

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E**  
**RECURSOS HÍDRICOS**

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE**  
**AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO DO RESERVATÓRIO**  
**DE FUNIL, RJ**

**Mariana de Freitas Matos**

**Itajubá, Junho de 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E**  
**RECURSOS HÍDRICOS**

**Mariana de Freitas Matos**

**AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE**  
**AMOSTRAS DE ÁGUA E SEDIMENTO DO RESERVATÓRIO**  
**DE FUNIL, RJ**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

**Área de Concentração:** Meio Ambiente e Recursos Hídricos

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca

**Co-orientadora:** Dra. Clarice Maria Rispoli Botta

**Junho de 2011**  
**Itajubá - MG**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá –  
Bibliotecária Jacqueline Balducci- CRB\_6/1698

M433a

Matos, Mariana de Freitas

Avaliação e identificação da toxicidade de amostras de água  
e sedimento do Reservatório de Funil, RJ / Mariana de Freitas

Matos. -- Itajubá, (MG) : [s.n.], 2011.

59 p.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca.

Coorientadora: Dra. Clarice Maria Rispoli Botta.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Ensaio de toxicidade. 2. Toxicidade aguda. 3. Amostras  
ambientais. 4. Reservatório de Funil. I. Fonseca, Ana Lúcia,  
orient. II. Botta, Clarice Maria Rispoli, coorient. III. Universi\_  
dade Federal de Itajubá. IV. Título.

Mariana de Freitas Matos

**Avaliação e Identificação da Toxicidade de amostras de água e sedimento do  
Reservatório de Funil, RJ**


Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Aprovada em 27 de junho de 2011.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Arnola Cecília Rietzler  
1º Examinador - UFMG

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Maria Rispoli Botta  
3º Examinador - USP/São Carlos - (Co-Orientador)

  
Pro<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Matiko Kondo  
2º Examinador - UNIFEI

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fonseca  
4º Examinador - UNIFEI - (Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Lúcia, pela orientação durante o mestrado, pelos ensinamentos passados desde a iniciação científica na graduação, pela confiança, paciência e amizade.

À Dra. Clarice, por aceitar a co-orientação deste trabalho, por auxiliar nas práticas de laboratório e por esclarecer as inúmeras dúvidas surgidas.

À FURNAS, por possibilitarem a realização deste trabalho através do suporte nas coletas, pela boa vontade de todos os funcionários do sistema de monitoramento.

Ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), especialmente ao Amândio Nogueira, funcionário do Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia Aquática, ao ex-aluno Danilo Barbosa, e à Maressa, por me receberem e me ajudarem nas primeiras práticas realizadas.

Ao Prof. Dr. Antônio Mozeto, por gentilmente nos atender no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, às suas alunas Ana Paula e Aline, e ao funcionário Ronaldo, por me ajudarem nas análises realizadas.

Ao Prof. Dr. André Ferraz, por gentilmente nos atender no Laboratório de Ciências da Madeira da Escola de Engenharia de Lorena - USP.

À Profa. Dra. Arnola Rietzler pela ajuda com os materiais para a pesquisa.

À Isabel Rocha, doutoranda da UFRJ, pelos artigos e pela atenção.

À Universidade Federal de Itajubá, ao Instituto de Recursos Naturais e seus professores, pelos ensinamentos adquiridos desde a graduação até o mestrado. Aos funcionários dos laboratórios da UNIFEI, Cláudio, Tânia, João Luiz, Paulo, João Vitor e Elaine, por me ajudarem no dia-a-dia no laboratório e nas práticas realizadas.

À Maria Rita por me ajudar nos experimentos de laboratório e aos colegas do MEMARH que em algum momento me ajudaram durante o período de mestrado.

Aos professores Dra. Milady e Dr. Arcilan pela participação na banca de qualificação e sugestões muito válidas ao trabalho.

Aos meus pais, João e Augusta, por estarem sempre presentes, pela prontidão, dedicação, e simplesmente por serem meus pais! Aos meus irmãos Thiago e Flávio, e demais familiares, por sempre me ajudarem quando eu pedia. Ao meu namorado Artur pela ajuda no trabalho de campo e pelo companheirismo.

À CAPES pela bolsa de estudo.

## RESUMO

MATOS, M. F. **Avaliação e Identificação da Toxicidade de amostras de água e sedimento do Reservatório de Funil, RJ.** Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG. 2011.

O Reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil, inserido na bacia do Rio Paraíba do Sul, recebe o aporte contínuo de nutrientes, apresentando características de um sistema altamente eutrofizado, com intensas florações de cianobactérias. Estudos comprovaram a presença de diversos contaminantes na água e no sedimento do reservatório, assim como ensaios de toxicidade com organismos zooplancônicos tem mostrado efeitos agudos e crônicos. Este trabalho teve como objetivo identificar os possíveis compostos ou classe de compostos causadores da toxicidade, através da utilização dos procedimentos de Avaliação e Identificação de Toxicidade (AIT). Foram realizadas três amostragens de água superficial e sedimento em dois pontos do reservatório, sendo que para o sedimento, os ensaios foram conduzidos com a fase líquida, a partir da extração da água intersticial, de acordo com os procedimentos da Fase I da AIT propostos pela USEPA (1991; 2007). Os ensaios de toxicidade iniciais mostraram efeito agudo a *Daphnia similis* nas amostras de água das três campanhas de campo (abril e outubro/2010, janeiro/2011) e apenas na primeira para a amostra de sedimento. Os resultados indicaram que a toxicidade da água é devida a compostos orgânicos ácidos ou básicos, que sofreram degradação, oxidação ou volatilização e não apenas à presença de cianobactérias comumente encontradas no reservatório, visto que a água perde sua toxicidade rapidamente (menos de uma semana). Para a amostra de sedimento, a toxicidade pode ser causada pela presença de metais, amônia e compostos orgânicos pH dependentes. Trata-se de uma primeira tentativa de identificação dos compostos causadores de toxicidade realizada no Reservatório de Funil, cujos resultados necessitam ser refinados, principalmente no que tange às causas da perda de toxicidade da água em curto período de tempo. Por outro lado, a metodologia usada pode servir como suporte a estudos de recuperação deste ecossistema.

**Palavras-chave:** Ensaios de Toxicidade. Toxicidade Aguda. Amostras Ambientais. Reservatório de Funil.

## ABSTRACT

MATOS, M. F. **Toxicity Identification and Evaluation of water and sediment samples from the Funil Reservoir, RJ.** Dissertation (Masters degree in Environment and Water Resources). Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG. 2011.

The reservoir of the Funil Hydroelectric Powerplant, located at the Paraíba do Sul River watershed, receives continuous nutrient input, with characteristics of a highly eutrophized system, with intense blooms of cyanobacteria. Studies have shown the presence of various contaminants in water and sediment of the reservoir, as well as toxicity tests with zooplankton have shown acute and chronic effects. This study aimed to identify possible compounds or classes of compounds that cause toxicity through the use of the Toxicity Identification and Evaluation (TIE) procedures. Three samples from surface water and sediment were carried out at two points of the reservoir. For the sediment, the tests were conducted with the liquid phase, based on the extraction of interstitial water, according to the TIE Phase I procedures proposed by USEPA (1991; 2007). Initial toxicity tests showed acute effect on *Daphnia similis* on all water samples (field campaigns of April and October/2010, January/2011) and on the first campaign for the sediment sample. According to the results, the water toxicity was due to acid or basic organic compounds, which have suffered degradation, oxidation or volatilization and not only due to the presence of cyanobacteria commonly found in the reservoir, since the water sample loses its toxicity rapidly (less than one week). Concerning the sediment sample, the toxicity can be caused by the presence of metals, ammonia and of pH dependent organic compounds. This is a first attempt to identify the compounds that cause toxicity held at the study site. Therefore, these results must be refined, especially regarding the causes of water toxicity decay in a short period of time. On the other hand, it is demonstrated that the proposed methodology can be a very useful tool for recovery studies of this ecosystem.

