

**Toxicidade e genotoxicidade de água intersticial proveniente  
de sedimento na Unidade de Gerenciamento de Recursos  
Hídricos do Alto Tietê (UGRHI 6)**

**Relatório final**



**Empreendimento 2011-AT-584**

**Toxicidade e genotoxicidade de água intersticial proveniente de sedimento na  
Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Alto Tietê (UGRHI 6)**

Tomador: CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Contrato nº 138/2012

Coordenador técnico: Rúbia Kuno

**Relatório final**

São Paulo

Julho de 2017



Diretor Presidente

Carlos Roberto dos Santos

Diretor de Gestão Corporativa

Carlos Roberto dos Santos

Diretor de Controle de Poluição Ambiental

Geraldo do Amaral Filho

Diretora de Avaliação de Impacto Ambiental

Ana Cristina Pasini da Costa

Diretor de Engenharia e Qualidade Ambiental

Eduardo Luis Serpa

Gerente do Departamento de Análises Ambientais

Maria Inês Zanoli Sato



Equipe técnica responsável pela elaboração do relatório

Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental

Rúbia Kuno

Setor de Análises Toxicológicas

Walace Anderson A. Soares

Setor de Toxicologia e Genotoxicidade

Deborah Arnsdorff Roubicek

Celia Maria Rech

Celso Fumio Suzuki

Cynthia Muniz Soares

Flávia Mazzini Bertoni

Simone Harue Kimura Takeda

Setor de Química Inorgânica

Francisco Jorge Ferreira

Juliana de Freitas

Uyara Cayenne Silva

Setor de Química Orgânica

Neusa Akemi Niwa

José Reinaldo Leite Barros

Carlos Alberto Marques de Souza

## SUMÁRIO

1	TÍTULO .....	4
2	INTRODUÇÃO .....	4
3	OBJETIVO .....	6
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	6
4.1	Pontos de coleta .....	6
4.2	Coleta das amostras de sedimento e obtenção da água intersticial .....	8
4.3	Teste de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> .....	10
4.3.1	Princípio do teste .....	10
4.3.2	Testes de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> na água intersticial .....	11
4.4	Ensaio de genotoxicidade .....	13
4.4.1	<i>Salmonella</i> /microsoma (Teste de Ames) .....	13
4.4.2	<i>Salmonella</i> /microsoma (Teste de Ames) – princípios do método .....	14
4.4.3	<i>Salmonella</i> /microsoma – variações do método .....	15
4.4.3.1	Ensaio em microssuspensão – teste de Kado .....	15
4.4.3.2	Método Direto .....	16
4.4.3.3	Método segundo a Norma ISO 16240:2005 .....	17
4.4.3.4	Teste de Ames – Kit MPF™ .....	17
4.5	Análises químicas .....	19
4.6	Análises estatísticas .....	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
5.1	Testes de toxicidade aguda com <i>Vibrio fischeri</i> .....	21
5.2	Ensaio de genotoxicidade .....	24
5.3	Análises químicas .....	24
6	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	28
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
	ANEXO I – Equipamentos adquiridos no Projeto .....	32

## PROJETO FEHIDRO

Código do empreendimento: **2011-AT-584**

Número do contrato: 138/2012

Tomador: CETESB

### 1 TÍTULO

Toxicidade e genotoxicidade de água intersticial proveniente de sedimento na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Alto Tietê (UGRHI 6)

### 2 INTRODUÇÃO

A extensa ocupação urbana gera riscos extremamente altos de poluição e contaminação de todos os mananciais localizados na Bacia do Alto Tietê. Segundo o Relatório de Qualidade das Águas Superficiais da Cetesb de 2009, as UGRHIs 5 – Piracicaba/Capivari/Jundiá e 6 – Alto Tietê foram as únicas que apresentaram corpos d'água com Índice de Qualidade das Águas (IQA) na categoria *Péssima*, com 4% e 13%, respectivamente. Além disso, apresentaram, juntamente com a UGRHI 15 – Turvo/Grande, elevadas porcentagens de corpos d'água na categoria *Ruim*. Ressalta-se que as UGRHIs 5 e 6 são intensamente industrializadas e possuem elevada densidade populacional; a área urbanizada na UGRHI 6 ocupa 37% da área da bacia. No mesmo relatório é apontado que o ponto BILL02100 do Reservatório Billings, localizado no corpo central em frente ao braço do Bororé, obteve péssima qualidade química do sedimento, acompanhado de toxicidade com *Vibrio fischeri* e avaliação ruim da comunidade bentônica. Destacam-se neste reservatório as concentrações de Cd, Pb, Cr, Ni e DDE, acima de PEL (limites em que há alta probabilidade de ocorrência de efeitos adversos à biota aquática) e Cu, Hg e PCBs acima de TEL (limites em que há baixa probabilidade de ocorrência de efeitos adversos à biota aquática). Com base na distribuição da toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* nas UGRHIs do Estado de São Paulo, observa-se predominância das amostras classificadas como muito tóxicas nas UGRHIs industriais, vocação da UGRHI 6, e de amostras não tóxicas nas demais UGRHIs (Agropecuária, Conservação e em Industrialização). Este comportamento é condizente com as determinações químicas realizadas e com a situação de degradação dessas UGRHIs.

Apesar dos dados históricos mostrarem uma melhora na qualidade das águas da UGRHI 6, ainda é preocupante seu estado de contaminação tanto para abastecimento quanto para a biota. O

sedimento atua como um reservatório da contaminação atual e pretérita, onde os contaminantes podem permanecer por longo tempo e serem liberados eventualmente, retornando à coluna d'água, isto é, o sedimento pode ser também uma fonte contínua de poluição das águas. Para complementar o diagnóstico da coluna d'água, a CETESB monitora o sedimento desde 2002, e conta com 32 pontos de amostragem no Estado de São Paulo, com frequência anual.

O sedimento tem sido cada vez mais utilizado em estudos de avaliação da qualidade de ecossistemas aquáticos por retratar condições históricas da influência de atividades antrópicas sobre esses ambientes, nem sempre detectáveis pelo uso de variáveis da água. A presença de contaminantes no sedimento potencializa a transferência destes para a coluna d'água. A mobilização de contaminantes da fase sólida para a fase dissolvida pode ocorrer por meio do revolvimento do sedimento, por exemplo, em virtude do aumento da vazão e das chuvas ou por atividades que interfiram no leito do rio como dragagens (seja de desassoreamento ou aprofundamento da calha), passagem de dutos, construção de pilares de sustentação de pontes, dentre outras atividades (CETESB, 2015).

A água intersticial está contida entre os poros do sedimento e há uma dinâmica de transferência de substâncias químicas entre esses meios. Essa troca é feita por difusão, sendo esta uma das vias de bioacumulação na cadeia alimentar. A análise da água intersticial contribui para o melhor entendimento das variações hidroquímicas na água subsuperficial. Esses estudos são de grande interesse para determinar a biodisponibilidade de contaminantes. A água intersticial pode ser extraída dos sedimentos por centrifugação (MATOSO et al., 2013).

A avaliação da toxicidade da água intersticial, bem como sua análise química, permite uma melhor caracterização do sedimento fornecendo informações sobre o real estado de contaminação dos mananciais. Essas informações poderão direcionar as ações de controle e remediação da contaminação dos mananciais no gerenciamento dos recursos hídricos.

A transferência de poluentes orgânicos e inorgânicos para os organismos pode originar-se da água intersticial. Pelo fato desses poluentes estarem em equilíbrio entre as fases aquosa e adsorvida nas partículas do sedimento, a água intersticial é uma importante ferramenta para avaliar a toxicidade para estabelecer níveis de contaminação de sedimentos. Neste projeto, foram empregados o teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox) e teste de genotoxicidade para avaliar a toxicidade da água intersticial, correlacionando-a com análises químicas orgânicas e inorgânicas.

