

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

PRISCILLE DREUX FRAGA

**Impactos da vinhaça de cana-de-açúcar em macroinvertebrados
aquáticos bentônicos neotropicais**

São Carlos, SP
2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL**

**IMPACTOS DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
MACROINVERTEBRADOS AQUÁTICOS BENTÔNICOS
NEOTROPICAIS**

**Aluno: Priscille Dreux Fraga
Orientador: Dr. Thandy Júnio da Silva Pinto**

Monografia apresentada ao curso
de graduação em Engenharia
Ambiental da Escola de
Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo.

São Carlos, SP
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

F811
i Fraga, Priscille Dreux
Impactos da vinhaça de cana-de-açúcar em
macroinvertebrados aquáticos bentônicos neotropicais /
Priscille Dreux Fraga; orientador Thandy Junio da Silva
Pinto; coorientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. São
Carlos, 2022.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2022.

1. Ecotoxicologia. 2. Espécies nativas. 3. Rejeito
industrial. 4. Bioacumulação. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Priscille Dreux Fraga**

Data da Defesa: 04/05/2022

Comissão Julgadora:

Resultado:

Thandy Junio da Silva Pinto (Orientador(a))

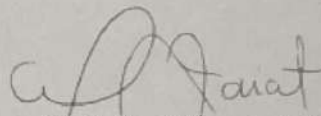
Aprovada

Giseli Swerts Rocha

Aprovada

Laís Conceição Menezes da Silva

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elisa e Beto, por minha criação, apoio e confiança, agradeço imensamente por me tornarem quem eu sou o que me fez chegar a mais esta conquista.

A todos que fizeram parte da minha jornada, aos meus amigos de São José dos Campos, com destaque ao Pedro, meu braço direito, ao pessoal do NEEA, em especial o Thandy por ter me guiando na minha jornada científica, aos meus colegas de turma da engenharia ambiental 016, ao pessoal das extracurriculares SEA, ENGAJ, Projeto RONDON, Naturatica da Costa Rica e aos meus colegas de trabalho da Luxottica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola oportunidade de realizar iniciação científica na área de ecotoxicologia, e por todo apoio e confiança ao longo destes anos.

Ao Dr. Thandy Junio da Silva Pinto que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual. Agradeço toda parceria e paciência ao longo da orientação do presente projeto.

A Dra. Giseli Swerts Rocha e a Me. Laís Conceição Menezes da Silva por aceitarem compor a banca examinadora.

À Dra. Janaina Braga Do Carmo e Dra. Gabriele V. M. Gabriel do Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade (CCTS) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) pelo apoio com as análises de metal.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), pela oportunidade de realização do curso de Engenharia Ambiental.

Ao Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo no 2019/04198-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Martinelli pela oportunidade de participar do projeto temático da FAPESP “Consequências ambientais da conversão pastagem-cana-de-açúcar e intensificação de pastagens” de processo nº 2015/18790-3.

RESUMO

FRAGA, P. D. **Impactos da vinhaça de cana-de-açúcar em macroinvertebrados aquáticos bentônicos neotropicais**. 2022. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022).

Frente ao aumento da demanda e interesse global pela produção de bioenergia, o Brasil ganhou destaque na produção mundial de bioetanol a partir da cana-de-açúcar. Como consequência da intensificação do uso dessa alternativa energética no país, trouxe atenção aos possíveis impactos ambientais resultantes de sua produção, destacando-se a geração da vinhaça, um subproduto com alto potencial de poluição que, ao atingir os cursos d'água, pode impactar as comunidades biológicas, tais como a de macroinvertebrados aquáticos, o que inclui espécies sensíveis à contaminação ambiental. Assim, este trabalho visou realizar a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos da vinhaça de cana-de-açúcar a macroinvertebrados aquáticos bentônicos nativos (*Allonais inaequalis*, *Chironomus sancticaroli*, *Strandesia trispinosa* e *Hyalella meinerti*). Para isso, este trabalho se divide em três fases: a primeira, foram feitos testes de toxicidade aguda, nos quais foram avaliadas a sobrevivência e a mobilidade das espécies e determinadas as concentrações de efeito. Desta forma, foi evidenciado que a espécie *A. inaequalis* (CL₅₀ média = 0,460% intervalo de confiança - IC 0,380-0,540%) foi mais sensível a vinhaça que *C. sancticaroli* (CL₅₀ média 0,721%, IC 0,565-0,878%) seguido das espécies *H. meinerti* (CE₅₀ média 0,781%, IC 0,637-0,925%) e *S. trispinosa* (CE₅₀ média 1,283%, IC 1,045-1,522%). A segunda parte consistiu na avaliação das consequências da exposição crônica ao contaminante, sendo observados efeitos na reprodução e nas taxas de crescimento populacional para *A. inaequalis* e efeitos sob desenvolvimento, metamorfose e crescimento de larvas de *C. sancticaroli*. Por fim, foi determinado o resíduo de metais no conteúdo corporal das duas espécies, evidenciado a bioacumulação de metais pesados tais como Mn, Cd, Zn, Pb e Cr, chamando a atenção para a possibilidade de biomagnificação ao longo das teias alimentares.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Espécies nativas. Rejeito industrial. Bioacumulação.

ABSTRACT

FRAGA, P. D. **Impacts of sugarcane vinasse on neotropical benthic aquatic macroinvertebrates**. 2022. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental – Escola de engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022).

Due to increases in demand and global interest in bioenergy production, Brazil has stood out in the world production of sugarcane bioethanol. The intensification in the use of this alternative energy in the country draws attention to the possible environmental impacts resulting from its production, highlighting the generation of a by-product with a high pollution potential called vinasse. When vinasse reaches watercourses, it may impact the biological communities such as the aquatic macroinvertebrates, which include species sensitive to environmental contamination. Thus, this study aimed to evaluate the ecotoxicological effects of sugarcane vinasse on native benthic macroinvertebrates (*Allonais inaequalis*, *Chironomus sancticaroli*, *Strandesia trispinosa*, and *Hyaella meinerti*). For this, the study was separated into three phases. In the first one, the survival and mobility of the species were evaluated on acute toxicity tests, in which the lethal concentrations were determined. The species *A. inaequalis* (average LC₅₀ = 0.460% confidence interval - CI 0.380-0.540%) was more sensitive to vinasse than *C. sancticaroli* (average LC₅₀ 0.721%, CI 0.565-0.878%), *H. meinerti* (average EC₅₀ 0.781%, CI 0.637-0.925%), and *S. trispinosa* (average EC₅₀ 1.283%, CI 1.045-1.522%). The second part consisted of evaluating the consequences of chronic exposure to vinasse. Effects in reproduction and population growth rates for *A. inaequalis* and on development, metamorphosis, and growth of *C. sancticaroli* larvae occurred. Finally, the metal residuals in the body content for the two species were determined. Bioaccumulation of heavy metals such as Mn, Cd, Zn, Pb, and Cr occurred, attracting attention to the possibility of biomagnification throughout the food webs.

Keywords: Ecotoxicology. Native species. Industrial waste. Bioaccumulation.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Análise química	16
3.2 Testes de Toxicidade Aguda	17
3.3 Testes de Toxicidade Crônica	19
3.4 Análise química de metais	20
3.5 Análise de dados.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Análise química	22
4.2 Testes de Toxicidade Aguda	25
4.2.1 <i>Chironomus Sancticaroli</i>	25
4.2.2 <i>Allonais inaequalis</i>	27
4.2.3 <i>Strandesia trispinosa</i>	28
4.2.4 <i>Hyalella meinerti</i>	30
4.2.5 Sensibilidade dos organismos à vinhaça de cana-de-açúcar.....	31
4.3 Testes de Toxicidade Crônica	33
4.3.1 <i>Chironomus sancticaroli</i>	33
4.3.2 <i>Allonais inaequalis</i>	37
4.4 Bioacumulação	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹	46
APÊNDICE A	54
APÊNDICE B	67

1 INTRODUÇÃO

A energia é um elemento imprescindível para o desenvolvimento da sociedade, sendo utilizada no abastecimento doméstico, transporte, na produção agrícola e industrial, e dessa maneira sua demanda é cada vez mais crescente (DI LEO et al., 2020; GAN et al., 2020; RIVA et al., 2018). A revolução industrial representou um marco no aumento da dependência energética mundial, com destaque para o uso dos combustíveis fósseis, os quais se caracterizam pelo elevado custo de transporte e produção, além da alta taxa de emissão de carbono para a atmosfera (GOLDEMBERG; LUCON, 2007). Ainda, o crescente uso desses recursos implica na possibilidade de esgotamento das reservas e, assim, novas alternativas energéticas começam a chamar atenção (MARTINELLI; FILOSO, 2008). Por consequência, surgiu um interesse global para a produção de bioenergia, tanto para a garantia da segurança energética, quanto para a mitigação das mudanças climáticas (RAVINDRANATH et al., 2009).

A produção de biocombustíveis vem crescendo constantemente e esta tendência continuará nas próximas décadas (SMEETS et al., 2008). Isto vale especialmente para a produção de etanol de cana-de-açúcar, com destaque para o Brasil, que possui extenso território, favorecendo a existência de grandes monoculturas, disponibilidade de recursos hídricos e radiação solar favoráveis para o cultivo da cana-de-açúcar (MARTINELLI; FILOSO, 2008). Dessa maneira, o país passa a representar posição de destaque na produção mundial deste tipo de biocombustível (MCBRIDE et al., 2011), dando início a discussões quanto ao uso desta alternativa energética, bem como, aos possíveis impactos ambientais oriundos da sua produção em larga escala (SECCHI et al., 2011).

Dessa forma, dentre os impactos advindos da produção de bioetanol destacam-se as práticas de manejo no cultivo da cana-de-açúcar, que incluem o uso de agrotóxicos e fertilizantes, que podem influir em riscos para ambientes terrestres e aquáticos (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Além disso, durante o processo de destilação do licor de fermentação do etanol de cana-de-açúcar, ocorre a geração da vinhaça, um subproduto líquido com alto potencial de poluição (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007; WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000).

Como descrito por Parnaudeau et al. (2008), para cada litro de Etanol produzido são obtidos de 8 a 18 litros de vinhaça. Esse composto possui características ácidas (pH: 3,5-5), com aparência de uma pasta marrom escura de odor desagradável, a qual contém uma elevada carga orgânica e de metais (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). De acordo com análises químicas realizadas por Correia et al. (2017) em amostra de vinhaça, este efluente além de apresentar baixo pH (4,37), caracteriza-se por altos valores de DQO demanda química de oxigênio (DQO) (7941 mg L⁻¹), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (25225 mg L⁻¹), de dureza (276 mg CaCO₃ L⁻¹) e concentração de sulfatos e metais tais como potássio (3401 mg L⁻¹), cobre (0,76 mg L⁻¹) e cromo (3,56 mg L⁻¹), estando estes últimos acima do limite máximo permitido pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo de 0,2 mg L⁻¹ e 0,05 mg L⁻¹, respectivamente (CETESB, 2014). Marinho et al. (2014) também verificaram baixo pH (3,9) e altas concentrações de potássio (3401 mg L⁻¹), cromo (3,56 mg L⁻¹), mercúrio (0,0019 mg L⁻¹) e níquel (0,03 mg L⁻¹), estando os três últimos novamente também acima do limite máximo permitido pela CETESB de 0,05 mg L⁻¹, 0,001 mg L⁻¹ e 0,02 mg L⁻¹, respectivamente (CETESB, 2014).

Devido ao grande volume gerado e ao caráter poluidor da vinhaça, fica clara a necessidade da gestão adequada para sua disposição final, buscando não comprometer a qualidade dos solos e recursos hídricos (SILVA BARBALHO; BORGES DE CAMPOS, 2010). No país, até o final da década de 70, a vinhaça de cana-de-açúcar era despejada diretamente em corpos d'água, o que trouxe impactos negativos tanto para as comunidades aquáticas, quanto pela deterioração da qualidade da água para usos diretos e indiretos (SANTA CRUZ et al., 2012). Em novembro de 1978, foi publicada pela Secretaria Especial do Meio Ambiente (SEMA), vinculada ao Ministério do Interior, a Portaria nº 323 de 29 de novembro de 1978 proibindo o lançamento direto ou indireto da vinhaça em qualquer coleção hídrica, pelas usinas sucroalcooleiras, a partir da safra de 1979/1980 (CORAZZA, 2006).

Por consequência, as indústrias produtoras de etanol passaram a buscar um novo destino a esse resíduo e, como principal alternativa, passaram a realizar a fertirrigação das áreas de canavial. Tal processo foi adotado devido a elevada carga orgânica e presença de nutrientes como potássio, cálcio e nitrogênio nesse rejeito, o que pode ser benéfico para o crescimento da cultura (BOTELHO et al., 2012). Assim, dentre as vantagens dessa prática destaca-se a economia de insumos pela redução do uso de

fertilizantes químicos e a possibilidade de disposição de grandes volumes desse rejeito a um relativo baixo custo (CORAZZA, 2006). Por outro lado, ainda existem dúvidas quanto a utilização da vinhaça para esta finalidade, visto que, a longo prazo, o despejo direto pode causar redução da alcalinidade, salinização e alteração no balanço de nutrientes e saturação do solo, além da possibilidade do mesmo atingir e contaminar os recursos hídricos por processos de lixiviação, percolação e escoamento superficial (SANTANA; FERNANDES MACHADO, 2008; SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Ao atingir os cursos d'água, esse contaminante pode afetar as comunidades biológicas ali presentes, tais como a de macroinvertebrados aquáticos que, como abordado por Ferreira et al. (2011), inclui espécies que são sensíveis à contaminação ambiental. Além disso, a aplicação da vinhaça no solo dos canaviais oferece riscos para os ambientes aquáticos temporários inseridos em tais matrizes, pois durante o período chuvoso (verão) é comum a formação de poças temporárias nas lavouras, sendo esses ambientes utilizados por anfíbios e insetos (p. ex. espécies das ordens Diptera e Odonata) como parte do ciclo de vida (GRIPP et al., 2017).