**Keywords:** Toxicity Tests. Acute Toxicity. Environmental Samples. Funil Reservoir.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (CEIVAP, 2010).....	15
Figura 2 - Localização do Reservatório da UHE de Funil (FERRÃO-FILHO <i>et al.</i> , 2009b)..	17
Figura 3 - Floração de cianobactérias no reservatório de Funil em 12/01/2010 (Autora).....	18
Figura 4 - Pontos de amostragem. P1 próximo à barragem e P2 no corpo do reservatório. ....	21
Figura 5- Etapas da Fase I realizadas na 1ª campanha com a amostra de água de P2.....	26
Figura 6 - Etapas da Fase I realizadas na 2ª e 3ª campanhas com a amostra de água de P2. ....	27
Figura 7 - Etapas da Fase I realizadas na 1ª campanha com a água intersticial da amostra de sedimento de P1.....	31
Figura 8 - Imobilidade de <i>D. similis</i> expostas às amostras de água dos pontos P1 e P2 do reservatório de Funil após exposição aguda. ....	36
Figura 9 - Imobilidade de <i>D. similis</i> expostas às amostras de água intersticial de P1 e P2 em ensaios de toxicidade aguda. ....	37
Figura 10 - Imobilidade de <i>D. similis</i> expostas aos tratamentos de AIT em ensaios de toxicidade aguda para a amostra de água do ponto P2 do reservatório de Funil.....	39
Figura 11 - Imobilidade de <i>D. similis</i> expostas às amostras do ponto P2 do reservatório de Funil em testes bases de toxicidade aguda. ....	42
Figura 12 - Imobilidade de <i>D. similis</i> expostas aos primeiros tratamentos de AIT. Ensaios de toxicidade aguda em 24 horas para a amostra de água intersticial do ponto P1 do reservatório de Funil.....	45
Figura 13 - Imobilidade de <i>D. similis</i> no segundo dia de tratamento de AIT. Ensaios de toxicidade aguda em 24 horas para a amostra de água intersticial do ponto P1 do reservatório de Funil.....	46
Figura 14 - Imobilidade de <i>D. similis</i> expostas a tratamentos de AIT com ajuste de pH, Tioossulfato de sódio e EDTA. Ensaios de toxicidade aguda em 24 horas para a amostra de água intersticial de P1.....	47
Figura 15 - Carta controle de sensibilidade de <i>D. similis</i> à KCl (CRHEA/USP).....	58
Figura 16 - Carta controle de sensibilidade de <i>C. silvestrii</i> à NaCl (CRHEA/USP).....	58
Figura 17 - Carta controle de sensibilidade de <i>D. similis</i> à NaCl (UNIFEI).....	59
Figura 18 - Carta controle de sensibilidade de <i>C. silvestrii</i> à NaCl (UNIFEI).....	59



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química das amostras de água obtidas nos dois pontos amostrais (P1 e P2) do reservatório de Funil em abril/2010.....	33
Tabela 2 - Índice do Estado Trófico e grau de trofia do reservatório de Funil no mês de abril/2010.....	33
Tabela 3 - Teores médios de areia, silte e argila das amostras de sedimento dos dois pontos amostrais (P1 e P2) do reservatório de Funil.....	33
Tabela 4 - Porcentagem de matéria orgânica das amostras de sedimento dos dois pontos amostrais (P1 e P2) do reservatório de Funil.....	34
Tabela 5 - Concentração de metais totais encontrados na amostra de sedimento do ponto amostral (P1) próximo à barragem do reservatório de Funil.....	34
Tabela 6 – Níveis de classificação estabelecidos pela Conama 344/04 (BRASIL, 2004) dos metais encontrados na amostra do sedimento do reservatório de Funil. ....	35
Tabela 7 - Sobrevivência e número de neonatas de <i>C. silvestrii</i> expostas às amostras de água de P1 e P2 em teste de toxicidade crônica.....	36
Tabela 8 - Sobrevivência e número de neonatas de <i>C. silvestrii</i> expostas às amostras de água intersticial de P1 e P2 em ensaio de toxicidade crônica em outubro/2010.....	38

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	4
3.1	AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE – AIT	4
3.1.1	Fase I – Caracterização	7
3.1.2	Fase II – Identificação	10
3.1.3	Fase III – Confirmação	11
3.1.4	Utilização do estudo de AIT no Brasil	12
3.2	ÁREA DE ESTUDO	15
3.2.1	Bacia do Rio Paraíba do Sul	15
3.2.2	Reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil	16
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
4.1	COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	21
4.2	CULTIVO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE	22
4.3	ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS AMOSTRAS	23
4.4	ENSAIOS DE TOXICIDADE INICIAIS	24
4.4.1	Amostras de água	24
4.4.2	Amostras de água intersticial do sedimento	24
4.5	AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT)	25
4.5.1	Amostra de água	26
4.5.2	Amostra de água intersticial do sedimento	30
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	32
5.1	CONTROLE DE QUALIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE	32
5.2	ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS AMOSTRAS	32
5.3	ENSAIOS DE TOXICIDADE INICIAIS	35
5.3.1	Amostras de água	35
5.3.2	Amostras de água intersticial do sedimento	37
5.4	AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT)	39
5.4.1	Amostra de água	39
5.4.2	Amostra de água intersticial do sedimento	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	50
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b>	51
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	52
	<b>APÊNDICE A – Cartas controle</b>	58

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e o crescimento urbano intensos vêm causando inúmeros impactos sobre os recursos hídricos, refletindo diretamente na qualidade da água. Inserido neste contexto encontra-se a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, principal manancial hídrico do estado do Rio de Janeiro, que percorre o eixo industrial dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. No seu percurso, recebe uma grande carga de poluentes urbanos e industriais, e têm acumulado de forma contínua e crescente, nutrientes e substâncias tóxicas, apresentando sérios problemas de contaminação e eutrofização das suas águas (ALERJ, 2005; CEIVAP, 2010).

O reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil está inserido no rio Paraíba do Sul, situado entre os municípios de Resende e Itatiaia, na divisa dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. O reservatório serve como um decantador natural de sedimentos, considerado uma verdadeira barragem à poluição recebida do Vale do Paraíba paulista, melhorando a qualidade das águas a jusante. Submetido ao aporte contínuo de nutrientes, tem características de um sistema altamente eutrofizado, apresentando intensas florações de cianobactérias produtoras de toxinas (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b).

Estudos realizados por vários autores têm mostrado a presença de diversos contaminantes na água e no sedimento do reservatório do Funil, bem como ensaios de toxicidade com organismos zooplanctônicos tem mostrado efeitos agudos e crônicos (BRANCO *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2002; PRIMO, 2006; FERRÃO FILHO *et al.*, 2009b).

Verificada a toxicidade neste reservatório, a identificação dos compostos responsáveis é extremamente importante e necessária para ações de recuperação e gestão, visto a grande importância do reservatório de Funil no ambiente em que está inserido. Nesse sentido, a utilização dos procedimentos de Avaliação e Identificação de Toxicidade (AIT) apresenta-se como um método de grande utilidade.

Os procedimentos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (*Toxicity Identification Evaluation - TIE*) foram desenvolvidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, desenvolvidos inicialmente para efluentes industriais. Estudos posteriores demonstraram que também podem ser utilizados com sucesso para a identificação de compostos causadores de toxicidade em águas superficiais, solubilizados de resíduos perigosos, frações aquosas de sedimento e sedimento total (USEPA, 1991a).

A AIT combina a quantificação da toxicidade com a identificação e confirmação do(s) composto(s) e/ou classe de compostos responsáveis pela toxicidade e envolve 3 fases distintas. A fase I consiste na caracterização da natureza físico-química dos compostos responsáveis pela toxicidade. A fase II é essencialmente analítica e na fase III é feita a confirmação do(s) agente(s) suspeito(s) de causar toxicidade (USEPA, 1991a).

O uso deste procedimento vem se expandindo em diversos centros de pesquisa no Brasil, tendo sua aplicação em efluentes industriais, amostras de águas superficiais e sedimentos, em ambientes de água doce e marinho (BOTTA, 2002; PIRES, 2006; BURATINI *et al.*, 2007; NILIN, 2008; BARBOSA, 2010).

Neste sentido, o presente trabalho visou identificar os possíveis compostos causadores da toxicidade encontrada no reservatório de Funil, através da aplicação do estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade em amostras de água e de sedimento. Este trabalho complementa as informações já obtidas por diversos estudos realizados neste ambiente, que buscam o entendimento da realidade local e a determinação de possíveis medidas mitigadoras a serem implantadas na bacia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo de Avaliação Ecotoxicológica e Identificação da Toxicidade (AIT) em amostras de água e sedimento do reservatório de Funil, RJ.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade de amostras de água e sedimento (água intersticial) por meio de ensaios ecotoxicológicos, em diferentes períodos amostrais;
- Identificar os compostos ou classes de compostos responsáveis pela toxicidade possivelmente observada, por meio do estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade;
- Obter conhecimento sobre a metodologia e prática na realização dos procedimentos do estudo de AIT;
- Implantar a técnica de AIT no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE – AIT

As análises físicas e químicas convencionais, utilizadas no monitoramento ambiental de corpos aquáticos, não são completamente eficientes para avaliar o impacto ambiental dos poluentes sobre um ecossistema, pois não indicam as substâncias causadoras de efeitos nos organismos e as inertes no ambiente. Portanto, os efeitos causados pelos poluentes só podem ser avaliados pelas indicações dos organismos, através da condução de testes de toxicidade e verificação da presença ou ausência de organismos indicadores no ambiente. Com o aumento da diversidade e complexidade das substâncias liberadas no ambiente, sem o conhecimento dos produtos de suas transformações e interações com outros compostos (aditivas, antagônicas ou sinérgicas), a importância dos testes de toxicidade torna-se evidente (COSTA *et al.*, 2008; MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

