Washington, D.C., p. 12, 1985.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 97885-7029-135-6

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticaroli* - do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. 91p.

ZHANG, Y; CHEN, Y; WESTERHO, P; CRITTENDEN, J. Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. **Water Res.** v. 43, n. 17, p. 4249–57, 2009.