Considerando todos esses aspectos, a contaminação ambiental pela vinhaça implica em efeitos no desequilíbrio do meio aquático, podendo reduzir a produtividade e diversidade biológica, gerando prejuízos na ciclagem de nutrientes e nas dinâmicas da cadeia alimentar (McBRIDE et al., 2011). Consequentemente, apesar do caráter altamente poluidor da vinhaça já ser reconhecido, como abordado por Magalhães e Ferrão-Filho (2008), apenas as análises químicas não são suficientes para retratar o impacto ambiental que um determinado contaminante está causando em um ecossistema, sendo importante a adoção de testes ecotoxicológicos. Tais ensaios são realizados com organismos bioindicadores, os quais possuem características dentro de um limite de tolerância ecológica, e podem sofrer alterações morfológicas, fisiológicas ou comportamentais quando expostos a um determinado contaminante e, dessa forma, permitem a observação da relação dose-efeito em um sistema e a avaliação de possíveis prejuízos nos serviços ecossistêmicos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Estima-se que ambientes de água doce possuem cerca de 126.000 espécies, sendo a maior parte destas representadas por insetos (60,4%), vertebrados (14,5%) e crustáceos (10%), enquanto o restante se distribuí entre aracnídeos (5%), moluscos (4%), anelídeos (1,4%) e platelmintos (1%), além de outros grupos menores (BALIAN

et al., 2008). Com exceção do grupo dos vertebrados, os macroinvertebrados aquáticos possuem representantes em todos os demais grupos e, portanto, percebe-se que eles constituem uma das principais parcelas da biodiversidade aquática, conseqüentemente, sendo um importante grupo a ser utilizado como bioindicador de contaminação ambiental em testes ecotoxicológicos.

Os macroinvertebrados bentônicos, tais como o inseto *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae), o oligoqueta *Allonais inaequalis* (Oligochaeta: Naididae), e os crustáceos epibentônicos *Hyalella meinerti* (Crustacea: Amphipoda) e *Strandesia trispinosa* (Crustacea: Ostracoda) podem ser utilizados como bioindicadores de estressores ambientais, principalmente porque os seus ciclos de vida contemplam sedimento, coluna d'água e, para *C. sancticaroli*, ecossistemas terrestres na fase adulta. Além disso, são a base da cadeia alimentar e elemento essencial na transferência de energia e nutrientes de produtores primários para níveis tróficos mais elevados, tanto aquáticos quanto terrestres, podendo inferir na estabilidade e resiliência dos sistemas ecológicos (DE CASTRO-CATALÀ et al., 2016, SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

A composição química da vinhaça e a presença de metais são as principais características responsáveis pela toxicidade deste efluente (GARCIA et al., 2017). Dessa forma, por ser uma mistura complexa, torna difícil a identificação de quais elementos presentes neste efluente são responsáveis pela indução de alterações no organismo teste (PEDRO ESCHER, 2014). Ainda, metais pesados, tais como os presentes na amostra de vinhaça, têm uma elevada taxa de bioacumulação e são lentamente liberados no organismo, causando diversos danos (SRIVASTAVA; JAIN, 2010). Nos ecossistemas aquáticos, os metais se tornam um risco potencial a todos organismos expostos, com destaque aos organismos bentônicos que são capazes de acumular estes contaminantes via diferentes rotas de exposição (água e sedimento) (LEPPÄNEN, 1995). Além disso, considerando a importância desses organismos na cadeia alimentar, já evidenciada anteriormente, os metais bioacumulados podem ser transferidos ao longo dos níveis tróficos através da cadeia alimentar (CHAGNON et al., 2015).

Considerando todos os aspectos apresentados é notório que estudos que avaliem os impactos da vinhaça a ecossistemas terrestres e aquáticos devem ser incentivados e fomentados, principalmente pelo volume desse rejeito produzido no país, seu potencial

poluidor e sua utilização como fertilizante nas lavouras de cana-de-açúcar. Dessa forma, destaca-se que a avaliação dos efeitos causados aos macroinvertebrados bentônicos nativos *C. sancticaroli*, *A. inaequalis*, *H. meinerti* e *S. trispinosa*, em ensaios laboratoriais, bem como a verificação da possibilidade desses organismos bioacumularem os metais presentes nesse contaminante, trarão novas discussões e informações acerca das implicações ambientais resultantes da contaminação ambiental provocada por práticas de fertirrigação no manejo da cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos ecotoxicológicos (agudos e crônicos) da vinhaça de cana-de-açúcar a macroinvertebrados bentônicos nativos (*A. inaequalis*, *C. sancticaroli*, *S. trispinosa* e *H. meinerti*) além de e identificar os metais do efluente bioacumulados nas espécies após exposição crônica. Dessa forma, buscamos fomentar novas discussões quanto as implicações ambientais frente a uma possível contaminação pela fertirrigação nos plantios de cana-de-açúcar.

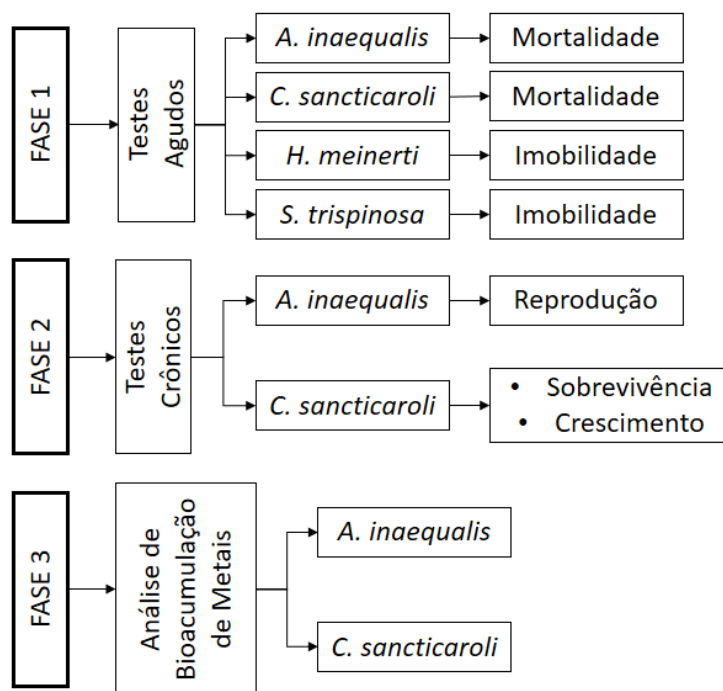
2.1 Objetivos Específicos

- I. Avaliar a toxicidade aguda em organismos aquáticos (*C. sancticaroli*, *A. inaequalis*, *S. trispinosa* e *H. meinerti*) expostos a diluições de vinhaça de cana-de-açúcar a fim de estabelecer as concentrações de efeito e selecionar as espécies mais sensíveis;
- II. Avaliar os efeitos sobre a sobrevivência e crescimento (*C. sancticaroli*) e reprodução (*A. inaequalis*) pela exposição crônica para a verificação dos efeitos em longo prazo para as espécies;
- III. Quantificar a bioacumulação de metais presentes na vinhaça de cana-de-açúcar para as espécies *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em três fases, as quais se encontram destacadas na Figura 1. Na primeira fase, foram executados os testes agudos, avaliando a mortalidade das espécies *A. inaequalis*, *C. sancticaroli* e imobilidade de *H. meinerti* e *S. trispinosa*. A partir dos resultados da fase 1, foram realizados testes de exposição crônica à vinhaça, avaliando a reprodução dos organismos *A. inaequalis*, enquanto para *C. sancticaroli* observou-se a sobrevivência e crescimento (Fase 2). Por fim, na terceira fase, foi feita a análise de bioacumulação de metais nos organismos após à exposição crônica.

Figura 1 - *Design* experimental com a síntese de todos os experimentos e testes realizados durante a pesquisa.



Fonte: Próprio autor (2022).

3.1 Análise química

Todos os testes desenvolvidos no presente trabalho foram realizados utilizando o mesmo lote de vinhaça de cana-de-açúcar, que foi mantido congelado (-20 °C) a fim de preservar as características iniciais. Para caracterização físico-química do efluente

bruto, uma amostra foi enviada ao laboratório de saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), para determinação da demanda química e biológica de oxigênio (DQO e DBO) e de metais. Tais caracterizações seguiram os métodos descritos na 23ª edição do APHA *Standard Methods*. Assim, a quantificação de metais na vinhaça pura foi obtida por espectrofotometria de absorção atômica (AA 240FS VARIAN), a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foi determinada pelo consumo de oxigênio em um tempo de incubação de cinco dias, enquanto a demanda química de oxigênio (DQO) pelo método de refluxo fechado (APHA, 2018).

Além disso, foi determinado no Laboratório de Limnologia do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), o pH (pH-metro micronal B374), condutividade elétrica, salinidade e sólidos totais dissolvidos (condutivímetro Oriom 145). Também foi avaliada a dureza (ABNT NBR 12621, 1995), nitrogênio total (APHA, 2018), nitrito, nitrato e amônia (HANSEN; KOROLEFF, 1999; MACKERTH; HERON; TALLING, 1978), por fim, fósforo total, dissolvido e fosfato inorgânico (ANDERSEN, 1976).

3.2 Testes de Toxicidade Aguda

Foram realizados testes de toxicidade aguda com diluições da vinhaça com as quatro espécies de macroinvertebrados (*C. sancticaroli*, *A. inaequalis*, *H. meinerti* e *S. trispinosa*), as quais já possuíam cultivos estabelecidos no NEEA. Para isso, inicialmente foram realizados testes preliminares a fim de estabelecer as faixas de diluições (5 diluições e controle) a serem utilizadas nos testes definitivos. Os testes de toxicidade foram repetidos 3 vezes para validação dos resultados, sendo determinadas as concentrações de efeito, além das diluições a serem adotadas nos bioensaios crônicos. Para todos os ensaios, a vinhaça bruta foi diluída utilizando água de cultivo, que é preparada utilizando água natural de poço profundo (Pinto et al., 2021), com pH 7,0-7,5, condutividade elétrica 150–160 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e dureza de 40–48 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ para *H. meinerti* e *S. trispinosa* e pH 7,0-7,5, condutividade elétrica 50–55 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e dureza de 12–16 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ para *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*.

As condições gerais dos testes estão sintetizadas na Tabela 1, sendo descrito a seguir os procedimentos específicos para cada uma das espécies:

- **C. sancticaroli**: os organismos foram obtidos a partir da montagem de novas bandejas, para garantia da idade dos mesmos entre 7 e 8 dias de vida (segundo para o terceiro instar de desenvolvimento). O substrato utilizado foi areia lavada e calcinada (550°C por 1h), com as mesmas características que a utilizada nos cultivos, e o teste conduzido em potes de vidro de 400 mL.
- **A. inaequalis**: os organismos foram selecionados pelo comprimento corporal, pois não é possível a sincronização da espécie por idade, já que os mesmos se reproduzem de forma assexuada via fissão (ARMENDÁRIZ, 1999). Os testes foram feitos sem a adição de substrato, em copos plásticos atóxicos de 50ml, conforme condições de ensaio descritas.
- **H. meinerti**: os organismos foram obtidos a partir da montagem de novas bandejas, para garantia da idade dos mesmos entre 7 a 14 dias de vida. O experimento foi realizado utilizando substrato artificial (rede plástica com malha de 2 mm) em copos plásticos atóxicos de 300 mL, com a adição de 200 mL de água de cultivo, seguindo com base na NBR 15470 (2013) conforme as condições de ensaio descritas abaixo.
- **S. trispinosa**: Os organismos foram selecionados pelo tamanho corporal. Os testes foram feitos sem a adição de substrato, em copos plásticos atóxicos de 50 mL, conforme condições de ensaio descritas.

Tabela 1 - Parâmetros gerais adotados nos testes de toxicidade aguda para as quatro espécies de macroinvertebrados.

Parâmetro	<i>A. inaequalis</i> ¹	<i>C. sancticaroli</i> ²	<i>H. meinerti</i> ³	<i>S. trispinosa</i> ¹
Temperatura	25 ± 1 °C			
Iluminação	100 - 1000 lux			
Fotoperíodo	12C:12E			
Sedimento	Sem	60 g	SA ⁴	Sem
Volume de água	10 mL	240 mL	200 mL	10 mL
Renovação da água	Não	Não	Não	Não
Idade/tamanho dos organismos	7.8 ± 0.4 mm	2° para o 3° instar (7 a 8 dias)	7-14 dias	0.93 ± 0.08 mm
Número de organismos por câmara	6	6	10	5
Número de réplicas por tratamento	4	4	4	4
Alimentação	Não	1,0 mL ⁵	0,5 mL ⁶	Não
Frequência de alimentação	-	Início e após 48h	Início e após 48h	-
Duração	96h	96h	96h	48h
Endpoint	Mortalidade	Mortalidade	Imobilidade	Imobilidade
Qualidade da água	Oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica no início e final do teste			
Aceitabilidade do teste	Mortalidade no grupo controle inferior a 10%			

Fonte:

¹Parâmetros estabelecidos com base em Rocha et al. (2018)

² Parâmetros estabelecidos com base em Viveiros (2012)

³ Parâmetros estabelecidos com base na NBR 15470 (2013)

⁴SA - Substrato artificial

⁵Alimento composto por ração TetraMin® na concentração de 5 g L⁻¹

⁶Alimento composto preparado conforme NBR 15470 (2013)

3.3 Testes de Toxicidade Crônica

A partir das concentrações letais obtidas nos testes de toxicidade aguda, foi estabelecida uma faixa de 5 diluições para execução dos ensaios crônicos, considerando como a maior diluição a concentração letal a 20% dos organismos (CL₂₀). As condições gerais de ensaio estão sintetizadas na Tabela 2. Após o final dos testes crônicos, os indivíduos de ambas espécies foram mantidos em água limpa durante 24h para limpeza do trato intestinal, anestesiados e armazenados para a determinação da bioacumulação

de metais. Da mesma forma que para os testes agudos, os bioensaios crônicos foram repetidos três vezes. Para a espécie *C. sancticaroli* os organismos foram fotografados juntamente com papel milimetrado e, posteriormente, o crescimento foi determinado pelo comprimento corporal das larvas que foram medidas com auxílio do software gratuito *Kinovea* 0.8.15 (<https://www.kinovea.org/>), o qual foi calibrado com auxílio do papel milimetrado (PINTO et al., 2021). Para a espécie *A. inaequalis*, a taxa de reprodução foi determinada pelo número de organismos contados ao fim de 10 dias.

Tabela 2 - Síntese das condições de ensaio para os testes crônicos.

Parâmetro	<i>C. sancticaroli</i> ¹	<i>A. inaequalis</i> ¹
Temperatura	25 ± 1 °C	
Iluminação	100 a 1000 lux	
Fotoperíodo	12C:12E	
Massa de sedimento	60	60
Volume de água	240	240
Idade/tamanho	Fim do 1º instar (4 dias de vida)	7,8 ± 0,4 mm
Número de organismos	10	10
Número de réplicas por tratamento	8	8
Frequência de alimentação	A cada 48h	
Alimentação	1,5 mL ²	
Duração	8 dias	10 dias
Endpoint	Sobrevivência e crescimento	Taxa de reprodução
Qualidade da água	Temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido a cada troca	
Aceitabilidade do teste	Mortalidade no grupo controle inferior a 20%	

Fonte:

¹ Parâmetros estabelecidos com base em Rocha et al. (2018) e em Pinto et al. (2021)

² Alimento composto por ração TetraMin® na concentração de 5 g L⁻¹.