A utilização dos estudos ecotoxicológicos encontra-se estabelecida nas legislações vigentes de diversos países. No Brasil, a Resolução Conama 357/05 (BRASIL, 2005) utiliza os ensaios ecotoxicológicos na classificação de corpos d'água. Entretanto, para os sedimentos, como a aplicação de ensaios ecotoxicológicos é recente, a legislação que pode ser seguida é a Resolução Conama 344/04 (BRASIL, 2004), elaborada para a avaliação de material a ser dragado. Estes documentos se baseiam apenas nos efeitos agudos e crônicos, utilizados nos ensaios ecotoxicológicos padronizados com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos (BERTOLETTI e ZAGATTO, 2006).

Os testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos sobre organismos expostos às amostras em curto período de tempo, geralmente 1 a 4 dias, dependendo do organismo-teste, verificando usualmente a mortalidade (peixes) ou um efeito que antecede a mortalidade, como a imobilidade, no caso de invertebrados. Geralmente, os resultados são expressos em termos de CL50 (concentração mediana letal a 50% dos organismos-teste) ou CE50 (concentração mediana efetiva que imobiliza 50% dos organismos-teste) (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Os testes crônicos são utilizados para estimar os efeitos gerados por contaminantes presentes em níveis sub-letais aos organismos, podendo-se avaliar efeitos na sobrevivência, crescimento, reprodução, desenvolvimento de ovos, maturação e/ou comportamento, durante uma fase representativa do ciclo de vida, geralmente os iniciais, os quais são mais críticos. Os

resultados são expressos em CENO (maior concentração que não causa efeito aos organismos-teste), CEO (menor concentração que causa efeito aos organismos), VC (valor crônico), o qual corresponde à média geométrica entre CENO e CEO, ou ainda CI25%, que é a concentração nominal do agente tóxico, que causa redução de 25% na reprodução dos organismos em relação ao controle experimental (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Os estudos ecotoxicológicos são amplamente utilizados visando identificar ambientes aquáticos contaminados e caracterizar os efeitos adversos causados por uma amostra tóxica sobre organismos, porém, muitas vezes não são focados na identificação do composto químico responsável pela toxicidade. Dada a comprovação da toxicidade em amostras ambientais complexas, torna-se de extrema importância a identificação dos compostos ou da classe de compostos responsáveis, assim como a obtenção de evidências sobre as possíveis interações entre substâncias e a biodisponibilidade dos compostos. Com isto, é possível obter subsídios científicos para a tomada de ações de controle e recuperação de ambientes degradados, assim como para o estabelecimento de critérios de qualidade para o sedimento (BOTTA, 2002; MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Nesse sentido, a utilização dos procedimentos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT), do inglês *Toxicity Identification Evaluation – TIE*, tem-se apresentado como uma ferramenta extremamente útil no estabelecimento das causas dos efeitos tóxicos. No procedimento de AIT a amostra líquida fracionada é submetida a uma série de manipulações físicas e químicas, com a finalidade de eliminar ou reter os grupos de compostos tóxicos, seguindo aos testes de toxicidade. Portanto, o processo combina a quantificação e a identificação dos compostos responsáveis pela toxicidade, sendo desenvolvido através de três fases distintas e interligadas (BOTTA, 2002; PIRES, 2006).

A Fase I tem como objetivo caracterizar as substâncias tóxicas através de manipulações físicas e químicas que alteram a biodisponibilidade de substâncias com características similares. Para identificar os compostos, na Fase II, empregam-se métodos de separação e concentração dos componentes da amostra dentro das classes de compostos indicados na Fase I. Na Fase III é realizada a confirmação dos compostos específicos responsáveis pela toxicidade, indicados e identificados nas fases anteriores.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) publicou este método como parte dos protocolos de Avaliação e Redução da Toxicidade – ART (*Toxicity Reduction Evaluation - TRE*), utilizado na avaliação da toxicidade de efluentes industriais, pela necessidade de se atingir os níveis aceitáveis exigidos pela legislação americana (USEPA, 1991a). A ART é um estudo específico realizado em etapas, a fim de identificar os compostos

responsáveis pela toxicidade, suas fontes, avaliar as opções de tratamento e controle, e por fim confirmar sua redução. Deste modo, os resultados da AIT podem ajudar na aplicação de métodos de controle, como substituição de produtos químicos, modificação ou até eliminação de processos em indústrias (USEPA, 2001a).