### **3 OBJETIVO**

Validar métodos para extração, caracterização química, testes de toxicidade e genotoxicidade de água intersticial proveniente de sedimentos, e caracterizar a água intersticial de sedimentos da UGRHI 6 quanto à toxicidade e genotoxicidade.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Pontos de coleta**

A área de estudo compreendeu os pontos de coleta da UGRH 6 (Alto Tietê) que fazem parte da rede de monitoramento de sedimentos da CETESB e que ainda não possuem um histórico com relação à matriz água intersticial (Figura 1). Os pontos são localizados nos seguintes corpos hídricos: Reservatório Billings (BILL02100), Reservatório Guarapiranga (GUAR00900), Reservatório Rio Grande (RGDE02900), Reservatório de Pirapora (TIPI04850), Rio Tietê (TIET04160) e Rio Pinheiros (PINH04500). No Quadro 1, encontra-se a descrição dos pontos de amostragem.



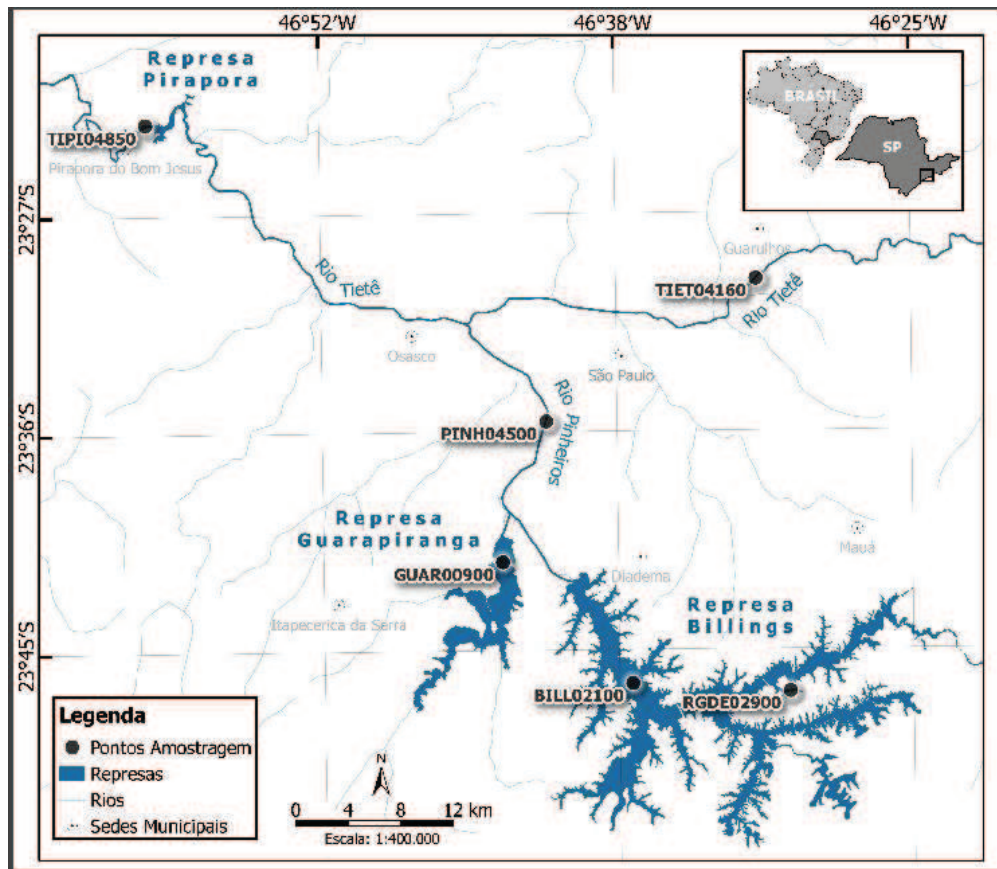


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta de sedimento do projeto na UGRHI 6

Quadro 1 – Descrição dos pontos de coleta – UGHRI 6. 2012-2013

Ponto	Descrição	Long. W	Lat. S
BILL2100	No meio do corpo central do Reservatório Billings, na direção do braço do Bororé.	46 38 49	23 47 11
GUAR00900	No corpo central do Reservatório do Guarapiranga, a 2 km da barragem. Jusante dos braços dos rios M'Boi – Mirim, Parelheiros, Embu-Guaçu e Itupu.	46 43 35	23 41 22
RGDE02900	No corpo central do Reservatório do Rio Grande, a 2 km da barragem, em frente ao clube do Banespa.	46 30 42	23 46 40
TIP104850	Reservatório de Pirapora, aproximadamente 0,5 km da comporta do Reservatório.	46 59 21	23 23 13
TIET04160*	Rio Tietê, a 800 metros a montante da Barragem da Penha, embaixo da rede elétrica.	46 32 08	23 29 45
PINH4500	Rio Pinheiros, embaixo da Ponte Ari Torres (Avenida dos Bandeirantes).	46 41 34	23 35 35

\* não foi realizada coleta em 2013 devido a problemas técnicos

#### 4.2 Coleta das amostras de sedimento e obtenção da água intersticial

Foram coletadas 11 amostras de sedimento, no período de 2012 e 2013, sendo no primeiro ano em maio, junho e outubro; e em 2013 nos meses junho, agosto e outubro. A Rede de Sedimentos da CETESB tem amostragem anual, isto é, cada ponto tem apenas uma amostragem no ano. No Quadro 2, estão as informações relativas às amostras coletadas para o projeto, como data de coleta, número de cadastro da amostra (água intersticial e sedimento) no sistema de qualidade laboratorial da CETESB e o ponto de amostragem. As coletas das amostras de sedimento foram realizadas conforme o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011).

As amostras de sedimento foram coletadas na margem deposicional dos rios e na zona profunda dos reservatórios com pegador tipo van Veen. Foram tomadas amostras em triplicatas, compostas a partir de volumes iguais de cada réplica, em campo. Nos reservatórios foram considerados apenas os 6 cm superiores da coluna de sedimento.

No laboratório do Setor de Análises Toxicológicas da CETESB, as amostras de sedimento foram homogeneizadas, quando foram retirados galhos, folhas ou outro material estranho à matriz. Após a homogeneização, a amostra de sedimento foi centrifugada a, no mínimo, 2000

x g durante 30 minutos. Caso fosse necessário, repetia-se a centrifugação. Após a centrifugação, era retirada a fase líquida (água intersticial) e transferida para outro frasco.

A água intersticial, então, era distribuída aos laboratórios para procederem as análises químicas, de toxicidade e de genotoxicidade.

Quadro 2 – Número da amostra coletada para o Projeto, data da coleta, cadastro da amostra no sistema de qualidade laboratorial da CETESB e ponto de amostragem

<b>Número da amostra</b>	<b>Data da coleta do sedimento</b>	<b>Cadastro da amostra de sedimento</b>	<b>Cadastro da amostra de água intersticial</b>	<b>Ponto de amostragem</b>
1	28/05/2012	1220467	1220681	GUAR00900
2	30/05/2012	1220470	1220682	RGDE02900
3	28/06/2012	1220705	1220397	TIPI04850
4	18/10/2012	1231422	1231899	BILL02100
5	29/10/2012	1231828	1231900	TIET04160
6	30/10/2012	1231824	1231901	PINH04500
7	17/06/2013	1321307	1324667	GUAR00900
8	17/06/2013	1321308	1324668	BILL02100
9	18/06/2013	1321150	1324669	TIPI04850
10	08/08/2013	1325391	1324670	PINH04500
11	23/10/2013	1329545	1324671	RGDE02900

### 4.3 Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

#### 4.3.1 Princípio do teste

O *Vibrio fischeri* é uma bactéria marinha, Gram negativa e anaeróbia facultativa que emite luz naturalmente, sob condições ambientais favoráveis e concentrações de oxigênio superiores a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Este teste é baseado na medida da luminescência produzida por uma cultura de aproximadamente um milhão de células de *Vibrio fischeri*. A luminescência está diretamente associada ao metabolismo bacteriano. Durante seu metabolismo, a bactéria utiliza parte da energia produzida no ciclo de Krebs para emitir luz verde azulada, de comprimento de onda de 490 nm. Quando entra em contato com substâncias tóxicas, capazes de interferir na produção de energia, as bactérias diminuem ou cessam a emissão de luz. Quanto mais tóxica a amostra, menor a luminescência. Esta diminuição na emissão de luz das bactérias é medida em luminômetro de precisão.