3.4 Análise química de metais

Os organismos preservados foram secos (60°C) até a peso constante para determinação da biomassa seca (± 0,01 mg). Os metais foram extraídos por digestão ácida com mistura de 5 mL de HNO₃:H₂O₂ (2:1 - v:v) em banho maria (80 °C) por 4h. Após isto, o volume da amostra foi completado até 10 mL com HNO₃ (2M). Um branco foi preparado, concomitantemente a digestão ácida, utilizando apenas a mistura de ácido

e peróxido de hidrogênio com o volume completado para 10 mL com HNO₃ (2M) (AFRIDI et al., 2006).

No mais, amostras da solução teste foram colhidas no início de cada teste crônico. As amostras de soluções bruta foram preparadas para análise química por digestão ácida (US EPA, 1992). Os metais foram quantificados por espectrometria de emissão atômica com plasma de microondas (MP-AES 4200, Agilent Technologies). Para a calibração das curvas analíticas, soluções padrões multielementares (Agilent Technologies®) foram utilizadas, exceto para o alumínio e potássio (Sigma-Aldrich®). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram obtidos de acordo com o método descrito por Hage and Carr (2012).

3.5 Análise de dados

A partir dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda (Fase I) foram calculadas as concentrações de efeito para 50% (CE₅₀), 20% (CE₂₀) e 10% dos organismos (CE₁₀), incluindo os intervalos de confiança com limiar de 95%. Para isso foi utilizada regressão não-linear em modelo logístico no software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004). Os valores médios das CEx, assim como os seus limiares inferior e superior foram definidos a partir dos valores obtidos nas três repetições válidas dos testes. Para os testes crônicos (fase II) a sobrevivência e crescimento de *C. sancticaroli* e a reprodução de *A. inaequalis* foram comparadas com o grupo controle por ANOVA de uma via seguida por teste de comparações múltiplas de Dunnet. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Quando os dados não atenderam as premissas de normalidade e homocedasticidade eles foram transformados (raiz e logarítmica). A biomassa seca livre de cinzas, denominada no presente trabalho como biomassa, foi estimada com base no comprimento corporal das larvas, por meio de modelo de regressão linear estabelecido para os cultivos da espécie no NEEA (Biomassa = -0,356 + 0,0766* comprimento, n = 91, r² = 0.92, p < 0,001) (Pinto et al., 2021). Os dados apresentados referem-se às médias e desvios das três repetições. Para todas as análises, diferenças foram consideradas para um nível de confiança de 95% (p < 0,05).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise química

A Tabela 3 apresenta a caracterização físico-química da vinhaça bruta utilizada nos experimentos laboratoriais. Além disso, são apresentados os valores de referência estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2011). A resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011, estabelece valores padrões para a permissão de lançamento direto de efluentes em um corpo receptor. No entanto, o Decreto Lei nº 303, de 28 de fevereiro de 1967, proibiu a disposição da vinhaça de cana-de-açúcar em rios, lagos e cursos d'água (CORAZZA, 2006). Apesar disso, pelos custos com o transporte e da fertirrigação, não é incomum que usinas, principalmente as de pequeno porte, descartem a vinhaça em corpos hídricos. Além disso, são possíveis acidentes e derramamentos durante a estocagem e transporte são possíveis tanto por pequenas quanto grandes indústrias (MARTINELLI; FILOSO, 2008). Dessa forma, considerando a entrada direta ilegal, por acidentes ou pela fertirrigação, é possível observar na Tabela 3 que a vinhaça, em sua forma bruta, extrapola as recomendações previstas na resolução para os valores de pH e nitrogênio total (32 vezes), e para os metais cromo (2 vezes), cobre (3 vezes), manganês (6,2 vezes) e ferro (16 vezes) (CONAMA, 2011), o que implica em impactos aos ecossistemas aquáticos afetados.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos da amostra de vinhaça de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos e valores de referência. Os asteriscos (*) indicam os valores acima do padrão estabelecido pela CONAMA 430/11.

Parâmetros	Vinhaça bruta	Padrão de lançamento de efluentes (CONAMA nº 430/11) ¹
pH	3,91	5 a 9 *
Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	8.420	-
Salinidade (‰)	4,5	-
Sólidos Totais dissolvidos (mg L^{-1})	4.450	-
Dureza ($\text{mg CaCO}_3 \text{L}^{-1}$)	3.500	-
Nitrogênio Total (mg L^{-1})	639	20,0 *
Fósforo Total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	149.670	-
DBO Bruta (mg L^{-1})	46.500	-
DQO Bruta (mg L^{-1})	107.000	-
Cromo (mg L^{-1})	0,207	0,1 *
Cobre (mg L^{-1})	3	1 *
Chumbo (mg L^{-1})	0,34	0,5
Manganês (mg L^{-1})	6,24	1 *
Ferro (mg L^{-1})	246,9	15 *
Níquel (mg L^{-1})	0,183	2
Cádmio (mg L^{-1})	0,025	0,2
Zinco (mg L^{-1})	1,225	5
Cobalto (mg L^{-1})	0,219	-
Lítio (mg L^{-1})	0,031	-
Magnésio (mg L^{-1})	391	-
Antimônio (mg L^{-1})	0,53	-
Alumínio (mg L^{-1})	499,9	-
Bário (mg L^{-1})	1,95	5
Cálcio (mg L^{-1})	1.140	-
Sódio (mg L^{-1})	60	-
Potássio (mg L^{-1})	3.360	-

Fonte: ¹ Padrões de lançamento de efluentes estabelecidos na resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.

Um dos usos atuais para destinação final da vinhaça é a realização da fertirrigação nos plantios de cana-de-açúcar, condição propícia para atingir pequenos riachos

localizados em lavouras de cana indiretamente por escoamento superficial, conforme verificado por Gunkel et al. (2007), que demonstrou que perdas de qualidade da água em um rio localizado em áreas de cultivo de cana-de-açúcar foram devido a práticas de fertirrigação e por contaminações provenientes de uma indústria a montante dos pontos amostrais. A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) possui uma norma técnica que regulamenta critérios e procedimentos para a aplicação da vinhaça de cana-de-açúcar no solo agrícola. Tal normatização estabelece critérios para a realização da fertirrigação pelas indústrias sucroalcooleiras, bem como, a obrigatoriedade de apresentação de um plano anual de aplicação de vinhaça e orientações para monitoramento ambiental dos solos e águas destas áreas (CETESB, 2015). No entanto, vale ressaltar que tal legislação é válida para o Estado de São Paulo, sendo que outros Estados produtores não seguem as restrições estabelecidas pela companhia, cabendo a cada um a regulamentação própria.

Não há um padrão estabelecido para as características físico-químicas da vinhaça pura, já que o efluente possui composição variada dependendo da safra de cana-de-açúcar e das condições de fermentação e destilação aplicadas (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Nesse sentido, a norma da CETESB (2015) prevê o monitoramento da qualidade dos solos e águas nas áreas de fertirrigação com vinhaça a partir do acompanhamento dos parâmetros: pH, sulfato, nitrato, nitrito, e nitrogênio amoniacal e Kjeldhal, potássio, cálcio, cloreto, sódio, magnésio, fósforo total e condutividade elétrica. Os resultados obtidos por amostragens de solo e água devem ser comparados com os valores orientadores propostos na Decisão da Diretoria da CETESB nº 045/2014/E/C/I, de 20/02/2014, a qual dispõe de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo (CETESB, 2014), e também de acordo com os padrões de potabilidade estabelecidos na Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011).

A amostra de vinhaça bruta utilizada no presente estudo apresenta altos valores para os parâmetros estabelecidos para análise nas amostras de água e solo conforme norma da CETESB (2015). São eles: condutividade elétrica ($8420 \mu\text{S cm}^{-1}$) e altas concentrações de nitrogênio (638 mg L^{-1}) e fósforo ($149.660 \mu\text{g L}^{-1}$) totais, cálcio (1140 mg L^{-1}), potássio (3360 mg L^{-1}), sódio (60 mg L^{-1}), além de baixo pH (3,91) que podem influir em alterações na concentração de sais da água, dureza e condutividade elétrica e pH, com prejuízos para as comunidades biológicas, que serão discutidos posteriormente.

Outros metais, tais como alumínio (499,9 mg L⁻¹) e magnésio (391 mg L⁻¹) também apresentam altas concentrações, no entanto, não são citados em nenhuma das normas supracitadas.

4.2 Testes de Toxicidade Aguda

A seguir serão descritos os resultados dos testes de toxicidade aguda para as quatro espécies com diluições de vinhaça, incluindo as concentrações de efeito estabelecidas e seus intervalos de confiança. Vale ressaltar que os dados apresentados são a média das três repetições válidas dos testes e os intervalos de confiança correspondem às três médias estabelecidas. São apresentados também, os parâmetros físico-químicos da água avaliados no início e final dos testes.

4.2.1 *Chironomus sancticaroli*

A Tabela 4 apresenta os valores médios, com seus intervalos de confiança, das concentrações letais a 50, 20 e 10% da população para a espécie *C. sancticaroli*. O coeficiente de variação entre as três repetições foi de 10,823. A CL₅₀ para a espécie foi de 0,721%, com limite superior de 0,878% e inferior de 0,565%. O valor de CL₂₀ obtido foi de 0,652% (0,839-0,466), o qual foi utilizado como a maior proporção de vinhaça nos testes de toxicidade crônica. Nos apêndices são apresentados os resultados individuais de sobrevivência e parâmetros físico-químicos para cada um dos testes agudos realizados com a espécie (Tabela A1, A2, A3).

Tabela 4 - Valores de CL₅₀, CL₂₀ e CL₁₀, obtidos para os testes de toxicidade aguda para a espécie *C. sancticaroli*.

	CL 50	CL 20	CL 10
Valor médio (%)	0,721	0,652	0,615
Limite Superior (%)	0,878	0,838	0,818
Limite Inferior (%)	0,565	0,466	0,412
Coefficiente de variação	10,823	14,258	16,499

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) avaliados no início e fim de cada teste são apresentados na Tabela 5. Tanto para o início, quanto para o final dos testes, o aumento da concentração de vinhaça

implicou numa redução dos valores de pH e oxigênio dissolvido (OD). Em contrapartida, o aumento das concentrações foi acompanhado também por um aumento da condutividade elétrica. Tal padrão de mudança nas características físico-químicas da água é esperado, dada a caracterização da vinhaça bruta apresentada no tópico 4.1. O aumento da condutividade elétrica é atribuído a alta concentração iônica do efluente bruto, principalmente de metais como potássio (33609 mg/L), cálcio (11409 mg/L), magnésio (3919 mg/L), sódio (609 mg/L), alumínio (499,99 mg/L) e ferro (246,9 mg/L).

Ao comparar os parâmetros medidos no início e final do teste (após 96h), percebe-se que a condutividade não sofreu grandes variações, para todas as diluições. No entanto, o oxigênio dissolvido apresentou uma tendência a diminuição e o pH a um aumento (Tabela 5). Em relação ao consumo de oxigênio, a hipótese levantada foi a decomposição da matéria orgânica presente na vinhaça, além da presença de íons em sua forma reduzida que ao serem oxidados consomem o OD, dada a alta concentração de DBO (46500 mg L⁻¹) e DQO (107000 mg L⁻¹) da vinhaça bruta. Além disso, a respiração dos organismos teste também tem contribuições no consumo de OD.

Apesar da diminuição do OD no fim dos experimentos, não houve uma relação direta entre o decaimento das concentrações de OD e o aumento da concentração de vinhaça. Nas maiores proporções de vinhaça (1 e 1,2%) as concentrações de oxigênio no fim do teste foram maiores que na diluição intermediária (0,8%) e próximas aos valores de OD das menores concentrações (0,4 e 0,6%). É importante ressaltar que a partir da diluição de 0,8%, ocorreu uma tendência à mortalidade de 100% dos organismos (Tabelas A1, A2 e A3 no apêndice), o que inicialmente poderia ser atribuído às baixas concentrações de oxigênio dissolvido. No entanto, conforme discutido acima, as maiores concentrações de vinhaça apresentaram valores de OD relativamente altos, próximas às diluições que não apresentaram altas mortalidades (0,4 e 0,6%). Portanto, apesar da diminuição do OD ser um estressor importante, que pode influir sobre a sobrevivência dos organismos, a toxicidade da vinhaça não foi atribuída no presente estudo unicamente a este fator.

Tabela 5 - Valores médios das variáveis físico-químicas avaliadas nos testes de toxicidade aguda com *C. sancticaroli*.

Concentração (%)	INICIAL			FINAL		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
0	7,20±0,1	7,33±0,3	167,07±195,7	7,10±0,0	6,43±0,4	138,25±90,2
0,4	4,74±0,3	7,13±0,1	130,07±2,9	6,90±0,1	5,52±0,0	157,60±8,2
0,6	4,40±0,3	7,10±0,1	166,77±6,0	6,65±0,0	3,37±0,7	180,50±15,8
0,8	5,27±1,9	7,09±0,1	203,53±5,9	6,54±0,1	1,67±0,2	201,00±7,1
1	4,14±0,2	7,05±0,1	241,33±2,5	5,92±0,3	3,61±1,7	247,50±3,5
1,2	4,08±0,2	7,01±0,1	221,50±68,6	5,44±0,8	4,57±0,0	94,35±0,0

4.2.2 *Allonais inaequalis*

A Tabela 6 apresenta os valores médios e intervalos de confiança das concentrações letais a 50, 20 e 10% da população para a espécie. O coeficiente de variação entre as três repetições, para CL₅₀, foi de 8,743%. Dessa forma, o valor encontrado para a mortalidade de 50% dos organismos (CL₅₀) foi de 0,460%, com limite superior de 0,540% e inferior de 0,380%. O valor de CL₂₀ obtido foi de 0,395% (intervalo de confiança 0,528-0,263%), o qual foi utilizado como referência para realização das diluições dos testes crônicos, como relatado para a espécie anterior. As Tabelas A4, A5 e A6 (Apêndice A), apresentam os resultados individuais de sobrevivência e parâmetros físico-químicos para cada um dos testes agudos realizados para a espécie.

Tabela 6 - Valores de CL₅₀, CL₂₀ e CL₁₀, obtidos para os testes de toxicidade aguda para a espécie *A. inaequalis*.

	CL ₅₀	CL ₂₀	CL ₁₀
Valor médio (%)	0,460	0,395	0,363
Limite Superior (%)	0,540	0,528	0,529
Limite Inferior (%)	0,380	0,263	0,198
Coefficiente de variação	8,743	16,726	22,819

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) avaliados no início e fim de cada teste são apresentados na Tabela 7. Assim

como discutido anteriormente para os testes com a espécie *C. sancticaroli*, o aumento das concentrações implicou em uma diminuição do pH e aumento da condutividade, e no fim dos testes a condutividade não apresentou grandes variações e o pH tendeu a aumentar. De forma contrária ao observado para a espécie anterior, não houve uma grande diminuição das concentrações de OD para a diluição de 0,8%, tal fenômeno foi atribuído ao pequeno volume de solução teste utilizado (10 mL) com *A. inaequalis*, que pode favorecer uma reoxigenação por trocas gasosas com a atmosfera. As concentrações de oxigênio relativamente altas confirmam a hipótese descrita anteriormente, de que a toxicidade da vinhaça é devido a sua composição química e não, apenas, a redução do OD.

Tabela 7 - Valores médios das variáveis físico-químicas avaliadas nos testes de toxicidade aguda com *A. inaequalis*.

Concentração (%)	INICIAL			FINAL		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
0	7,05±0,1	7,20±0,3	51,10±4,3	7,26±0,0	7,00±0,2	83,13±28,4
0,4	5,23±0,3	7,12±0,5	93,70±9,5	7,24±0,2	6,68±0,3	112,13±16,3
0,6	4,64±0,3	7,05±0,4	120,57±6,4	7,06±0,3	6,08±0,9	136,00±7,5
0,8	4,42±0,3	7,07±0,4	135,60±3,7	6,95±0,3	5,57±1,1	142,83±8,2
1	4,34±0,2	7,09±0,4	170,07±48,5	6,50±0,8	5,05±1,2	188,07±59,6
1,2	4,11±0,2	6,95±0,4	244,83±5,84	5,84±1,5	5,00±1,1	257,53±95,5

4.2.3 *Strandesia trispinosa*

A Tabela 8 apresenta os valores médios e intervalos de confiança das concentrações de efeito a 50, 20 e 10% dos organismos. No final dos testes agudos não foi observada mortalidade acima de 10% dos organismos no grupo controle e, portanto, os testes foram validados. O coeficiente de variação entre as três repetições, para CE_{50} , foi de 9,296%. Dessa forma, o valor encontrado para a mortalidade de 50% dos organismos (CE_{50} foi de 1,283%, com limite superior de 1,522% e inferior de 1,045%). As Tabelas A7, A8 e A9 (Apêndice A), apresentam os resultados individuais de sobrevivência e parâmetros físico-químicos para cada um dos testes agudos realizados para a espécie.

Tabela 8 - Valores de CE₅₀, CE₂₀ e CE₁₀, obtidos para os testes de toxicidade aguda para a espécie *S. trispinosa*.

	CE 50	CE 20	CE 10
Valor médio (%)	1,283	1,085	0,982
Limite Superior (%)	1,522	1,251	1,115
Limite Inferior (%)	1,045	0,918	0,850
Coefficiente de variação	9,296	7,687	6,735

Os parâmetros físico-químicos avaliados no início e final dos testes se encontram relacionados na Tabela 9. O aumento da concentração de vinhaça, foi acompanhado pela diminuição do pH e elevação da condutividade, sendo que ambos parâmetros não sofreram grandes variações do início para o final dos testes. É interessante destacar que, assim como observado nos experimentos com *C. sancticaroli*, houve uma diminuição considerável no valor de OD nas diluições de 1, 1,2 e 1,4% de vinhaça, atingindo, inclusive o valor de 1,0 mg L⁻¹, enquanto que para as maiores concentrações tal valor manteve-se relativamente estável. Nesse contexto, a elevada carga orgânica pode ter influenciado a diminuição observada no encerramento dos testes. A hipótese levantada para a diminuição de tal efeito nas maiores concentrações é a inibição da atividade microbológica nas maiores diluições, implicando numa desaceleração do consumo de oxigênio. No entanto, observando os resultados dos parâmetros físico-químicos, pode-se inferir que a mortalidade dos organismos não foi causada pela queda do oxigênio dissolvido, visto que nas últimas concentrações (1,6 e 1,8%), onde ocorre maior mortalidade, tal parâmetro é mais elevado (6,2 ± 0,7 e 6,7 ± 0,2 mg L⁻¹, respectivamente).

Tabela 9 - Valores médios das variáveis físico-químicas avaliadas nos testes de toxicidade *S. trispinosa*.

Concentração (%)	INICIAL			FINAL		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
0	6,97 \pm 0,05	7,12 \pm 0,02	157,10 \pm 2,82	7,51 \pm 0,12	6,88 \pm 0,18	310,80 \pm 167,18
1	5,48 \pm 1,22	7,07 \pm 0,04	221,60 \pm 122,19	6,06 \pm 0,48	1,01 \pm 0,01	328,00 \pm 7,81
1,2	4,45 \pm 0,21	6,95 \pm 0,11	308,33 \pm 28,01	4,95 \pm 0,10	2,67 \pm 1,47	381,00 \pm 17,58
1,4	4,44 \pm 0,02	6,91 \pm 0,13	326,67 \pm 88,08	4,77 \pm 0,13	3,77 \pm 2,63	414,67 \pm 7,37
1,6	4,33 \pm 0,07	6,89 \pm 0,19	384,67 \pm 67,31	4,65 \pm 0,08	6,23 \pm 0,71	459,33 \pm 23,86
1,8	4,29 \pm 0,06	6,99 \pm 0,17	451,00 \pm 1,41	4,54 \pm 0,13	6,70 \pm 0,22	492,00 \pm 13,23

4.2.4 *Hyaella meinerti*

A Tabela 10 apresenta os valores médios e intervalos de confiança das concentrações de efeito a 50, 20 e 10% para a espécie. No final dos testes agudos não foi observada mortalidade acima de 10% no grupo controle, portanto, os testes foram validados. O coeficiente de variação entre as três repetições, para CE₅₀, foi de 9,207%. Dessa forma, o valor encontrado para a mortalidade de 50% dos organismos (CE₅₀) foi de 0,781%, com limite superior de 0,925% e inferior de 0,637%. O valor de CE₂₀ obtido foi de 0,651% (intervalo de confiança 0,769-0,533%). As Tabelas A10, A11 e A12 (Apêndice A), apresentam os resultados individuais de sobrevivência e parâmetros físico-químicos para cada um dos testes agudos realizados para a espécie.

Tabela 10 - Valores de CE₅₀, CE₂₀ e CE₁₀, obtidos para os testes de toxicidade aguda para a espécie *H. meinerti*.

	CE ₅₀	CE ₂₀	CE ₁₀
Valor médio (%)	0,781	0,651	0,585
Limite Superior (%)	0,925	0,769	0,691
Limite Inferior (%)	0,637	0,533	0,480
Coefficiente de variação	9,207	9,074	9,018

Os parâmetros físico-químicos avaliados no início e final dos testes se encontram relacionados na Tabela 11. O aumento da concentração de vinhaça, foi acompanhado pela diminuição do pH e elevação da condutividade, a qual não houve

grande variação do início para o fim dos testes. No entanto, para o pH foi observado uma acidificação considerável comparando os valores do início e fim dos testes atingindo, inclusive, valores abaixo de 2. É interessante destacar que, assim como observado nos experimentos com *C. sancticaroli* e *S. trispinosa*, houve uma diminuição considerável no valor de OD nas diluições de vinhaça acima de 0,8%, atingindo valores próximos a 2,0 mg L⁻¹. Nesse contexto, a elevada carga orgânica da vinhaça de cana-de-açúcar pode ser atribuída como influenciadora da queda no oxigênio dissolvido observado no encerramento dos testes agudos.

Tabela 11: Valores médios das variáveis físico-químicas avaliadas nos testes de toxicidade com *H. meinerti*.

Concentração (%)	INICIAL			FINAL		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade (µS/cm ²)	pH	OD (mg/L)	Condutividade (µS/cm ²)
0	7,26 ± 0,20	7,53 ± 0,46	129,63 ± 52,34	7,23 ± 0,07	6,63 ± 0,17	166,43 ± 4,55
0,6	5,1 ± 0,73	7,17 ± 0,04	250,33 ± 14,36	6,65 ± 0,39	3,95 ± 0,44	241,67 ± 24,58
0,8	4,87 ± 0,50	7,14 ± 0,10	267,67 ± 31,98	6,83 ± 0,21	2,35 ± 1,35	283,67 ± 9,45
1	4,69 ± 0,49	7,18 ± 0,11	321 ± 7,81	6,63 ± 0,28	2,11 ± 1,14	310 ± 8,88
1,2	4,55 ± 0,46	7,12 ± 0,12	355,67 ± 13,32	6,43 ± 0,39	2,48 ± 0,55	337,33 ± 12,90
1,4	4,46 ± 0,44	7,2 ± 0,18	382 ± 11,14	6,20 ± 0,24	2,53 ± 0,07	365,33 ± 4,16

4.2.5 Sensibilidade dos organismos à vinhaça de cana-de-açúcar

A espécie *A. inaequalis* (CE₅₀ média = 0,460% intervalo de confiança 0,380-0,540%) foi mais sensível a vinhaça que *C. sancticaroli* (CE₅₀ média 0,721%, intervalo de confiança 0,565-0,878%) seguido das espécies *H. meinerti* (CE₅₀ média 0,781%, intervalo de confiança 0,637-0,925%) e a *S. trispinosa* (CE₅₀ média 1,283%, intervalo de confiança 1,045-1,522%). Além disso, a espécie *A. inaequalis* apresentou maior sensibilidade que o relatado para o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (CE₅₀ média 0,67%), *C. sancticaroli* e *H. meinerti* foram mais sensíveis que o, também microcrustáceo, *Daphnia magna* (CE₅₀ média 0,80%), enquanto o Ostracoda *S. trispinosa* apresentou-se mais sensível apenas que o peixe *Danio rerio* (CE₅₀ média 2,62%) (BOTELHO et al., 2012). É importante frisar que a amostra de vinhaça utilizada no presente estudo apresenta um maior caráter poluente que a utilizada por Botelho et al. (2012), com um conteúdo de

nitrogênio e fósforo 1,6 e 5 vezes superior e maiores concentrações dos metais potássio (2 vezes), cálcio (3 vezes), magnésio (2,4 vezes), ferro (7 vezes), zinco (2,2 vezes), e cobre (3 vezes).

Quanto ao pH acidificado, ao investigar a toxicidade da vinhaça de cana-de-açúcar, Botelho et al. (2012) observaram aumento dos valores de CE₅₀ após ajuste dos valores de pH de 4,0 para 7,0. Assim, os resultados de CE₅₀ depois do ajuste de pH, aumentaram 4,5 vezes (final 2,99%) para *C. dubia*, 7 vezes (5,62%) para *D. magna*, e 3,2 vezes (final 8,34%) para o peixe *D. rerio*. Tais resultados demonstram que o valor de pH da vinhaça pode influir na sobrevivência dos organismos. O valor de pH da vinhaça crua utilizada para os testes do presente estudo (3,90), assim como das diluições iniciais (Tabelas 5, 7, 9 e 11) são próximo ao do estudo citado, indicando que, de forma semelhante a Botelho et al. (2012), tal parâmetro pode ser um determinante para a toxicidade observada para *C. sancticaroli*, *A. inaequalis*, *S. trispinosa* e *H. meinerti* no presente estudo.

Ainda, todas as espécies testadas no presente trabalho foram mais sensíveis a vinhaça que os microcrustáceos *D. magna* (3,6%) e *D. similis* (2,2%), e para a alga *Pseudokirchneriella subcaptata* (1,6%) e o cnidário *Hydra attenuata* (2,3%) (FERREIRA et al., 2011). Vale ressaltar que, mesmo que as amostras de vinhaça apresentem pH e condutividade similares, o contaminante utilizado no presente estudo apresenta maior potencial poluidor, dado que o mesmo apresenta um valor de DQO e DBO 2,5 e 4 vezes maior, respectivamente, quando comparado com o estudo citado. As concentrações de metais também apresentam concentrações mais elevadas sendo 1,5 vezes para potássio, 2,5 para o cálcio e 1,4 para o magnésio.

Ainda, ao testar os mesmos organismos após tratamento da vinhaça com o fungo *Pleurotus sajor-caju*, Ferreira et al. (2011) notou a redução da toxicidade do contaminante para os organismos *D. magna* em cerca de 18,4 vezes (66%), *D. similis* de 9,5 vezes (21%), *P. subcaptata* de 9,4 vezes (15%) e *H. attenuata* de 7,7 vezes (17,7%). O tratamento do efluente pelo fungo resultou em aumento do pH (1,36 vezes) e redução nos parâmetros de turbidez (99,9% menor), condutividade elétrica (18% menor) e das concentrações de DQO (83% menor), DBO (76% menor), fosfato (85% menor), magnésio (24% menor) e potássio (8,7% menor).

A vinhaça apresentou efeitos tóxicos e, dependendo da dose, citotoxicidade após exposição aguda (96h) de tilápias (*Oreochromis niloticus*). Foram observadas alterações

morfológicas no tecido branquial, além de mudanças no conteúdo de polissacarídeos do fígado dos indivíduos e aumento significativo nas células mucosas em diluições de 1 a 5%. Nas maiores concentrações (5% e 10%) a vinhaça apresentou letalidade, que também variou com a composição de cada amostra testada (CORREIA et al., 2017; MARINHO et al., 2014). Em testes com a mesma espécie, Coelho et al., (2018) estudaram os efeitos da vinhaça *in natura* e lixiviada na diluição de 2,5%, e observaram, em ambos os tratamentos, toxicidade do contaminante, o qual foi capaz de promover alterações significativas aos organismos, principalmente no fígado das tilápias. Finalmente, Garcia et al. (2017) destacam que a toxicidade da vinhaça é possivelmente induzida pela presença de metais e baixo pH do efluente, com indicações de alterações genotóxicas.