Várias substâncias são tóxicas para o *V. fischeri*, dentre elas metais, fenóis, benzeno e seus derivados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, praguicidas, antibióticos e compostos clorados. Apesar do teste utilizar um organismo marinho, apresenta resultados similares a outros testes tanto para a avaliação da toxicidade de águas doces como de sedimentos. As grandes vantagens são a sensibilidade, simplicidade e rapidez do teste, assim como a necessidade de pequena quantidade de amostra. Por ser uma bactéria marinha, a necessidade de se ajustar a osmolaridade das amostras pode ser citada como uma desvantagem do teste, pois a adição de cloreto de sódio ou sacarose para este fim pode causar variações na toxicidade de alguns compostos e dificultar as comparações dos resultados obtidos com outros organismos de água doce. Além disso, existem controvérsias e limitações sobre o uso de ensaios com pouca relevância ecológica, como é o caso dos testes com bactérias, por não retratar os impactos causados diretamente à biota, porém o teste de toxicidade com *V. fischeri* tem sido empregado com sucesso como ferramenta de controle de contaminação ambiental em diferentes partes do mundo.

A avaliação da toxicidade de sedimentos com *V. fischeri* pode ser realizada utilizando várias formas de preparo da amostra, como elutriatos, lixiviados, extratos orgânicos, testes na fase sólida, ou a água intersticial da amostra. No entanto, existem várias limitações e vantagens associadas ao uso de cada uma dessas formas. Testes com água intersticial têm a vantagem de avaliar a toxicidade desta fração do sedimento que, na maioria das vezes, está em contato direto com os organismos

aquáticos, porém avalia somente os contaminantes que são solúveis em água, além de não levar em consideração os possíveis efeitos aos organismos que se alimentam do sedimento.

#### 4.3.2 Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* na água intersticial

O teste foi realizado seguindo a norma ABNT NBR 15411-3 – Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) - Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas – 2012.

O sistema de teste é baseado na medição da luminescência emitida pelas bactérias *Vibrio fischeri* antes e após exposição a uma amostra por um período de 5, 15 ou 30 minutos. A diferença de intensidade da luz emitida pelas bactérias quando em contato com a amostra é comparada com a de um controle, onde a amostra é substituída pelo diluente. Quando entram em contato com substâncias tóxicas presentes na amostra, capazes de interferir na produção de energia, as bactérias diminuem ou cessam a emissão de luz. O sistema de teste foi executado em aparelhos específicos, compostos por um luminômetro de precisão com unidade integrada de medição e comando e um termobloco com temperatura controlada, de  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ . O teste foi preparado e executado no termobloco, utilizando cubetas de vidro borossilicato apropriadas para o teste. Todos os procedimentos de execução do ensaio, tais como a sequência de colocação da amostra, tempo de incubação, leituras e cálculo dos resultados são gerenciados por software específico. A Figura 2 mostra um modelo de sistema analisador de toxicidade com *Vibrio fischeri* e uma cubeta de vidro utilizada nos testes.



Figura 2 – Sistema analisador de toxicidade e cubeta de vidro

Para a realização do teste, culturas liofilizadas contendo aproximadamente  $10^8$  bactérias, mantidas entre  $-20$  e  $-25^{\circ}\text{C}$ , foram reconstituídas com solução apropriada. Após a ressuspensão, alíquotas contendo aproximadamente  $10^6$  células foram distribuídas nas cubetas e realizada a primeira medida da emissão de luz da bactéria. Após esta etapa, foram adicionadas às cubetas contendo a suspensão bacteriana, a amostra a ser testada ou diluições desta, e o diluente, utilizado como controle negativo. Após intervalos de tempo de 5 e 15 minutos de contato, foram feitas novas medidas da quantidade de luz emitida pela bactéria (Figura 3).

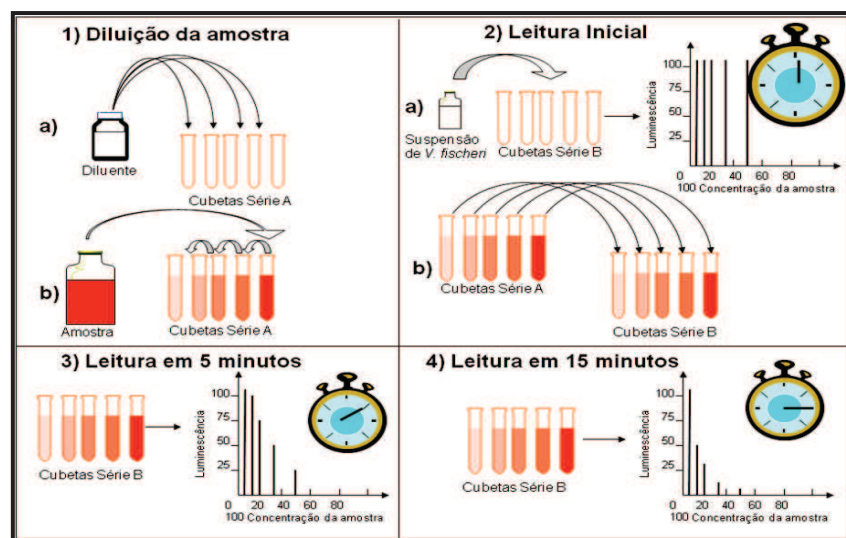


Figura 3 – Esquema do teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Considerou-se uma amostra positiva quando a maior concentração testada da amostra apresentou porcentagem de inibição da emissão de luz de 20%. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da luminescência, CE20 (concentração da amostra testada que causa 20% de diminuição na emissão de luz), após 5 ou 15 minutos de exposição à temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ . Como validação do teste, foi realizado um controle positivo, ou seja, foi testada uma substância de toxicidade conhecida para a bactéria. Como controle positivo foram utilizadas as soluções de sulfato de zinco heptaidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ).

#### 4.4 Ensaio de genotoxicidade

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função e quando essas alterações se fixam de forma capaz de serem transmitidas, denominam-se mutações. As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto, fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto nos indivíduos como nos seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e local onde ocorrem e podem também, alterar o equilíbrio dos ecossistemas. Nas populações, podem aumentar a incidência de câncer, doenças hereditárias e do coração, bem como aumentar a virulência de patógenos.

Os compostos mutagênicos encontram-se distribuídos nos ecossistemas (água, solo, ar), são transferidos e acumulados através das cadeias tróficas, podendo causar danos genéticos ou efeitos genotóxicos nos indivíduos ou populações expostas.

##### 4.4.1 *Salmonella*/microssoma (Teste de Ames)

Historicamente, a descoberta feita por Auerbach, em 1941, de que o gás mostarda provocava mutações em *Drosophila melanogaster*, foi a primeira demonstração de mutagênese química induzida. Apesar da implicação desta descoberta na área da saúde humana, a maioria dos geneticistas entre 1940 e 1950 estavam interessados em usar os mutágenos químicos como ferramenta para entender melhor os processos genéticos e celulares.

A preocupação com a exposição humana aos mutágenos químicos somente se iniciou nos anos 60, devido ao avanço industrial pós-guerra, que fez com que houvesse a necessidade de se controlar a enorme quantidade de produtos lançados no ambiente. Inicialmente, foi dada maior atenção ao efeito das mutações nas células germinativas, capazes de causar doenças hereditárias. Nessa época, vários ensaios de mutagenicidade *in vivo* foram desenvolvidos. Porém, apesar da teoria da mutação somática do câncer ter sido formulada muitos anos antes por Boveri em 1914, não havia experimentos que associassem definitivamente mutágenos químicos ao processo de carcinogênese.

Essa teoria foi retomada quando o Dr. Bruce Ames e colaboradores da Universidade de Berkeley, Califórnia (AMES *et al*, 1973, 1975) desenvolveram um teste *in vitro*, de curta duração,

que combinado a um sistema de metabolização *in vitro* (fração S9) desenvolvido por Malling em 1971, mostrou uma alta correlação entre vários mutágenos e carcinógenos conhecidos. Este ensaio é conhecido hoje como Teste de Ames e é considerado um marco na história da Genética Toxicológica.