4.3 Testes de Toxicidade Crônica

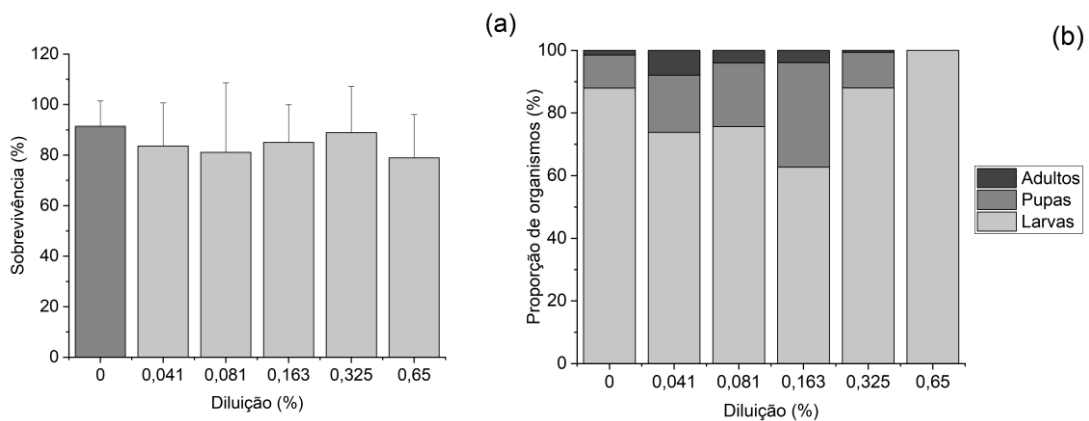
Após a realização dos testes de toxicidade aguda, foram selecionados os organismos que demonstraram maior sensibilidade à vinhaça de cana-de-açúcar, *C. sancticaroli* e *A. inaequalis*, para a realização dos testes de exposição crônica.

4.3.1 *Chironomus sancticaroli*

A Figura 2(a) apresenta os valores médios e os desvios padrões para a sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli* nos testes crônicos. A sobrevivência média no controle foi de $92,08 \pm 6,88\%$ e os testes foram validados. Não houve efeito na sobrevivência das larvas em nenhuma das diluições testadas ($p > 0,05$, Figura 2), com taxas de sobrevivência de $84,30 \pm 9,26\%$, $82,77 \pm 14,38\%$, $85,79 \pm 10,27\%$, $91,25 \pm 14,42\%$ e $80,27 \pm 10,29\%$ da menor para a maior concentração, respectivamente. Na Figura 2(b) são discriminados os percentuais de larvas, pupas e adultos vivos, registrados no fim dos testes, após 8 dias de exposição. Na diluição de 0,163% de vinhaça ocorreu uma aceleração no desenvolvimento e metamorfose das larvas, com formação de pupas ($28,61 \pm 20,51\%$) superior ao controle ($9,72 \pm 8,67\%$, $p < 0,001$). Além disso, após oito dias foram observados adultos no controle ($1,39 \pm 2,40\%$) e nas menores diluições de vinhaça (0,041 a 0,325), no entanto não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Na maior concentração avaliada (0,65%) não houve a formação de pupas e adultos no fim do experimento, com diferenças

observadas no número de pupas em comparação ao controle ($p < 0,01$). A hipótese levantada foi um atraso no desenvolvimento larval provocado pela vinhaça. Efeitos semelhantes foram observados em larvas de *C. sancticaroli*, que atrasaram o desenvolvimento quando expostas ao metal antimônio e ao hidrocarboneto fenantreno (MORAES et al., 2014; RICHARDI et al., 2018).

Figura 2 - (a) Sobrevivência média total nos testes crônicos com *C. sancticaroli*. Barras representam os desvios na sobrevivência total dos organismos. (b) Proporção de organismos, sendo que as diferentes cores apresentam o percentual de larvas, pupas e adultos encontrados vivos ao fim dos experimentos. O percentual de pupas foi maior que o controle na diluição de 0,163% e menor que o controle na diluição de 0,65% ($p < 0,01$).

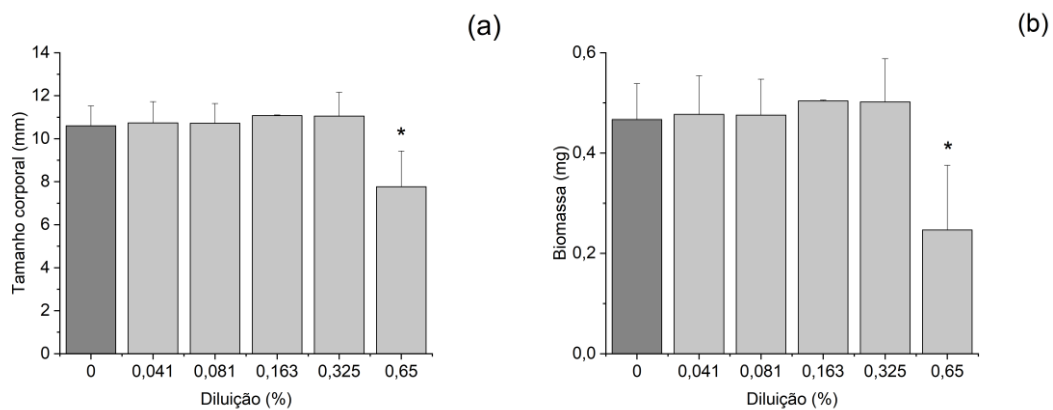


Fonte: Próprio autor (2022)

Os valores médios para tamanho corporal e biomassa ao fim dos testes crônicos com *C. sancticaroli* são apresentados na Figura 3. O grupo controle apresentou um comprimento corporal médio de $11,60 \pm 0,92$ mm e biomassa de $0,46 \pm 0,07$ mg. Não houve efeito no crescimento larval nas baixas diluições de vinhaça, de 0,041 a 0,325% ($p > 0,05$). Apesar da biomassa média das larvas na concentração de 0,163% ($0,50 \pm 0,002$ mg) não apresentar diferença do controle, essa diluição apresentou maior porcentagem na formação de pupas, conforme descrito anteriormente (Figura 2b). Sibley et al. (1997) notaram que as larvas de *C. tentans* iniciam a metamorfose (formação de pupas) quando atingiram uma biomassa mínima de 0,5 mg, demonstrando que há um acúmulo mínimo de energia a fim de que se inicie a metamorfose para o gênero. Além disso, estudos tem demonstrado que larvas de quironomídeos são capazes de identificar a contaminação do sedimento por metais e apresentam diferentes

mecanismos de fuga desses contaminantes (BELOWITZ; LEONARD; O'DONNELL, 2014; DE HAAS et al., 2006; WENTSEL et al., 1977). Dessa forma, a hipótese levantada para o adiamento da metamorfose na diluição intermediária (0,163%) foi um comportamento de fuga do ambiente contaminado, já que as larvas possuíam condições de crescimento suficientes para tal processo.

Figura 3 - Tamanho corporal (a) e biomassa seca livre de cinzas (b) das larvas de *C. sancticaroli* (média ± DP) após 8 dias de exposição a vinhaça. Valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$) são indicados por asteriscos (*).



Fonte: Próprio autor (2022)

De forma contrária, observou-se uma diminuição do crescimento larval na diluição de 0,65% com comprimento corporal médio de $7,76 \pm 1,66$ mm, reduzido em 33% em comparação com o controle ($p < 0.05$). Houve também uma redução de 50% na biomassa ($0,24 \pm 0,13$ mg, $p < 0.05$, Figura 3). Em estudo com quatro espécies distintas de quironomídeos (*C. riparius*, *C. prasinus*, *C. tentans* e *C. plumosus*), foi observado que uma das características em comum para todas as espécies é que a maior parte do alimento consumido é convertida em biomassa durante a fase de crescimento larval (PÉRY; MONS; GARRIC, 2005). Em contrapartida, organismos expostos a estressores, tais como a contaminação ambiental, terão menos energia disponível para crescimento do que indivíduos não estressados, o que implica em menor aquisição de biomassa e menor comprimento corporal (LIBER et al., 1996), tal como observado no presente estudo.

Segundo Liber et al. (1996), a relação existente entre o retardamento do crescimento de *C. tentans* e a redução da formação de organismos adultos é de 1:1,

quando o crescimento das larvas foi 35 a 50% menores em relação ao controle, levando a uma redução no número de adultos formados. Não foi encontrada na literatura uma relação entre biomassa e formação de adultos para *C. sancticaroli*, no entanto, para a concentração de 0,65% a redução da biomassa corporal foi cerca de 50% e tal diluição foi a única que não apresentou a formação de pupas e adultos. Portanto, os organismos expostos a esta concentração de vinhaça não cresceram o suficiente para atingir a metamorfose, conforme discutido anteriormente.

A exposição dos organismos a estressores químicos desencadeia declínios populacionais severos, que podem ser inferidos a partir do crescimento das fases iniciais de vida e, portanto, essa resposta pode ser vista como uma medição lógica para toxicidade crônica de contaminantes (LIBER et al., 1996). Evidências demonstram que a redução do crescimento larval de quironomídeos está associada com um declínio proporcional por uma diminuição na emergência e na reprodução das fêmeas adultas, o que leva a um menor número de larvas em uma próxima geração, implicando na redução do tamanho populacional podendo levar a extinção local (SIBLEY; BENOIT; ANKLEY, 1997).

Por fim, de acordo com o estudo de Fonseca e Rocha (2004), a média do comprimento corporal das larvas de *C. sancticaroli* no IV *instar* de desenvolvimento está entre 9,37 e 15,1 mm, enquanto que a média é de 5,12 a 6,60 mm para o III *instar*. Dessa forma, é possível notar que o comprimento corporal médio do grupo controle no presente estudo, assim como nas diluições entre 0,041 a 0,325%, é compatível ao IV *instar*. Em contrapartida, como já destacado anteriormente, as larvas expostas à concentração de 0,65% de vinhaça apresentaram tamanho corporal médio inferior ao controle ($7,76 \pm 1,66$ mm), não atingindo a média do IV *instar*, o que pode evidenciar o atraso no desenvolvimento larval discutido com os dados de sobrevivência.

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) avaliados no início e fim de cada teste são apresentados na Tabela 12. Tanto para o início, quanto para o final dos testes, o aumento da concentração de vinhaça implicou numa redução dos valores de pH, assim como, um aumento da condutividade elétrica. Tal padrão de mudança nas características físico-químicas da água é esperado, dada a caracterização da vinhaça bruta apresentada no tópico 4.1. Dessa forma, o aumento da condutividade elétrica e acidificação do meio é atribuído ao baixo pH do efluente bruto, tal como abordado anteriormente. Para o oxigênio dissolvido, não houve

grandes variações de concentração conforme o aumento da diluição no início dos testes crônicos. Ao comparar os parâmetros medidos no início e final dos testes (após 8 dias), o oxigênio dissolvido apresentou uma tendência a diminuição, enquanto o pH e condutividade a aumento, conforme observado nos testes agudos.

É importante ressaltar que na maior diluição (0,65%) ocorreu uma grande queda no valor do OD do início ($7,17 \pm 0,2$ mg/L) para o final dos testes ($2,83 \pm 0,7$ mg/L). Não foi feita a aeração artificial das réplicas desse tratamento, pois considera-se que a diminuição do OD é um estressor inerente da contaminação pela vinhaça, conforme será observado no tópico 7.4, que foi mantido nos experimentos laboratoriais. As Tabelas B1, B2 e B3 (Apêndice B), apresentam os resultados individuais de sobrevivência e parâmetros físico-químicos para cada um dos testes crônicos realizados para a espécie.

Tabela 12 - Valores médios das variáveis físico-químicas avaliadas nos testes de toxicidade crônica com *C. sancticaroli*.

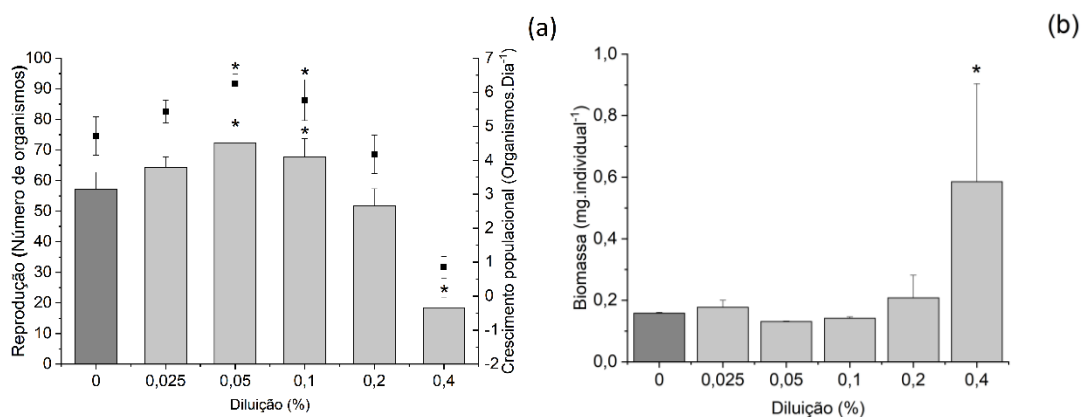
Concentração (%)	INICIAL			FINAL		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
0	$7,10 \pm 0,0$	$7,48 \pm 0,1$	$52,27 \pm 11,7$	$7,14 \pm 0,2$	$5,99 \pm 0,5$	$90,23 \pm 10,0$
0,041	$7,00 \pm 0,1$	$7,39 \pm 0,2$	$60,37 \pm 1,4$	$7,17 \pm 0,2$	$5,69 \pm 1,0$	$127,05 \pm 0,1$
0,081	$6,76 \pm 0,1$	$7,30 \pm 0,1$	$63,80 \pm 1,3$	$7,25 \pm 0,1$	$5,36 \pm 1,4$	$138,75 \pm 6,7$
0,163	$5,97 \pm 0,2$	$6,24 \pm 1,6$	$80,43 \pm 3,0$	$7,27 \pm 0,2$	$5,63 \pm 0,8$	$166,35 \pm 7,1$
0,325	$4,92 \pm 0,1$	$7,37 \pm 0,4$	$111,00 \pm 0,4$	$7,21 \pm 0,1$	$4,54 \pm 1,4$	$197,65 \pm 4,7$
0,650	$4,42 \pm 0,2$	$7,17 \pm 0,2$	$171,43 \pm 0,9$	$6,92 \pm 0,0$	$2,83 \pm 0,7$	$210,60 \pm 33,1$

4.3.2 *Allonais inaequalis*

A Figura 4 apresenta a taxa de crescimento populacional e reprodução de *A. inaequalis* ao fim dos testes crônicos (10 dias). O eixo Y esquerdo do gráfico (Figura 4(a)) mostra a média da reprodução ao fim dos 10 dias de exposição à vinhaça de cana-de-açúcar. Nas diluições intermediárias (0,05% e 0,1%), foi observado aumento na reprodução ($72,42 \pm 2,89$ e $67,67 \pm 6,02$ organismos, $p < 0,05$, respectivamente) quando comparado ao controle ($57,08 \pm 5,65$ organismos). Tais diluições apresentaram taxas de crescimento populacional de $6,24 \pm 0,29$ e $5,77 \pm 0,60$ organismos dia^{-1} , respectivamente (Figura 4(a)). Portanto, o incremento na reprodução foi cerca de 27%

para a diluição de 0,05% e de 19% para 0,1%. Em contrapartida, na maior diluição (0,4%) a reprodução média dos organismos foi cerca de 68% inferior ($18,50 \pm 3,19$ organismos, $p < 0,05$) quando comparada à média do controle, com taxa de crescimento populacional reduzida em cerca de 82%, ($0,85 \pm 0,32$ organismos dia^{-1}).

Figura 4 - (a) Reprodução (eixo Y esquerdo) e das taxas de crescimento populacional (eixo Y direito) ao final dos testes crônicos (10 dias) com *A. inaequalis* (média \pm DP). Biomassa (b) individual de *A. inaequalis* (média \pm DP) após 10 dias de exposição a vinhaça. Asteriscos (*) indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).



Fonte: Próprio autor (2022)

Uma das características que distinguem a família Naididae, na qual *A. inaequalis* se inclui, da maioria das famílias de oligoquetas aquáticas é a alternância de gerações com reprodução sexuada e assexuada. A reprodução assexuada ocorre predominantemente onde as populações podem se auto perpetuar a partir da fragmentação de um indivíduo em dois. A reprodução sexuada ocorre principalmente quando os indivíduos são expostos a um fator estressor. Assim, diversos fatores afetam a dinâmica populacional regulando a densidade populacional dessa família de oligoquetas (ARMENDÁRIZ, 1999). Nesse sentido, o estresse causado aos *A. inaequalis* pela contaminação pela vinhaça pode ter desencadeado a redução da taxa de fragmentação e conseqüente alteração na reprodução dos organismos.

Organismos expostos por um longo período a um contaminantes, possivelmente, terão menos energia disponível para o crescimento e reprodução do que indivíduos não expostos (LIBER et al., 1996), assim como observado para as taxas reprodutivas. Destaca-se uma escassez de estudos na literatura que abordem os efeitos ecotoxicológicos da vinhaça e não foram encontrados estudos que descrevam os efeitos

desse contaminante sobre oligoquetas aquáticas. No entanto, Alves et al., (2015) descreve os efeitos tóxicos de diferentes concentrações da vinhaça de cana-de-açúcar nas oligoquetas terrestres *Eisenia andrei* (Lumbricidae) e *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae), e foram observados efeitos na reprodução de ambas as espécies em solos naturais, além da redução do crescimento e comportamento de fuga de *E. andrei*.

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) avaliados no início e fim de cada teste são apresentados na Tabela 13. Assim como discutido para os testes com a espécie *C. sancticaroli*, o aumento das concentrações implicou em uma diminuição do pH e aumento da condutividade, e ao final dos testes ambos parâmetros tenderam a aumentar. De forma contrária, não houve diminuição das concentrações de OD para a maior diluição (0,4%), assim como, grandes variações ao fim dos testes em todas diluições. Ressalta-se que a maior concentração dos testes com *A. inaequalis* é menor que a maior testada para *C. sancticaroli*. As Tabelas B4, B5 e B6 (Apêndice B), apresentam os resultados individuais de sobrevivência e parâmetros físico-químicos para cada um dos testes crônicos realizados para a espécie.

Tabela 13 - Valores médios das variáveis físico-químicas avaliadas nos testes de toxicidade crônica com *A. inaequalis*.

Concentração (%)	INICIAL			FINAL		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
0	7,37±0,2	7,63±0,4	53,10±13,9	7,36±0,1	7,14±0,2	83,23±35,1
0,025	7,07±0,3	7,52±0,3	62,93±7,8	7,41±0,1	6,92±0,1	110,80±8,9
0,05	6,68±0,4	7,47±0,2	60,37±10,9	7,36±0,1	6,81±0,2	108,30±15,8
0,1	6,06±0,8	7,39±0,2	65,27±24,3	7,23±0,1	6,78±0,1	131,30±6,2
0,2	5,84±0,2	7,37±0,2	83,17±5,2	7,33±0,2	6,57±0,3	188,07±59,6
0,4	4,82±0,3	7,34±0,2	129,27±5,7	7,26±0,1	6,27±0,2	257,53±95,5

4.4 Bioacumulação

A tabela 14 apresenta os resultados para os metais quantificados nas soluções teste e no corpo das larvas de *C. sancticaroli*. A concentração de manganês aumenta junto ao aumento das proporções de vinhaça e a quantidade corporal diminuiu quando

comparado com o controle nas larvas expostas à diluição de 0,325%. O metal Zn foi apenas detectado nas concentrações mais elevadas de vinhaça (0,163 à 0,65%). Quanto ao resíduo corporal do zinco, o metal diminuiu nas concentrações de 0,081 à 0,65% ($p < 0,05$). Desta forma, a concentração de Zn nos organismos sofreu redução de acordo com o aumento das concentrações nas soluções teste.

A concentração de cádmio estava abaixo do limite de quantificação no controle e em todas as diluições de vinhaça; no entanto, este metal foi bioacumulado pelas larvas de *C. sancticaroli* nos tratamentos de 0,325 e 0,65% ($p < 0,05$, Tabela 14). Para o metal chumbo, foi observada elevação dos valores junto com o aumento das proporções de vinhaça, não sendo quantificado no controle. O metal foi acumulado pelos organismos nos tratamentos de 0,163 à 0,65%, nos organismos do controle não foi detectada a presença do metal ($p < 0,05$). Vale ressaltar que, na diluição de 0,081%, apesar de não haver diferenças estatísticas do controle ($p > 0,05$), o metal foi detectado nas larvas. Nenhuma diferença no resíduo corporal foi observada para cobre e níquel quando comparado ao controle, e o metal cromo não foi quantificado em nenhum dos tratamentos.

Tabela 14 - Concentrações de metais nas diluições de vinhaça e o resíduo corporal nas larvas de *C. sancticaroli* (média \pm DP) após exposição de 8 dias. Asteriscos (*) e valores em negrito destacam as diferenças comparadas ao controle do resíduo corporal ($p < 0,05$).

	Concentração (%)	Mn ¹	Zn ¹	Cu ¹	Ni ¹	Cd ¹	Pb ¹	Cr ¹
Solução teste ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	< LOQ	< LOQ	2,0 \pm 0,4	1,9 \pm 0,8	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	0,041	2,8 \pm 0,0	< LOQ	4,6 \pm 0,9	< LOQ	< LOQ	2,9 \pm 3,2	< LOQ
	0,081	4,4 \pm 0,5	< LOQ	4,0 \pm 0,8	< LOQ	< LOQ	1,1 \pm 1,9	< LOQ
	0,163	24,6 \pm 0,8	91,0 \pm 3,2	47,8 \pm 2,1	< LOQ	< LOQ	6,3 \pm 3,2	2,3 \pm 0,4
	0,325	19,2 \pm 1,3	209,2 \pm 4,3	36,4 \pm 0,8	< LOQ	< LOQ	7,5 \pm 3,2	0,7 \pm 0,5
	0,65	42,8 \pm 0,7	115,2 \pm 2,8	56,4 \pm 1,3	< LOQ	< LOQ	8,7 \pm 2,8	2,1 \pm 0,0
Resíduo corporal ($\mu\text{g}\cdot\text{gPS}^{-1}$)	0	3,7 \pm 0,6	32,5 \pm 4,8	4,6 \pm 1,1	0,6 \pm 0,3	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	0,041	3,3 \pm 1,0	25,2 \pm 1,9	6,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	< LOQ	< LOQ
	0,081	4,0 \pm 1,1	18,6 \pm 4,4*	5,8 \pm 1,8	0,8 \pm 0,5	< LOQ	1,1 \pm 1,9	< LOQ
	0,163	2,9 \pm 0,7	15,8 \pm 3,2*	4,4 \pm 1,4	0,5 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2*	< LOQ
	0,325	2,4 \pm 0,5*	15,2 \pm 5,8*	3,2 \pm 0,8	0,7 \pm 0,4	0,1 \pm 0,0*	2,0 \pm 0,4*	< LOQ
	0,65	2,5 \pm 0,4	12,8 \pm 3,6*	6,6 \pm 1,9	0,9 \pm 0,4	0,2 \pm 0,0*	2,5 \pm 0,5*	< LOQ

PS = Peso Seco

¹LOQ_{Zn} = 0,004 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; LOQ_{Cd} = 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; LOQ_{Pb} = 0,007 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; LOQ_{Ni} = 0,004 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; LOQ_{Mn} = 0,004 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; LOQ_{Cu} = 0,0002 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; LOQ_{Cr} = 0,004 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A tabela 15 apresenta os resultados para os metais quantificados no resíduo corporal de *A. inaequalis* e nas diluições de vinhaça no início dos testes crônicos. O zinco não foi detectado nas soluções teste em concentrações inferiores à 0,2% e, assim como foi observado para *C. sancticaroli*, a exposição a 0,1% de vinhaça reduziu o resíduo corporal de Zn nos indivíduos. Para ambos cádmio e cromo, a bioacumulação no resíduo corporal foi observada nos organismos expostos à diluição de 0,1%. Nenhuma alteração no resíduo corporal foi observada para manganês, cobre e níquel, e o chumbo não foi quantificado nas diluições de vinhaça nem nos organismos.

Tabela 15 - Concentrações de metais nas diluições de vinhaça e nos corpos dos organismos de *A. inaequalis* (média \pm DP) após exposição de 10 dias. Asteriscos (*) e valores em negrito destacam diferenças no resíduo corporal comparado ao controle ($p < 0.05$).

	Concentração (%)	Mn	Zn	Cu	Ni	Cd	Pb	Cr
Solução teste ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CT	<LOQ	<LOQ	$2,0 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,8$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	0,025	<LOQ	<LOQ	$1,8 \pm 1,3$	$1,1 \pm 0,5$	<LOQ	<LOQ	$0,1 \pm 0,0$
	0,05	$2,0 \pm 0,4$	<LOQ	$3,0 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,8$	<LOQ	<LOQ	$0,1 \pm 0,0$
	0,1	$7,2 \pm 0,5$	<LOQ	$23,2 \pm 2,0$	$13,7 \pm 1,4$	<LOQ	<LOQ	$1,1 \pm 0,0$
	0,2	$20,2 \pm 0,5$	$504,4 \pm 4,9$	$42,2 \pm 1,0$	$4,9 \pm 0,4$	<LOQ	<LOQ	$1,3 \pm 0,4$
	0,4	$25,0 \pm 1,5$	$135,0 \pm 1,1$	$40,4 \pm 0,8$	$3,7 \pm 0,0$	<LOQ	<LOQ	$1,9 \pm 0,4$
Resíduo corporal ($\mu\text{g gPS}^{-1}$)	CT	$0,8 \pm 0,4$	$34,7 \pm 1,5$	$4,5 \pm 0,8$	$0,8 \pm 0,2$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	0,025	$1,1 \pm 1,1$	$29,9 \pm 3,5$	$3,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	0,05	$1,2 \pm 1,6$	$39,7 \pm 24,0$	$6,5 \pm 4,2$	$2,1 \pm 2,3$	$0,2 \pm 0,2$	<LOQ	<LOQ
	0,1	$0,8 \pm 0,6$	$25,9 \pm 2,5^*$	$3,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,7$	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	0,2	$0,7 \pm 0,5$	$30,1 \pm 3,8$	$4,0 \pm 0,7$	$0,7 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,0^*$	<LOQ	$0,05 \pm 0,1^*$
	0,4	$0,5 \pm 0,1$	$23,0 \pm 7,7$	$3,1 \pm 1,0$	$0,6 \pm 0,0$	<LOQ	<LOQ	<LOQ

PS = peso seco

¹LOQ_{Zn} = 0,004 $\mu\text{g.L}^{-1}$; LOQ_{Cd} = 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$; LOQ_{Pb} = 0,007 $\mu\text{g.L}^{-1}$; LOQ_{Ni} = 0,004 $\mu\text{g.L}^{-1}$; LOQ_{Mn} = 0,004 $\mu\text{g.L}^{-1}$; LOQ_{Cu} = 0,0002 $\mu\text{g.L}^{-1}$; LOQ_{Cr} = 0,004 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

O manganês é um elemento traço essencial que age em funções bioquímicas e celulares (SANTAMARIA; SULSKY, 2010). Ben-Shahar (2018) observou que Mn atua diretamente em múltiplos processos moleculares e fisiológicos, especialmente associado com o comportamento e desenvolvimento de insetos. O presente estudo demonstrou o decaimento nos níveis corporais de manganês no tratamento de 0,325% para *C. sancticaroli*, o que pode implicar em efeitos nos organismos.

Os íons de zinco estrutural são elementos essenciais permanentes ou determinantes em interações transitórias nas proteínas, os quais atuam como catalisadores e elementos estruturais em centenas de enzimas atuando como base

molecular para um grande número de funções biológicas (MARET, 2005). Foi evidenciado para *C. sancticaroli* a redução de Zn nos organismos de acordo com o aumento de suas concentrações nas soluções teste. Além disso, assim como descrito previamente, para *A. inaequalis* uma queda foi observada na concentração intermediária. Este comportamento é uma resposta inesperada, visto que é esperado o aumento nas concentrações deste metal seriam seguidos de um aumento também no resíduo corporal até uma concentração crítica de acumulação nos corpos dos organismos (RAINBOW; LUOMA, 2011), assim como foi observado por Lobo et al. (2021) para as oligoquetas aquáticas *Branchiura swerbyi* e *Tubifex tubifex*. Portanto, esta relação observada depende da disponibilidade de metais (RAINBOW; LUOMA, 2011). Assim, além do aumento na concentração de Zn nas soluções testes, este metal não deve estar biologicamente disponível para os organismos. Neste sentido, estudos futuros devem esclarecer os mecanismos associados a estas respostas. No mais, em um estudo com *Drosophila melanogaster*, foi observado que o decaimento nas concentrações de zinco podem afetar a fertilidade das fêmeas da espécie (MISSIRLIS, 2021).

De acordo com Craig et al. (1999), o metal cádmio é quimicamente próximo ao zinco, e seus íons agem nas reações bioquímicas e podem mudar a atividade de vários hormônios. Em contrapartida, baixas doses de chumbo já implicam em efeitos tóxicos a invertebrados (SHUHAIMI-O et al., 2012). A exposição da díptera *Calliphora vicina* ao cádmio e chumbo induziram à má formação nas moscas e um atraso de 18 e 24 horas, respectivamente, na média de tempo de emergência (SHULMAN; PAKHOMOV; BRYGADYRENKO, 2017). No mesmo sentido, o presente estudo observou o retardamento na metamorfose evidenciado pela diminuição no número de pupas e adultos quando *C. sancticaroli* foi exposto à maior concentração da vinhaça (0,65%), além de que os organismos bioacumularam ambos metais nessa mesma diluição.