#### 4.4.2 *Salmonella*/microsoma (Teste de Ames) - princípios do método

O teste de Ames, ou ensaio *Salmonella*/microsoma, segue sendo utilizado rotineiramente e é o único validado em larga escala por diversos laboratórios no mundo todo. O teste emprega linhagens de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (*his*<sup>-</sup>), especialmente construídas para detectar mutações do tipo deslocamento de quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a síntese deste aminoácido.

A frequência de mutação reversa é facilmente medida pela contagem do número de colônias que crescem em meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. O teste é feito com e sem ativação metabólica, considerando-se que nem todos os compostos são mutagênicos *per se*, alguns necessitam ser biotransformados e os metabólitos é que têm atividade genotóxica.

As diversas linhagens de *S. Typhimurium* que foram desenvolvidas pelo Dr. Bruce Ames, possuem mutações para histidina em diferentes genes do operon responsável pela biossíntese de histidina e apresentam também outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de diversos tipos de mutágenos, tais como: mutação *rfa*, deleção *uvrB* e a presença do plasmídeo pKM101. As linhagens mais comumente utilizadas para avaliações da mutagenicidade de amostras ambientais são a TA98 e TA100, pois elas são capazes de detectar cerca de 95% dos mutágenos presentes nestes ambientes.

Além da vasta base de dados existente, que nos permite comparar a contribuição de fontes específicas para a genotoxicidade de uma dada mistura complexa com dados obtidos no mundo inteiro, o teste de *Salmonella*/microsoma ainda nos dá ideia de quais grupamentos químicos podem ser responsáveis pelo efeito que se observa, pois, as respostas das diferentes linhagens, na



presença e ausência de ativação metabólica são características de um ou outro grupo químico. Ainda há a possibilidade de realizar, nas amostras ambientais, procedimentos de extração orgânica preferenciais para diferentes classes de compostos, permitindo melhor direcionamento das análises químicas. Estas características e a flexibilidade do ensaio de *Salmonella*/microsossoma fazem dele a escolha preferencial para uso rotineiro, sendo excelente ferramenta de monitoramento, que permite triar locais de interesse e auxiliar nas ações de fiscalização e controle de poluição.

#### 4.4.3 *Salmonella*/microsossoma - variações do método

##### 4.4.3.1 Ensaio em microssuspensão – teste de Kado

O teste de Kado, também denominado ensaio em microssuspensão, se baseia no aumento da quantidade de bactérias utilizadas e na redução da quantidade de amostra e mistura S9, aumentando assim a sensibilidade do ensaio. O teste utiliza as mesmas linhagens de *S. Typhimurium* do teste de Ames e baseia-se no mesmo princípio (KADO *et al*, 1983).

Neste projeto as amostras de água intersticial foram submetidas a um processo de extração orgânica empregando-se colunas de fase sólida (HLB Oasys™) e concentradas para que fosse possível a avaliação de doses maiores do que as normalmente usadas no Teste de Ames. Culturas bacterianas crescidas em caldo nutriente sob agitação por 16 horas a 37°C foram centrifugadas e, após serem concentradas (5x), volumes de 50 µL da cultura foram misturados em tubos de ensaio a 5 µL de amostra em concentrações equivalentes a doses de 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5 mL de amostra não concentrada. Depois da adição de 50 µL de solução tampão fosfato ou mistura S9 (ativação metabólica) foi feita uma pré-incubação de 90 minutos a 37°C. Após esse período foram adicionados 2 mL de ágar de superfície contendo biotina e traços de histidina. O conteúdo do tubo foi então homogeneizado e vertido em placas de Petri com ágar mínimo. Após a solidificação do ágar de superfície as placas foram incubadas a 37°C por 66 horas até o momento da leitura dos resultados (Figura 4). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o software SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*, versão 1.0, Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA).

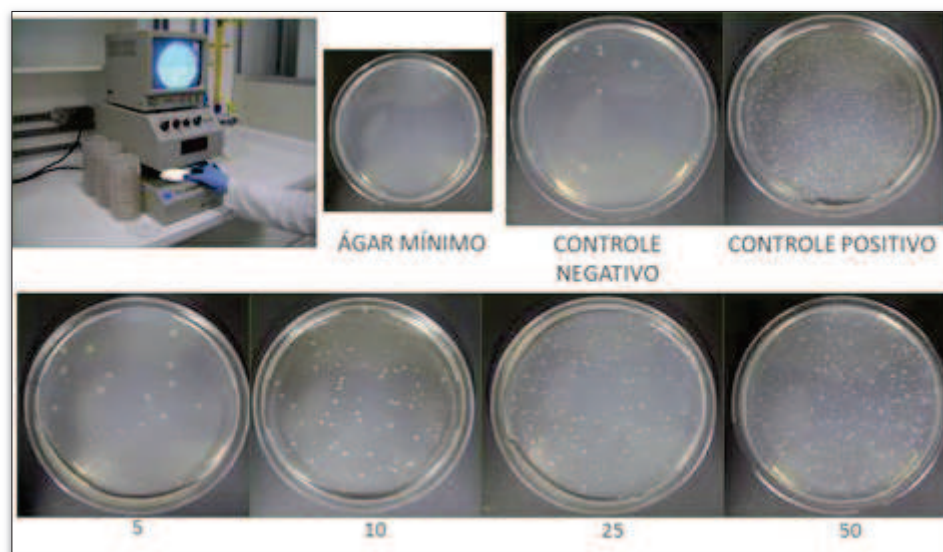


Figura 4 - Ensaio em microssuspensão – teste de Kado

#### 4.4.3.2 Método Direto

O método direto é uma modificação do teste de Ames descrito pelo Coriell Institute for Medical Research (1986) em que se analisa a amostra sem concentração prévia e sem passar por processo de extração, o que permite testar 2 mL de amostra como volume máximo, diferentemente de 0,2 mL do ensaio tradicional. Esta modificação consiste na utilização de ágar de superfície mais concentrado, utilizando a própria amostra como diluente. Esse método é aplicado principalmente para efluentes industriais e lixiviados, que costumam ser uma mistura complexa mais concentrada, com maior probabilidade da presença de teores elevados de compostos com potencial mutagênico. A amostra deve ser filtrada em membranas 0,45  $\mu\text{m}$  e/ou 0,22  $\mu\text{m}$  para sua adequada esterilização. Algumas propriedades da amostra podem dificultar a aplicação desse método. O pH e a força iônica da amostra podem ser tóxicos para as bactérias.

As amostras avaliadas neste projeto foram testadas nas doses de 0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2 mL, em triplicata, frente às linhagens TA98 e TA100 de *S. Typhimurium*. Além da amostra, em cada tubo de ensaio foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de cultura bacteriana crescida sob agitação a 37°C em caldo nutriente por 16 horas e 500  $\mu\text{L}$  de mistura S9 no ensaio com ativação metabólica. Os tubos foram pré-incubados por 30 minutos a 37°C e em seguida foi feita a adição do ágar de superfície em

volumes e concentrações adequadas para cada volume de amostra. Os conteúdos dos tubos foram homogeneizados e espalhados em placas de Petri contendo ágar mínimo com biotina e histidina. Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 66 horas até a leitura dos resultados. Assim como no teste de Kado, os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o software SALANAL.

#### 4.4.3.3 Método segundo a Norma ISO 16240:2005

A Norma ISO 16240:2005 especifica um método de determinação do potencial genotóxico em amostras de água e efluentes industriais seguindo os princípios do Teste de Ames. São utilizadas as linhagens de *Salmonella* Typhimurium TA98 e TA100 e, de modo similar ao Método Direto, as amostras são analisadas após filtração (0,45 e 0,22 µm), sem passar por processos de concentração ou extração orgânica. Nesta variação do Teste de Ames, diferentes concentrações da amostra testada são obtidas por meio de sua diluição com água ultrapura estéril.

Na análise das amostras deste projeto o método da Norma ISO 16240:2005 foi realizado com pequenas variações, adaptando-se a técnica às condições do laboratório. As modificações, como variação na concentração da mistura S9, ágar de superfície e tampão fosfato, por exemplo, foram previamente avaliadas sem que houvesse interferência nos resultados.