Em um levantamento bibliográfico sobre a bioacumulação de metais pesados por macroinvertebrados aquáticos, Goodyear e McNeill (1999) observaram que os níveis de Zn, Cu, Pb e Cd em coletores-catadores, como os quironomídeos e oligoquetas são comumente encontrados em proporção direta às concentrações desses metais no sedimento e água, e isto sugere que os resíduos de metais nos organismos está fortemente ligado à contaminação do meio ambiente. Durante um levantamento de biodiversidade Chiba, Passerini e Tundisi (2011) verificaram que as áreas com as

maiores concentrações de Cu, Ni e Zn apresentam as menores riquezas de diversidade de macroinvertebrados bentônicos, tais como Chironomidae, Tubificidae, Elmidae e Ceratopogonidae. No mesmo sentido, Bian et al. (2016) observaram uma relação negativa entre metais pesados na diversidade das comunidades bentônicas em rios, e concluiu que os principais poluentes seriam Cd, Cu e Pb. Muitos metais são comumente encontrados nos fertilizantes utilizados na agricultura e nos cultivos de cana-de-açúcar (ANGELOTTI-NETTO et al., 2004). Como a vinhaça é produzida a partir da destilação da cana, este resíduo contém em sua composição esses metais, como demonstrado no presente estudo, implicando em riscos para áreas de fertirrigação.

Frente a este contexto de exposição de macroinvertebrados à contaminação ambiental por metais pesados, é importante destacar que a manutenção destes organismos é fundamental para os ecossistemas aquáticos, visto que eles compõem uma grande proporção da biodiversidade e são parte essencial na transferência de energia e nutriente para níveis tróficos mais elevados (CHAGNON et al., 2015). CROTEAU et al. (2005) e Rubio-Franchini et al. (2011) encontraram evidências que chumbo e cádmio podem ser bioacumulados por organismos aquáticos e atingir até predadores topo da cadeia alimentar, e, por isso, a contaminação por metais não fica restrita aos níveis tróficos mais baixos. Dessa forma, os autores concluem que a falta de monitoramento deste tipo de contaminação pode aumentar a vulnerabilidade de consumidores nos níveis mais altos da cadeia alimentar. Assim, a bioacumulação de metais, tal como demonstrado no presente estudo, causam riscos de biomagnificação ao longo das cadeias alimentares com efeito em cascata para todo ecossistema.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta seção destacaremos algumas conclusões importantes obtidas ao longo do presente trabalho:

- A vinhaça de cana-de-açúcar utilizada para os experimentos apresentou características físico-químicas adversas, isto é, pH acidificado, elevada carga orgânica, condutividade elétrica, nitrogênio e fósforo totais, bem como altas concentrações de metais dissolvidos, sendo características também já observadas por outros estudos.
- O contaminante apresentou alta toxicidade aos organismos, sendo a oligoqueta *A. inaequalis* mais sensível que o quironomídeo *C. sancticaroli* e os crustáceos *H. meinerti* e *S. trispinosa*
- Apesar da redução do oxigênio dissolvido da água ser um estressor importante, a mortalidade dos organismos no presente estudo não foi atribuída somente a este fator nos testes laboratoriais.
- Diluições intermediárias aceleraram o desenvolvimento e metamorfose de *C. sancticaroli*, implicando numa maior formação de pupas. Em contrapartida, a maior diluição diminuiu o crescimento larval e não ocorreu formação de pupas nesse tratamento, evidenciando um atraso no desenvolvimento larval.
- Ao final dos testes de toxicidade crônica com *A. inaequalis*, foi observado aumento na reprodução e maiores taxas de crescimento populacional nas diluições intermediárias. De forma contrária, a maior diluição diminuiu a taxa de crescimento populacional e reprodução.
- Foi observado a bioacumulação de metais pesados pelos organismos. Dessa forma, visto que os macroinvertebrados bentônicos participam da base da cadeia alimentar aquática, e em alguns casos terrestre, este cenário chama a atenção para o risco de biomagnificação ao longo das teias alimentares com efeito cascata para o ecossistema.
- Os resultados obtidos trazem novas informações acerca da toxicidade desse efluente a organismos nativos brasileiros representantes de três importantes grupos de macroinvertebrados, que podem contribuir para a avaliação dos riscos ambientais de práticas de fertirrigação.

- Mesmo confirmando os efeitos tóxicos da vinhaça aos organismos testes, outros bioensaios com metais isolados seriam interessantes para ampliação dos resultados e possível identificação de quais elementos presentes no contaminante implicam em tais resultados observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12621. **Waters - Determination of total hardness by EDTA - Na titulometric method - Method of test**. Rio de Janeiro, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15470. **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda e crônica — Método de ensaio com *Hyalella spp* (Amphipoda) em sedimentos**. Rio de Janeiro, 2013.

AFRIDI, H. I. et al. Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Toxicology and Industrial Health**, v. 22, n. 9, p. 381–393, out. 2006.

ALVES, P. R. L. et al. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of The Total Environment**, v. 526, p. 222–232, set. 2015.

ANDERSEN, J. M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. **Water research**, v. 10, n. 4, p. 329–331, 1976.

ANGELOTTI-NETTO, A. et al. Metais pesados provenientes de atividade agrícola: formas, prevenção e controle. **Bacia Hidrográfica**, p. 1–14, 2004.

APHA, A. P. H. ASSOCIATION. (ED.). **Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater**. 23. ed. [s.l.] Pharmabooks Editora, 2018.

ARMENDÁRIZ, L. C. Dinámica poblacional de *Allonais lairdi* (Oligochaeta, Naididae) en Los Talas, Provincia de Buenos Aires. **Asociación Argentina de Ecología**. n. 9, p. 20–27, 1999.

BALIAN, E. V. et al. The Freshwater Animal Diversity Assessment: an overview of the results. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 627–637, jan. 2008.

BELOWITZ, R.; LEONARD, E. M.; O'DONNELL, M. J. Effects of exposure to high concentrations of waterborne Tl on K and Tl concentrations in *Chironomus riparius*

larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 166, p. 59–64, nov. 2014.

BEN-SHAHAR, Y. The Impact of Environmental Mn Exposure on Insect Biology. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 70, 1 mar. 2018.

BIAN, B.; ZHOU, Y.; FANG, B. B. Distribution of heavy metals and benthic macroinvertebrates: Impacts from typical inflow river sediments in the Taihu Basin, China. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 348–359, out. 2016.

BOTELHO, R. G. et al. Acute toxicity of sugarcane vinasse to aquatic organisms before and after pH adjustment. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 2035–2045, dez. 2012.

BRASIL. PORTARIA Nº 2914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. 14 dez. 2011, Sec. 1, p. 39–46.

CETESB. Decisão de Diretoria nº 045/2014/E/C/I, de 20 de fevereiro de 2014. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2014, em substituição aos Valores Orientadores de 2005, e dá outras providências. 20 fev. 2014, Sec. 1, p. 53.

CETESB. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. fev. 2015.

CHAGNON, M. et al. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 119–134, jan. 2015.

CHIBA, W.; PASSERINI, M.; TUNDISI, J. Metal contamination in benthic macroinvertebrates in a sub-basin in the southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 2, p. 391–399, maio 2011.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, dez. 2013.

COELHO, M. P. M. et al. Toxicity evaluation of leached of sugarcane vinasse: Histopathology and immunostaining of cellular stress protein. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, p. 367–375, dez. 2018.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 430. 13 maio 2011.

CORAZZA, R. I. Impactos ambientais da vinhaça: controvérsias científicas e lock-in na fertirrigação? **XLIV CONGRESSO DA SOBER “Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento”**, p. 16, 2006a.

CORAZZA, R. I. Processos de busca para a solução do problema da destinação da vinhaça nos anos 1970 e 1980: o abandono da via biotecnológica. **CONGRESSO DA SOBER “Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento”**, n. XLIV, p. 17, 2006b.

CORREIA, J. E. et al. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 319–326, jan. 2017.

CRAIG, A.; HARE, L.; TESSIER, A. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. **Aquatic Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 255–262, fev. 1999.

CROTEAU, M.-N.; LUOMA, S. N.; STEWART, A. R. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 5, p. 1511–1519, set. 2005.

DE CASTRO-CATALÀ, N. et al. Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. **Science of The Total Environment**, v. 540, p. 297–306, jan. 2016.

DE HAAS, E. M. et al. Habitat selection by chironomid larvae: fast growth requires fast food. **Journal of Animal Ecology**, v. 75, n. 1, p. 148–155, jan. 2006.

DI LEO, S. et al. Regression analysis for energy demand projection: An application to TIMES-Basilicata and TIMES-Italy energy models. **Energy**, v. 196, p. 117058, abr. 2020.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management Research**, v. 29, p. 1235- 1250 (12), 12 jan. 2011.

FERREIRA, R. L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 1 jan. 2011.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xantus* Repel, 1939 (Diptera-Chironomidae). v. 16, n. 2, p. 153–161, 2004.

GAN, L. et al. Balancing of supply and demand of renewable energy power system: A review and bibliometric analysis. **Sustainable Futures**, v. 2, p. 100013, 1 jan. 2020.

GARCIA, C. F. H. et al. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 216–221, ago. 2017.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energy and environment in Brazil. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 7–20, abr. 2007.

GOODYEAR, K. L.; MCNEILL, S. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review. **The Science of the Total Environment**, v. 229, p. 1–19, 1999.

GRIPP, H. S. et al. Biochemical effects of fipronil and its metabolites on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant defense in tadpoles (*Eupemphix nattereri*: Leiuperidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 173–179, fev. 2017.

GUNKEL, G. et al. Sugar Cane Industry as a Source of Water Pollution – Case Study on the Situation in Ipojuca River, Pernambuco, Brazil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 180, n. 1, p. 261–269, 1 mar. 2007.

HAGE, D. S.; CARR, J. D. Química analítica e análise quantitativa. **1ª. Ed**, 2012.

HANSEN, H. P.; KOROLEFF, F. Determination of nutrients. **Methods of seawater analysis**, p. 159–228, 1999.

- LEPPÄNEN, M. The role of feeding behaviour in bioaccumulation of organic chemicals in benthic organisms. **Annales Zoologici Fennici**, v. 32, n. 3, p. 247–255, 1995.
- LIBER, K. et al. Effects of *Chironomus tentans* larval growth retardation on adult emergence and ovipositing success: implications for interpreting freshwater sediment bioassays. **Hydrobiologia**, v. 323, n. 3, p. 155–167, maio 1996.
- LOBO, H. et al. Bioaccumulation and chronic toxicity of arsenic and zinc in the aquatic oligochaetes *Branchiura sowerbyi* and *Tubifex tubifex* (Annelida, Clitellata). **Aquatic Toxicology**, v. 239, p. 105955, out. 2021.
- MACKERTH, F.; HERON, J.; TALLING, J. S. Water analysis: some revised methods for limnologists. **Freshwater Biol. Assoc. Sci. Pub.**, v. 36, p. 117, 1978.
- MAGALHÃES, D. DE P.; FERRÃO-FILHO, A. DA S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355–381, out. 2008.
- MARET, W. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, n. 1, p. 7–12, set. 2005.
- MARINHO, J. F. U. et al. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239–245, dez. 2014.
- MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p. 885–898, jun. 2008.
- MCBRIDE, A. C. et al. Indicators to support environmental sustainability of bioenergy systems. **Ecological Indicators**, v. 11, n. 5, p. 1277–1289, set. 2011.
- MISSIRLIS, F. Regulation and biological function of metal ions in *Drosophila*. **Current Opinion in Insect Science**, v. 47, p. 18–24, out. 2021.

MORAES, B. S. et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825–835, jan. 2014.

PARNAUDEAU, V. et al. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1553–1562, abr. 2008.

PEDRO ESCHER, J. Mutagenic Action of Sugarcane Vinasse in the Tradescantia Pallida Test System. **Journal of Ecosystem & Ecography**, v. 04, n. 02, 2014.

PÉRY, A. R. R.; MONS, R.; GARRIC, J. Modelling of the life cycle of Chironomus species using an energy-based model. **Chemosphere**, v. 59, n. 2, p. 247–253, abr. 2005.

RAINBOW, P. S.; LUOMA, S. N. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 455–465, out. 2011.

RAVINDRANATH, N. H. et al. Greenhouse Gas Implications of Land Use and Land Conversion to Biofuel Crops. p. 15, set. 2009.

RICHARDI, V. S. et al. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Environmental Pollution**, v. 242, p. 277–287, nov. 2018.

RIVA, F. et al. Long-term energy planning and demand forecast in remote areas of developing countries: Classification of case studies and insights from a modelling perspective. **Energy Strategy Reviews**, v. 20, p. 71–89, 1 abr. 2018.

ROCHA, O. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, p. 1–11, 20 abr. 2018.

RUBIO-FRANCHINI, I.; RICO-MARTÍNEZ, R. Evidence of lead biomagnification in invertebrate predators from laboratory and field experiments. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 7, p. 1831–1835, jul. 2011.

SANTA CRUZ, L. F. L. et al. Análise da viabilidade técnica, econômica e ambiental das atuais formas de aproveitamento da vinhaça: fertirrigação, concentração e biodigestão. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 29, set. 2012.

SANTAMARIA, A. B.; SULSKY, S. I. Risk assessment of an essential element: manganese. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 2–3, p. 128–155, 2010.

SANTANA, V. S.; FERNANDES MACHADO, N. R. C. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. **Catalysis Today**, v. 133–135, p. 606–610, abr. 2008.

SECCHI, S. et al. Land use change in a biofuels hotspot: The case of Iowa, USA. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 6, p. 2391–2400, jun. 2011.

SHUHAIMI-O, M. et al. Toxicity of Metals to an Aquatic Worm, *Nais elinguis* (Oligochaeta, Naididae). **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 122–132, 1 abr. 2012.

SHULMAN, M. V.; PAKHOMOV, O. Y.; BRYGADYRENKO, V. V. Effect of lead and cadmium ions upon the pupariation and morphological changes in *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae). **Folia Oecologica**, v. 44, n. 1, p. 28–37, 27 jun. 2017.

SIBLEY, P. K.; BENOIT, D. A.; ANKLEY, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: Relationship to reproduction and demographic endpoints. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 336–345, fev. 1997.

SILVA BARBALHO, M. G. D.; BORGES DE CAMPOS, A. Vulnerabilidade natural dos solos e águas do estado de goiás à contaminação por vinhaça utilizada na fertirrigação da cultura de cana-de-açúcar. **Boletim Goiano de Geografia**, v. 30, n. 1, p. 155–170, 31 ago. 2010.

SILVA, M. A. S. DA; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, fev. 2007.

SMEETS, E. et al. The sustainability of Brazilian ethanol—An assessment of the possibilities of certified production. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 8, p. 781–813, ago. 2008.

SRIVASTAVA, S.; JAIN, R. Effect of distillery-spent wash on cytomorphological behaviour of sugarcane settlings. p. 4, 2010.