As amostras foram testadas em triplicata nas diluições 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 e 1:16. Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de amostra, 500 µL de tampão fosfato ou mistura S9 e 100 µL de cultura bacteriana crescida em caldo nutriente sob agitação a 37°C por 16 horas. Após a adição de 1 mL de ágar de superfície, os conteúdos dos tubos foram vertidos em placas de Petri contendo ágar mínimo com biotina e histidina. Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 66 horas até a leitura dos resultados. Os dados obtidos também foram analisados estatisticamente com o software SALANAL.

#### 4.4.3.4 Teste de Ames – Kit MPF™

O kit *Ensaio de Mutagenicidade Ames MPF™* foi adquirido da empresa suíça Xenometrix. Trata-se de um teste colorimétrico, realizado totalmente em meio líquido, que utiliza as mesmas linhagens de *S. Typhimurium* e o mesmo princípio da mutação reversa. Neste ensaio, a amostra e a

cultura bacteriana (TA98 e TA100) são colocadas em microplacas de 24 poços com meio mínimo e meio de exposição, com e sem metabolização (S9). Após 90 minutos sob agitação a 37°C, o conteúdo das microplacas é transferido para microplacas de 384 poços e incubado por 48 horas a 37°C. Os poços contendo colônias revertentes (que sofreram mutação decorrente da exposição à amostra) se apresentam com coloração amarelada, pois o crescimento bacteriano provoca uma mudança de pH do meio, enquanto que os poços restantes têm cor arroxeada. O aumento do número de poços amarelos em relação às placas controle representa, portanto, a presença de compostos mutagênicos na amostra testada.

As amostras foram filtradas em membrana de polietersulfona (PES) com poro de 0,22 µm (Sterifil) e testadas *in natura*. Foi utilizado o kit de Ensaio de Mutagenicidade Ames MPF™ 98/100 (contendo as linhagens TA98 e TA100 de *S. Typhimurium*) da Xenometrix. As amostras foram testadas na ausência e presença de ativação metabólica (mistura S9).

No teste de flutuação MPF, as linhagens bacterianas em suspensão foram expostas a 6 doses de cada amostra (diferentes concentrações) em microplacas de 24 poços contendo também meio mínimo e meio de exposição com traços de histidina. Cada concentração foi feita em triplicata, permitindo a análise estatística dos dados. Após pré-incubação de 90 minutos a 37°C e agitação de 250 rpm, a amostra foi diluída adicionando-se o meio indicador de pH (Figura 5A). A mistura contendo a amostra, as linhagens (com e sem S9) e os diferentes meios foram transferidos para placas de 384 poços (Figura 5B) com o auxílio de pipetadores multicanal. As amostras foram então incubadas em estufa a 37° C e o resultado do teste foi lido após 48 horas.

As colônias revertentes causaram a redução do pH do meio indicador, mudando sua coloração para amarelo (Figura 5C), permitindo sua identificação. Foi feita a contagem dessas colônias e a análise dos resultados. O aumento no número de colônias revertentes após exposição da amostra testada em relação ao controle negativo indica a presença de compostos mutagênicos.

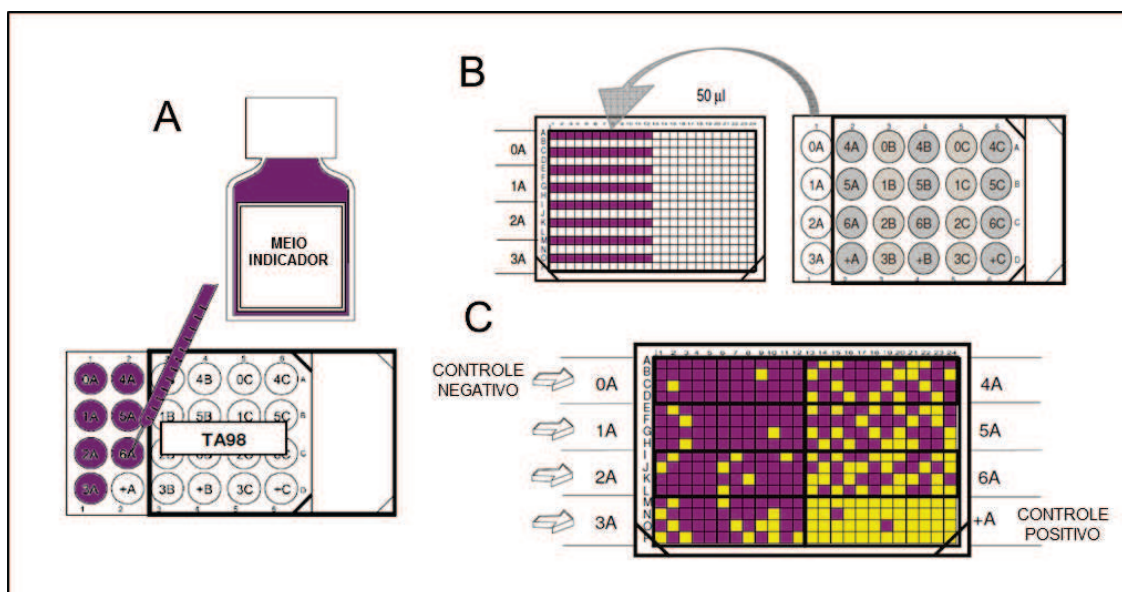


Figura 5 – Esquemas de distribuição das amostras em microplacas - kit Ames MPF™

#### 4.5 Análises químicas

As amostras foram analisadas quanto ao conteúdo dos metais arsênio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel, zinco e mercúrio. Exceto para o mercúrio, a determinação dos metais foi realizada segundo o método 3120B do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA - AWWA - WEF - versão on line), espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio - ICP/OES. Já para a determinação do mercúrio foi seguido o método 3112 do mesmo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

A análise para determinação de compostos orgânicos semi-voláteis (varredura) nas amostras de água intersticial foi realizada utilizando o método EPA 8270 – “Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (CG/MS)”, da Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA).

#### 4.6 Análises estatísticas

Foi realizada apenas análise descritiva dos resultados devido ao grande número de parâmetros químicos, metais e semi-voláteis, cujas concentrações nas amostras ficaram abaixo do Limite de Quantificação do método (LQ). Além disso, o ensaio de genotoxicidade resultou em negativo em todas as amostras e o de toxicidade aguda para *Vibrio fischeri* foi positivo para todas as amostras, o que impossibilitou a aplicação de técnicas estatísticas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Testes de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

Na tabela 1, encontram-se os resultados dos testes de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (CE20) realizados com amostras de água intersticial, por data e pontos de coleta. Para todas as amostras, o teste apresentou toxicidade.

Tabela 1 - Resultados dos testes com *V. fischeri* em água intersticial. UGRHI 6, 2012-2013

Ponto de coleta	<i>V. fischeri</i>			
	2012 CE20	Classificação	2013 CE20	Classificação
GUAR 00900	6,55 (5,31-8,08)	Muito tóxica	19,5 (18,0 – 21,1)	Muito tóxica
RGDE02900	11,2 (9,66 – 12,9)	Muito tóxica	14,2 (13,4 – 15,2)	Muito tóxica
TIPI04850	3,08 (2,94 – 3,23)	Muito tóxica	49,5 (37,2 -66,0)	Tóxica
BILL02100	20,5 (15,9 – 26,5)	Muito tóxica	15,9 (11,5 – 21,9)	Muito tóxica
TIET 04160	11,4 (9,33 -14,0)	Muito tóxica	NR	-
PINH04500	28,4 (18,3 – 44,2)	Tóxica	54,4 (47,3 – 62,6)	Moderadamente tóxica

NR = não realizada

Embora tenha ocorrido uma melhora no ano de 2013 em relação a 2012 nos pontos TIPI04850 e PINH04500, considerando a UGRHI 6 como um todo, todos os pontos apresentaram toxicidade para *Vibrio fischeri*, como aponta o relatório de qualidade de águas da CETESB de 2013. No mesmo relatório, consta que em 44,4% dos pontos da rede de monitoramento, a qualidade para os sedimentos é péssima, todos esses pontos localizados em UGRHIs com vocação industrial ou agropecuária, como é o caso da UGRHI 6, de vocação industrial. Essa classificação é feita com base no Critério de Qualidade de Sedimento – CQS, formado por três linhas de evidência: contaminação química, comunidade bentônica e toxicidade, este último incluindo testes de toxicidade com *Hyallela azteca*, ensaios de mutação reversa (Teste de Ames) e testes de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* (Microtox®). Os contaminantes que ocorreram com maior frequência em concentrações acima de TEL ou PEL foram: Cr e Ni, seguidos de Cu e HPA (CETESB, 2013).

Na UGRHI 6, os reservatórios Billings, Guarapiranga, Rio Grande (captação) e Pirapora mantiveram a classificação química dos anos anteriores, mostrando sedimentos altamente contaminados e com altos estoques de fósforo (CETESB, 2013).

Apesar de os testes de toxicidade aguda para *Vibrio fischeri* em água intersticial terem apresentado toxicidade, os resultados da análise química, tanto para metais como para orgânicos semi-voláteis nessa matriz, apresentaram níveis baixos (Tabelas 2 e 3), sendo que a maioria apresentou concentrações abaixo do limite de quantificação (LQ). A diferença entre os resultados das análises químicas de água intersticial e sedimento é devido à capacidade desses contaminantes se ligarem fortemente às partículas do sedimento, o que significa que somente uma pequena fração solubilizada dos contaminantes está presente na água intersticial. Então, quais seriam os compostos responsáveis pela toxicidade encontrada?

Alguns metais apresentam toxicidade para *Vibrio fischeri*. Ao verificarmos os dados de sedimento do Relatório de Qualidade das Águas de 2013 da CETESB, verificamos que o Reservatório Billings (BILL02100) apresentou concentrações de Hg, Ni, Cr, DDE e Cu acima de PEL, e teve classificação Ruim na avaliação ecotoxicológica. Também o Reservatório Guarapiranga (GUAR 00900) apresentou piora quando comparada às amostragens anteriores e foi classificado como regular. Observou-se nesse ponto aumento de concentrações de vários metais, inclusive do Cu que ultrapassou o limite PEL (CETESB, 2013). No entanto, as determinações de metais em água intersticial mostraram que, para a maioria, as concentrações mantiveram-se abaixo dos limites de quantificação (Tabela 2), exceto para Cu e Zn que, em alguns pontos, apresentaram concentrações mais elevadas que podem conferir toxicidade.

No estudo realizado por Roig *et al.* (2015), onde foram testadas fase sólida de sedimentos e água intersticial de 13 locais da Bacia do Rio Ebro, na Espanha, observou-se que As e Cu no sedimento foram os elementos que mais contribuíram para a toxicidade ao *V. fischeri*, e na água intersticial somente As, Cd e Ni. No mesmo estudo, as concentrações de metais em água intersticial foram bem mais baixas do que no sedimento. Os autores ressaltam que não há correlação significativa entre metal total no sedimento e concentrações de metal na água intersticial. Esse fato corrobora que o conteúdo de metal total em sedimentos, em geral, não é relacionado com a fração mais biodisponível, que se encontra na água intersticial (DOE *et al.*, 2003 *apud* ROIG *et al.*, 2015).

Segundo CETESB (2013), outro contaminante que apresentou concentrações no sedimento acima do valor de PEL foi o DDE, que é um metabólito do DDT, mas, devido à característica desse



composto em ligar-se fortemente às partículas do sedimento, não é esperado que as concentrações na água intersticial sejam elevadas. No presente estudo não foi analisado esse composto em água intersticial. Sforzini *et al.* (2016), analisaram sedimentos e água intersticial de um lago na Itália, contaminados com DDT e seus metabólitos DDD e DDE (coletivamente DDX), onde encontraram concentrações de DDX de 732,5 ppb no sedimento. No mesmo estudo, a água intersticial não apresentou toxicidade para os organismos testados, entre eles *V. fischeri*, o que corroborou com as análises químicas que determinaram na água intersticial a concentração de apenas 0,0071 ppb de DDX, mostrando a baixa biodisponibilidade do contaminante.

A ecotoxicidade dos surfactantes é relativamente alta devido a sua ação contra membranas biológicas, sendo o *Vibrio fischeri* um dos organismos mais sensíveis (LECHUGA *et al.*, 2016). Particularmente, o 4-nonilfenol, produto de degradação dos surfactantes não-ionônicos é muito tóxico para *Vibrio fischeri* (LECHUGA *et al.*, 2016; HERNANDO *et al.*, 2007). Como essas substâncias não foram alvo das análises químicas realizadas na água intersticial, pesquisamos os dados da rede de monitoramento da CETESB em amostras de água superficial, na área de estudo. A CETESB monitora as substâncias tensoativas do grupo de aniônicos, mas não os surfactantes não-iônicos. De qualquer forma, todos os grupos de surfactantes apresentam toxicidade ao *Vibrio fischeri*, mas ao avaliarmos as concentrações determinadas na água nos pontos PINH04500, GUAR00900, BILL02100 e RGDE2900, constantes dos Relatórios de Qualidade de Água da CETESB nos anos 2012 e 2013, somente o ponto PINH04500 apresentou altas concentrações de surfactantes (CETESB 2012, 2013).

No estudo de Jarque *et al.* (2016), onde avaliou-se a toxicidade de sedimentos de rios contaminados usando ensaio com *Vibrio fischeri*, as concentrações dos contaminantes como PAHs, PCBs, DDT e HCH foram correlacionados com a toxicidade. As concentrações de carbono orgânico total (TOC) também foram positivamente correlacionadas à toxicidade, já os metais pareceram ter pouca influência na toxicidade apresentada. As determinações de compostos orgânicos realizadas nas amostras de água intersticial do presente projeto não detectaram concentrações acima do LQ para os PAHs, já PCBs, DDT e HCH não foram analisados.

A toxicidade aguda observada no ensaio com *Vibrio fischeri* no nosso estudo foi provocada pela presença de compostos tóxicos na água intersticial, mas é difícil discriminar uma relação direta com toxicantes específicos. Além das substâncias tóxicas no meio, o ensaio sofre forte influência

sazonal, conforme observado no estudo de Jarque *et al.* (2016), mas esse parâmetro não pode ser considerado no presente estudo devido à frequência anual de coleta e apenas 2 anos de estudo.

## 5.2 Ensaio de genotoxicidade

Não foi detectada atividade mutagênica em nenhuma das amostras de água intersticial dos sedimentos coletados, em quaisquer das metodologias utilizadas. No entanto, considerando os resultados obtidos com extratos orgânicos dos sedimentos totais do ponto BILL02100, os mesmos demonstraram mutagenicidade associada ao material particulado, para amostras das duas campanhas, de 2012 e 2013, assim como para a amostra de GUAR00900 em 2012 (CETESB, 2013, 2014). Esses resultados, que não fizeram parte do presente projeto, mas fazem parte da rede de monitoramento do sedimento da CETESB, sugerem que os compostos mutagênicos presentes nestes locais não são mobilizados do sedimento para a água intersticial, ou o são em baixíssimas concentrações, de maneira que seus efeitos mutagênicos não podem ser detectados nesta matriz. Alguns ftalatos foram relatados como mutagênicos de atividade fraca, como dietil ftalato e dibutil ftalato (ZEIGER *et al.*, 1985) que foram determinados em concentrações acima do limite de quantificação em nosso estudo no Reservatório Billings (BILL02100), porém esta atividade não foi verificada nos ensaios biológicos de mutagênese realizados. Metais pesados têm uma potência mutagênica fraca, e sua toxicidade é associada a estresse oxidativo. Desta forma, os metais nas concentrações determinadas nas amostras deste estudo, não teriam atividade mutagênica detectável (HODJAT *et al.*, 2015). De fato, as análises de metais nas amostras mantiveram-se em sua maioria, abaixo dos limites de quantificação, e aquelas cujas concentrações de metais foram determinadas, apresentaram-se em concentrações baixas, quando comparadas às do CONAMA 357 para água bruta.