US EPA. Method 3005A: Acid digestion of waters for total recoverable or dissolved metals for analysis by FLAA or ICP Spectroscopy. jul. 1992.

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticaroli* – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento. São Paulo: USP, 2012. **Dissertação** (Mestrado em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, , 2012.

WENTSEL, R. et al. Avoidance response of Midge Larvae (*Chironomus Tentans*) to sediments containing heavy metals. **Hydrobiologia**, v. 55, n. 2, p. 171–175, ago. 1977.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks p. **Biomass and Bioenergy**, p. 40, 2000.

APÊNDICE A

Resultados Individuais dos Testes Agudos com *C. Sancticaroli*, *A. inaequalis*, *S. trispinosa* e *H. meinerti*

Tabela A1 - Resultado do teste nº 1 para o organismo-teste *C. sancticaroli* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	OD (mg/L)
Controle	7,28	393,00	7,08	5	6	5	6	-	-	-
0,4	4,99	124,80	7,05	4	4	4	3	-	-	-
0,6	4,64	162,60	7,04	2	5	5	4	-	-	-
0,8	4,42	198,60	7,03	0	0	1	0	-	-	-
1,0	4,28	239,00	6,97	0	0	0	0	-	-	-
1,2	4,18	270,00	6,94	0	0	0	0	-	-	-
		CE₅₀ = 0,672 %		CE₂₀ = 0,617 %		CE₁₀ = 0,587 %				

Tabela A2 - Resultado do teste nº 2 para o organismo-teste *C. sancticaroli* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,08	55,90	7,27	6	6	6	6	7,08	74,50	6,70
0,4	4,46	128,90	7,21	6	5	6	6	6,84	151,80	5,54
0,6	4,11	164,10	7,16	6	5	5	5	6,62	169,30	3,87
0,8	3,96	202,00	7,15	3	6	3	1	6,48	206,00	1,50
1,0	3,88	241,00	7,12	0	0	0	0	6,13	245,00	4,82
1,2	3,82	173,00	7,08	0	0	0	0	6,02	188,70	4,57
		CE₅₀ = 0,811 %		CE₂₀ = 0,757 %		CE₁₀ = 0,728 %				

Tabela A3 - Resultado do teste nº 3 para o organismo-teste *C. sancticaroli* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm²)	OD (mg/L)
Controle	7,26	52,30	7,63	6	6	6	6	7,12	202,00	6,16
0,4	4,77	136,50	7,60	6	6	6	6	6,96	163,40	5,50
0,6	4,47	173,60	7,54	3	6	6	6	6,67	191,70	2,87
0,8	7,43	210,00	7,52	3	0	1	1	6,60	196,00	1,84
1,0	4,27	244,00	7,52	0	0	0	0	5,70	250,00	2,40
1,2	4,24	270,00	7,44	0	0	0	0	4,85	-	4,56
CE₅₀ = 0,691 %				CE₂₀ = 0,582 %		CE₁₀ = 0,530%				

Tabela A4 - Resultado do teste nº 1 para o organismo-teste *A. inaequalis* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,02	49,90	7,44	6	6	6	6	7,28	114,90	6,80
0,125	5,19	103,50	7,46	6	5	4	6	7,40	128,50	6,90
0,25	4,92	113,50	7,36	6	6	6	3	7,22	127,30	6,67
0,5	4,63	139,60	7,33	3	0	1	3	7,04	138,30	6,41
1	4,34	226,00	7,38	0	0	0	0	5,71	256,00	5,50
2	4,14	341,00	7,20	0	0	0	0	4,15	367,00	5,33
			CE₅₀ = 0,424 %	CE₂₀ = 0,319 %		CE₁₀ = 0,270 %				

Tabela A5 - Resultado do teste preliminar nº 2 para o organismo-teste *A. inaequalis* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	6,85	47,50	6,90	6	6	6	6	7,24	60,10	7,07
0,2	5,54	84,50	6,78	6	6	6	6	7,30	111,90	6,80
0,4	4,73	122,40	6,74	5	3	6	4	7,27	140,10	6,53
0,45	4,60	132,40	6,80	5	6	4	5	7,18	137,90	6,01
0,5	4,57	139,60	6,80	1	2	4	4	7,25	144,60	5,95
0,8	4,32	192,50	6,70	0	0	0	0	7,03	191,60	5,86
		CE₅₀ = 0,543 %		CE₂₀ = 0,429 %		CE₁₀ = 0,391 %				

Tabela A6 - Resultado do teste preliminar nº 3 para o organismo-teste *A. inaequalis* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,08	55,90	7,27	6	6	6	5	7,26	74,40	7,12
0,2	4,95	93,10	7,13	6	6	6	6	7,01	96,00	6,33
0,4	4,27	125,80	7,20	5	5	6	6	6,69	140,60	5,05
0,45	4,03	134,80	7,16	1	4	2	6	6,62	152,30	4,30
0,5	4,11	144,60	7,16	0	0	0	0	6,53	163,60	3,70
0,8	3,88	192,50	6,70	0	0	0	0	6,33	214,00	3,82
		CE₅₀ = 0,452 %		CE₂₀ = 0,437 %		CE₁₀ = 0,429 %				

Tabela A7 - Resultado do teste preliminar nº 1 para o organismo-teste *S. trispinosa* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	6,94	157,50	7,10	6	6	6	6	7,44	498,00	7,08
1	4,87	308,00	7,10	6	5	5	6	6,48	332,00	1,01
1,2	4,58	325,00	6,87	3	2	4	4	5,05	388,00	1,13
1,4	4,47	380,00	6,81	2	2	2	2	4,87	412,00	0,83
1,6	4,39	421,00	6,75	0	0	0	0	4,64	470,00	6,67
1,8	4,32	450,00	6,77	0	0	0	0	4,51	502,00	6,93
		CE₅₀ = 1,228 %		CE₂₀ = 1,057 %		CE₁₀ = 0,969 %				

Tabela A8 - Resultado do teste preliminar nº 2 para o organismo-teste *S. trispinosa* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,04	159,70	7,12	6	6	6	6	7,65	176,40	6,83
1	4,69	135,20	7,04	6	6	6	6	6,17	333,00	1,01
1,2	4,21	276,00	7,02	5	4	4	6	4,94	394,00	2,84
1,4	4,43	375,00	7,00	4	2	2	4	4,82	423,00	4,56
1,6	4,26	426,00	7,02	3	3	3	0	4,73	476,00	6,61
1,8	4,23	452,00	7,01	1	0	1	1	4,69	497,00	6,50
		CE₅₀ = 1,424 %		CE₂₀ = 1,178 %		CE₁₀ = 1,054 %				

Tabela A9 - Resultado do teste preliminar nº 3 para o organismo-teste *S. trispinosa* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,00	154,10	7,13	6	6	6	6	7,43	258,00	6,73
1	6,89	-	-	5	4	6	3	5,53	319,00	1,02
1,2	4,56	324,00	-	3	3	3	4	4,85	361,00	4,05
1,4	4,43	225,00	-	2	0	3	0	4,62	409,00	5,91
1,6	4,35	307,00	-	0	0	0	1	4,57	432,00	5,42
1,8	4,33	-	-	0	0	0	0	4,43	477,00	6,68
		CE₅₀ = 1,202 %		CE₂₀ = 0,924 %		CE₁₀ = 1,018 %				

Tabela A10 - Resultado do teste preliminar nº 1 para o organismo-teste *H. meinerti* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,48	159,50	7,26	10	9	9	9	7,24	170,00	6,45
0,6	5,75	261,00	7,14	10	9	9	8	6,37	214,00	3,93
0,8	5,33	296,00	7,04	8	7	2	1	6,88	287,00	2,29
1,0	5,14	326,00	7,08	3	1	0	4	6,77	313,00	1,47
1,2	4,96	367,00	7,00	0	0	0	0	6,78	314,00	2,34
1,4	4,87	397,00	7,05	0	0	0	0	6,47	364,00	2,56
CE₅₀ = 0,804 %				CE₂₀ = 0,674 %		CE₁₀ = 0,608 %				

Tabela A11 - Resultado do teste preliminar nº 2 para o organismo-teste *H. meinerti* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,15	160,20	7,26	10	10	10	10	7,16	161,30	6,65
0,6	4,31	256,00	7,20	9	8	7	7	6,92	261,00	3,53
0,8	4,33	233,00	7,15	3	1	3	3	6,60	291,00	1,03
1,0	4,17	325,00	7,17	0	1	0	2	6,31	317,00	1,43
1,2	4,05	359,00	7,13	1	0	0	0	6,01	348,00	2,02
1,4	3,99	384,00	7,16	0	0	0	0	6,04	370,00	2,45
		CE₅₀ = 0,700 %		CE₂₀ = 0,583 %		CE₁₀ = 0,525 %				

Tabela A12 - Resultado do teste preliminar nº 3 para o organismo-teste *H. meinerti* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis				Variáveis limnológicas – Finais		
	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)	1	2	3	4	pH	Condutividade (µS/cm ²)	OD (mg/L)
Controle	7,14	69,20	8,06	10	10	10	10	7,30	168,00	6,78
0,6	5,24	234,00	7,21	10	10	10	10	6,98	250,00	4,41
0,8	4,95	274,00	7,24	4	8	8	2	7,01	273,00	3,73
1,0	4,75	312,00	7,30	0	4	0	8	6,81	300,00	3,42
1,2	4,63	341,00	7,23	0	0	0	0	6,49	323,00	3,09
1,4	4,52	370,00	7,40	0	0	0	0	6,08	362,00	2,59
		CE₅₀ = 0,838 %		CE₂₀ = 0,694 %		CE₁₀ = 0,622 %				

APÊNDICE B

Resultados Individuais dos Testes Crônicos com *C. Sancticaroli* e *A. inaequalis*

Tabela B1 - Resultado sobrevivência do teste crônico nº 1 para o organismo-teste *C. sancticaroli* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis								Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	1	2	3	4	5	6	7	8	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
Controle	7,15	7,57	61,60	10	11	10	10	9	10	10	10	7,27	6,32	97,70
0,041	7,14	7,53	58,80	9	10	10	11	10	8	9	9	7,29	6,40	127,10
0,081	6,80	7,40	62,30	9	10	10	9	8	10	10	13	7,32	6,32	143,50
0,162	6,05	4,39	78,90	11	10	10	8	9	10	10	10	7,34	6,18	171,40
0,325	4,89	7,83	110,90	10	11	9	10	12	10	10	10	7,30	5,53	194,30
0,65	4,38	7,33	172,20	8	10	10	10	9	9	9	8	6,92	3,32	234,00

Tabela B2: Resultado sobrevivência do teste crônico nº 2 para o organismo-teste *C. sancticaroli* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis								Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade (μ S/cm ²)	1	2	3	4	5	6	7	8	pH	OD (mg/L)	Condutividade (μ S/cm ²)
Controle	7,08	7,51	39,20	9	10	8	9	8	9	9	6	-	-	-
0,041	6,89	7,42	61,50	11	9	9	10	6	4	5	9	-	-	-
0,081	6,66	7,36	64,90	8	9	10	9	6	10	0	0	-	-	-
0,162	5,72	7,24	83,90	5	7	7	10	7	8	9	7	-	-	-
0,325	4,83	7,22	110,70	8	7	7	9	5	4	7	9	-	-	-
0,65	4,29	7,18	171,60	8	10	9	6	9	8	6	5	-	-	-

Tabela B3: Resultado sobrevivência do teste crônico nº 3 para o organismo-teste *C. sancticaroli* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis								Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade (μ S/cm ²)	1	2	3	4	5	6	7	8	pH	OD (mg/L)	Condutividade (μ S/cm ²)
Controle	7,08	7,37	56,00	8	9	10	9	9	9	9	8	7,01	5,65	82,70
0,041	6,96	7,22	60,80	7	6	9	10	8	8	7	8	7,05	4,98	127,00
0,081	6,81	7,14	64,20	7	7	6	9	9	9	6	10	7,18	4,39	134,00
0,162	6,13	7,09	78,50	10	7	8	6	8	9	8	7	7,19	5,07	161,30
0,325	5,03	7,05	111,40	10	11	10	9	9	8	10	10	7,11	3,55	201,00
0,65	4,60	7,00	170,50	9	9	7	7	6	9	6	10	6,91	2,34	187,20

Tabela B4: Resultado do teste crônico nº 1 para o organismo-teste *A. inaequalis* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis								Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	1	2	3	4	5	6	7	8	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
Controle	7,14	8,06	69,20	77	56	62	63	66	63	58	63	-	-	-
0,025	6,80	7,76	71,50	75	66	48	60	70	66	67	83	-	-	-
0,05	6,63	7,66	81,20	72	69	73	77	79	79	75	77	-	-	-
0,1	6,38	7,60	93,20	90	76	73	73	79	50	70	85	-	-	-
0,2	6,05	7,50	77,30	44	63	68	71	60	40	51	52	-	-	-
0,4	5,17	7,45	135,50	11	19	9	19	42	20	28	25	-	-	-

Tabela B5: Resultado do teste crônico nº 2 para o organismo-teste *A. inaequalis* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis								Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	1	2	3	4	5	6	7	8	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
Controle	7,35	7,25	45,00	52	51	52	55	57	54	54	48	7,46	7,27	108,50
0,025	7,09	7,25	61,00	64	57	60	66	40	64	63	70	7,49	6,96	117,10
0,05	6,28	7,23	39,40	78	74	49	84	67	71	69	63	7,41	6,92	97,10
0,1	5,11	7,16	48,80	63	65	73	37	66	77	76	66	7,14	6,83	126,90
0,2	5,68	7,19	87,10	43	32	41	55	44	39	58	51	7,44	6,79	162,10
0,4	4,61	7,12	128,10	10	26	12	16	26	10	10	12	7,33	6,42	188,80

Tabela B6: Resultado do teste crônico nº 3 para o organismo-teste *A. inaequalis* exposto a vinhaça de cana-de-açúcar.

Concentração (%)	Variáveis limnológicas - Iniciais			Nº de organismos vivos/móveis								Variáveis limnológicas - Finais		
	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	1	2	3	4	5	6	7	8	pH	OD (mg/L)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
Controle	7,62	7,58	45,00	51	54	49	60	64	57	51	53	7,26	7,00	57,90
0,025	7,33	7,54	56,30	69	67	70	69	70	53	62	65	7,32	6,87	104,50
0,05	7,12	7,51	60,50	79	79	63	70	76	71	69	75	7,30	6,70	119,50
0,1	6,69	7,42	53,80	61	63	50	70	54	75	60	72	7,31	6,72	135,70
0,2	5,78	7,42	85,10	52	50	60	48	48	62	54	55	7,22	6,34	155,00
0,4	4,68	7,45	124,20	10	34	19	10	34	15	13	14	7,19	6,11	191,10