## 5.3 Análises químicas

Na tabela 2, estão os resultados das análises de metais nas amostras de água intersticial. A maioria das amostras tiveram resultados abaixo dos LQs, exceto Pb, Cu e Zn. Ao compararmos as concentrações obtidas desses metais com os padrões para enquadramento de corpos hídricos Classe Especial e 2 da Resolução CONAMA 357, como são os dos pontos GUAR00900, BILL02100 e RGDE02900, essas ultrapassam os padrões, principalmente para Pb (0,01 mg/L) e Cu (0,009 mg/L).

A tabela 3 mostra os resultados das determinações de compostos orgânicos semi-voláteis nas amostras de água intersticial. Somente ftalatos foram quantificados em algumas amostras, mas em concentrações baixas, na ordem de  $\mu\text{g/L}$ .

Tabela 2 – Concentrações de metais na água intersticial, por local de coleta, na UGHRI 6. 2012-2013

Metais	Concentração (mg/L)											
	GUAR 00900		RGDE02900		TIPI04850		BILL02100		TIET 04160		PINH04500	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
As	<0,005	<0,01	<0,005	<0,01	NR	<0,01	NR	<0,01	NR	NR	NR	<0,01
Cd	<0,0005	<0,0007	<0,0005	<0,0007	<0,0005	<0,0007	<0,0007	<0,0007	<0,0007	NR	<0,0007	<0,0007
Pb	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	PI	0,01	NR	<0,009	<0,009	<b>0,05</b>	NR	<0,009	NR
Cu	<b>0,52</b>	<b>0,56</b>	<b>0,5</b>	<b>0,64</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,01</b>	<0,01	<b>0,04</b>	NR	<b>0,02</b>	<b>0,03</b>
Cr	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	0,02	0,03	<0,02	<0,02	0,05	NR	<0,02	<0,02
Hg	<0,0002	<0,00002	<0,0002	<0,002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	<0,0002	NR	<0,0002	<0,0002
Ni	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	0,06	0,07	<0,02	<0,02	<0,02	NR	<0,02	0,02
Zn	0,04	0,03	0,03	<0,02	0,16	<b>0,29</b>	0,02	<0,02	<b>0,26</b>	NR	0,07	0,03

NR = não realizado; PI = presença de interferentes

**Tabela 3 - Compostos orgânicos semi-voláteis na água intersticial. 2012-2013**

Varredura semi-voláteis	Concentração (µg/L)											
	GUAR 00900		RGDE02900		TIPI04850		BILL02100		TIET 04160		PINH04500	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
1,2,4-Triclorobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
1,2-Diclorobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
1,3-Diclorobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
1,4-Diclorobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2,4,6-Triclorofenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2,4-Diclorofenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2,4-Dimetilfenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2,4-Dinitrofenol	<4,00	PI	<4,00	PI	<4,00	PI	<6,00	PI	<6,00	NR	<6,00	PI
2,4-Dinitrotolueno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2,6-Dinitrotolueno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2-Clorofenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2-Cloronaftaleno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
2-metil-4,6-dinitro fenol	<4,00	PI	<4,00	PI	<4,00	PI	<6,00	PI	<6,00	NR	<6,00	PI
2-Nitrofenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
4-Bromofenil fenil éter	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
4-Cloro-3-metil fenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
4-Clorofenil fenil éter	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
4-Nitrofenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Acenafteno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Acenaftaleno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Antraceno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Azobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Benzilbutil ftalato	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Benzo(a)antraceno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Benzo(a)pireno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Benzo(b)fluoranteno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Benzo(ghi)perileno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Benzo(k)fluoranteno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Bis(2-cloroetil) éter	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Bis (cloroetoxi) metano	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Bis(2-cloroisopropil) éter	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Bis(2-etilexil) ftalato	<10,00	<5,00	<10,00	PI	<b>36,9</b>	PI	<15,0	PI	<b>69,3</b>	NR	<b>33,6</b>	<b>18,4</b>
Carbazole	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	PI	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Criseno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Di-n-octil ftalato	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Dibenzo(a,h)antraceno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Dibutil ftalato	<10,00	<5,00	<10,00	<5,00	<10,00	<5,00	<b>92,6</b>	<5,00	<15,0	NR	<15,0	<5,00
Dietil ftalato	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<b>91,5</b>	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<b>7,23</b>
Dimetil ftalato	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Fenantreno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Fenol	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<b>8,28</b>	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Fluoranteno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Fluoreno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Hexaclorobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Hexaclorobutadieno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Hexacloroetano	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Hexaclorociclopentadieno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Indeno(1,2,3-cd)pireno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Isoforone	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
N-nitroso-n-propilamina	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Naftaleno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Nitrobenzeno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00
Pentaclorofenol	<4,00	PI	<4,00	PI	<4,00	PI	<6,00	PI	<6,00	NR	<6,00	PI
Pireno	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<4,00	<2,00	<6,00	<2,00	<6,00	NR	<6,00	<2,00

NR = não realizado; PI = presença de interferentes

Aparentemente os resultados obtidos nas determinações químicas não explicam totalmente a toxicidade observada no ensaio com *Vibrio fischeri*, sendo necessária uma avaliação mais detalhada.

## 6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O monitoramento químico clássico fornece resultados bem detalhados, mas é incompleto por não fornecer informação sobre o impacto da mistura de poluentes e sua biodisponibilidade. As metodologias químicas analíticas, por sua alta sensibilidade, confiabilidade e baixos limites de detecção são essenciais para fins regulatórios, mas não têm a capacidade de avaliar toxicidade, biodisponibilidade e potenciais efeitos antagonísticos/sinérgicos dos poluentes. Para fins de monitoramento, a avaliação química deve ser menos decisiva na classificação de água doce, em complementação, os bioensaios podem ser úteis na predição de possíveis efeitos biológicos perigosos da fração química biodisponível em condições padronizadas (ROIG et al., 2015).

Os testes de toxicidade em água intersticial complementam a avaliação da fase sólida dos sedimentos fornecendo informações sobre as espécies mais sensíveis ou condições de exposição alternativa. Alguns fatores abióticos como composição do sedimento e processos geoquímicos, podem também influenciar as concentrações finais dos poluentes e sua toxicidade, por isso, para o diagnóstico mais preciso da condição do corpo d'água, há necessidade de se integrar todos esses dados com as avaliações químicas e de toxicidade.

O presente estudo mostrou a viabilidade de se utilizar a água intersticial para os bioensaios, no entanto, devido à influência da sazonalidade na qualidade dos recursos hídricos e o pequeno número de amostras, apenas onze, não foi possível correlacionar os resultados de toxicidade com poluentes específicos. Assim, recomenda-se que o monitoramento em água intersticial, tenha sua frequência aumentada para cobrir ciclos sazonais, com conseqüente aumento da disponibilidade de dados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-3**: Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) - Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2012.

AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURSTON, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 70, p. 782-786, 1973.

AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutat. Res.** v. 31, p. 347-364, 1975.

APHA; AWWA; WEF. Method 3120B: metals by plasma emission spectroscopy: inductively coupled plasma (ICP) method. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2017. Approved by Standard Methods Committee, 1999. Editorial revisions 2011. Disponível em: <  
<http://www.standardmethods.org/store/ProductView.cfm?ProductID=489>>. Acesso em: maio 2017.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2011**. São Paulo, 2012. 356 p. + Apêndices e Anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <  
<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em: jun. 2017.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2012**. São Paulo, 2013. 370 p. + Apêndices e Anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <  
<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em: jun. 2017

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2013**. São Paulo, 2014. 434 p. (2 partes) + Apêndices e Anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <  
<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em: jun. 2017.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014**. São Paulo, 2015. 540 p. (2 partes) + Apêndices e Anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <  
<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em: jun. 2017.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2015**. São Paulo, 2016. 562 p. (2 partes) + Apêndices e Anexos. (Série Relatórios). Disponível em: <  
<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-e-relatorios/>>. Acesso em: jun. 2017

CORIEL INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH. Ames Salmonella Mutagenicity Assay Protocol, Camden, NJ, USA, 1986.

HERNANDO, M.D.; De VETTORI, S.; MARTÍNEZ BUENO, M.J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. **Chemosphere**, 68: 724-730, 2007.

HODJAT, M.; REZVANFAR, M.A.; ABDOLLAHI, M. A systematic review on the role of environmental toxicants in stem cells aging. **Food Chem. Toxicol.** 86: 298–308, 2015. doi:10.1016/j.fct.2015.11.002

ISO 16240, Water quality – Determination of the genotoxicity of water and wastewater – *Salmonella* /microsome test (Ames test), 2005.

JARQUE, S.; MASNER, P.; KLÁNOVÁ, J.; PROKEŠ, R.; BLÁHA, L. Bioluminescent *Vibrio fischeri* Assays in the Assessment of Seasonal and Spatial Patterns in Toxicity of Contaminated River Sediments. **Frontiers in Microbiology**, 07 November 2016. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01738.

KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. **Mutat. Res.** v. 121, p. 25-32, 1983.

LECHUGA, M.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; JURADO, E.; NÚÑEZ-OLEA, J.; RÍOS, F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 125: 1-8, 2016.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat. Res.** v. 113, p. 173-215, 1983.

MATOSO, E.; GONÇALVES, J.R.; CADORE, S. Chemical Analysis of Interstitial Water in Rivers of Centro Experimental Aramar Area. **International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013**. Recife, PE, Brazil, November 24-29, 2013. Associação Brasileira de Energia Nuclear – ABEN. ISBN: 978-85-99141-05-2.

ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; MORENO-GARRIDO, I.; NIETO, E.; HAMPEL, M.; GALLEGO, E.P.; SCHUHMACHER M.; BLASCO, J. Assessment of sediment ecotoxicological status as a complementary tool for the evaluation of surface water quality: the Ebro river basin case study. **Science of the Total Environment**. 503-504: 269-278, 2015.

SFORZINI, S.; GOVERNA, D.; BOERI, M.; OLIVERI, L.; OLDANI, A.; VAGO, F.; VIARENGO, A.; BORRELLI, R. Relevance of the bioavailable fraction of DDT and its metabolites in freshwater sediment toxicity: New insight into the mode of action of these chemicals on *Dictyostelium discoideum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 132: 240-249, 2016.

UNITED STATES. EPA. Method 8270d: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms). In: \_\_\_\_\_. The SW-846 Compendium: [test methods for evaluating solid waste: physical/chemical methods compendium](#). Washington, DC, 2017. 71 p. Test Method 8270D, Rev. 5, July 2014. Disponível em: <<https://www.epa.gov/hw-sw846/sw->



[846-test-method-8270d-semivolatile-organic-compounds-gas-chromatographymass-spectrometry](#)>. Acesso em: maio 2017.

ZEIGER, E.; HAWORTH, S.; MORTELMANS, K.; SPECK, W. Mutagenicity testing of Di(2-ethylhexyl)phthalate and related chemicals in Salmonella. Environ. Mutagen. 7: 213–232, 1985. doi:10.1002/em.2860070209

**ANEXO I**

**Equipamentos Adquiridos no Projeto**

**A. Listagem dos equipamentos adquiridos**

Nº	Itens adquiridos	Unidade	Quant.
1.1	Analisador de toxicidade Microtox 500 (colorímetro) incluindo software de controle	Peça	01
1.2	Freezer e refrigerador combinados -25°C até 5°C e +2°C até +15°C. Acompanhado de prateleiras	Conjunto	02
1.3	Concentrador de amostras	Peça	01
1.4	Refrigerador com freezer, vertical, 340L (refrigerador) e 82L (freezer)	Peça	02
1.5	Centrífuga refrigerada de bancada. Acompanhada de rotor e adaptadores para tubos	Peça	01
1.6	Microscópio campo claro/escuro; não invertido; com objetivas 20x, 40x, 100x e 400x para contraste de fase; com trinocular (suporte para câmara fotográfica)	Peça	02
1.7	Esterilizador horizontal e acessórios	Peça	01
2.1	Kit AQUA para teste de mutagenicidade	Kit	10
2.2	Kit MPF para teste de mutagenicidade	Kit	05

## B. Fotos dos equipamentos

### Item 1.1 - Analisador de toxicidade Microtox 500 – Patrimônio CETESB ME-10992



### Item 1.2 - Freezer e refrigerador combinados – Patrimônios CETESB ME-11200 e ME-11218



Item 1.3 – Concentrador de Amostras – Patrimônio CETESB ME-11210



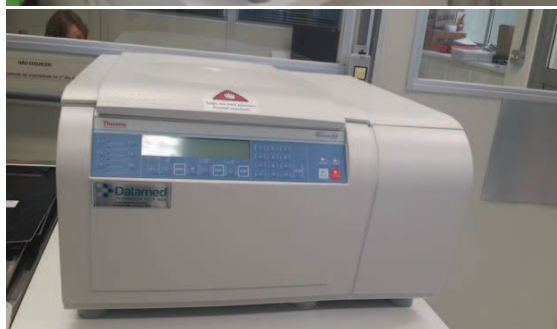
Item 1.4.1 – Refrigerador com freezer – Patrimônio CETESB ME- 11173



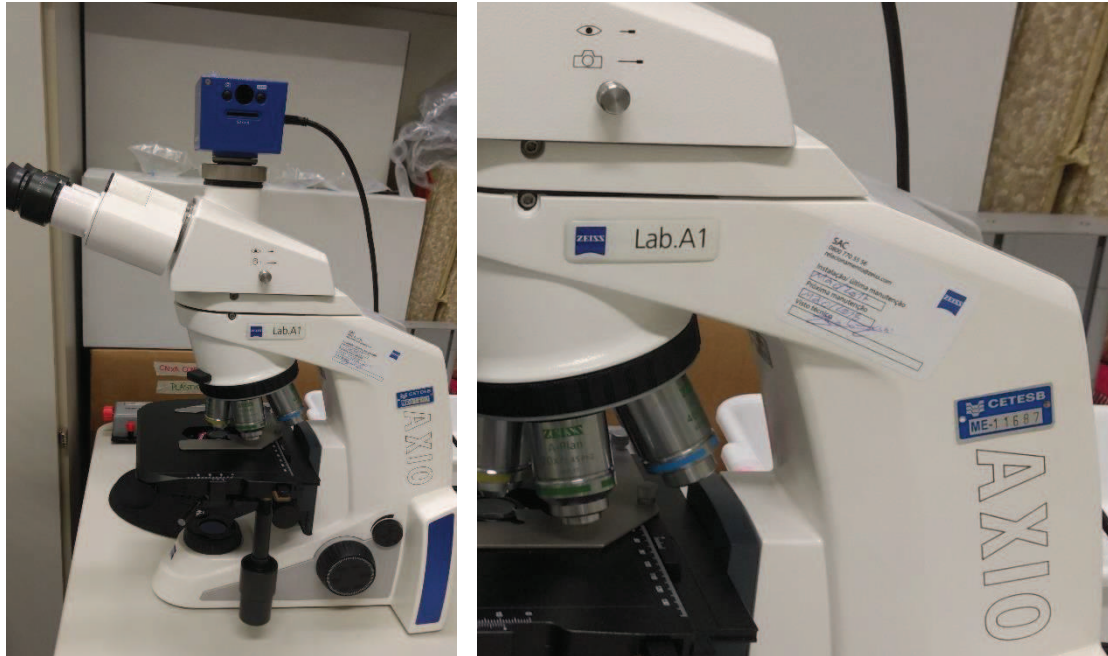
Item 1.4.2 – Refrigerador com freezer – Patrimônio CETESB ME- 11154



Item 1.5 – Centrífuga refrigerada de bancada – Patrimônio CETESB ME- 11100



**Item 1.6.1 – Microscópio – Patrimônio CETESB ME- 11687**



**Item 1.6.2 – Microscópio – Patrimônio CETESB ME- 11686**



Item 1.7 – Esterilizador horizontal e acessórios – Patrimônio CETESB ME – 10976



Itens 2.1 e 2.2 – Kits AQUA e MPF para teste de mutagenicidade – Não é patrimoniado