Estudos posteriores confirmaram a possibilidade de utilização em amostras de águas superficiais (NORBERG-KING *et al.*, 1991), solubilizados de resíduos perigosos (KUEHL *et al.*, 1990, *apud* BOTTA *et al.*, 2006) ), frações aquosas do sedimento e sedimento total (ANKLEY e SCHUBAUER-BERINGAN, 1995; HO *et al.*, 2002).

Visto que os compostos tóxicos presentes nos ambientes aquáticos podem se depositar no sedimento e se associar a partículas, sofrer transformações, serem absorvidos por organismos bentônicos ou liberados para a coluna d'água, a avaliação da toxicidade do compartimento sedimento tornou-se uma prática importante na avaliação da qualidade de ecossistemas aquáticos (ARAÚJO *et al.*, 2006a). Diversos estudos têm demonstrado efeitos agudos e crônicos em sedimento de água doce e marinho para várias espécies (ANKLEY e SCHUBAUER-BERINGAN, 1995). Segundo os autores, apenas a avaliação da toxicidade não é suficiente para ações regulatórias, sendo necessária a identificação dos compostos responsáveis pela mesma.

Visto que a AIT foi desenvolvida para amostras líquidas de efluentes, sua aplicação em sedimentos iniciou-se utilizando a água intersticial como fase líquida (ANKLEY e MOUNT, 1996 *apud* BOTTA, 2002). A água intersticial é a fração líquida mais utilizada, podendo ser utilizado ainda o elutriato, também denominado solubilizado (USEPA, 1991b; ANKLEY e SCHUBAUER-BERINGAN, 1995). Considerando que existem algumas interferências relacionadas com a utilização da água intersticial nos estudos de AIT (HO *et al.*, 2002), alguns estudiosos iniciaram o desenvolvimento desse método com o sedimento total, o qual já se encontra incluído no protocolo da USEPA (2007) e vem sendo utilizado por diversos pesquisadores (HO *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2006, WESTON *et al.*, 2007 *apud* BARBOSA, 2010; PHILLIPS *et al.*, 2009)

A utilização da AIT em amostras de sedimento tem-se limitado à identificação de metais, compostos orgânicos não polares, amônia e ácido sulfídrico (USEPA, 2007), sendo a amônia o contaminante mais freqüentemente encontrado em amostras de sedimento (BOTTA, 2002).

O estudo de Avaliação e Identificação da Toxicidade deve ser incorporado nos programas de controle, monitoramento e gestão dos recursos hídricos, pelos órgãos ambientais, devido à importância da identificação de classes específicas de contaminantes



responsáveis pela toxicidade em um ambiente influenciado por diversas fontes de poluição (BOTTA, 2002). Essa identificação direciona os estudos para os compostos realmente responsáveis pela toxicidade e sua fonte de descarga, permitindo o estabelecimento de programas efetivos de remediação (BURGESS *et al.*, 1995 *apud* NILIN, 2008).

As técnicas de AIT vêm sendo utilizadas em diversos países, com número crescente de trabalhos publicados, destacando-se que a maior parte destes refere-se à identificação de compostos em efluentes industriais. Esta expansão demonstra a aceitação da técnica tanto para o controle de efluentes industriais como a sua adequação a diversos ambientes de estudo, devido à sua eficiência e flexibilidade (PIRES, 2006; BARBOSA, 2010).

### 3.1.1 Fase I – Caracterização

Seguindo as recomendações propostas pela USEPA (1991a), após a confirmação da toxicidade da amostra pelo teste de toxicidade inicial, inicia-se a fase I da AIT, onde manipulações simples são realizadas, alterando a biodisponibilidade dos compostos, para remover ou alterar a sua toxicidade. Testes de toxicidade com organismos aquáticos realizados simultaneamente com a amostra bruta e manipulada podem indicar a natureza das substâncias tóxicas.

As manipulações realizadas nesta fase são: ajuste de pH (pH 3, pH 11); filtração, aeração e extração em coluna de C18 com ajuste de pH; tratamento com tiosulfato de sódio e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e graduação de pH (pH entre 6 e 9). Os princípios gerais de cada etapa seguem descritos resumidamente abaixo, segundo USEPA (1991a). Maiores detalhes podem ser encontrados em BOTTA (2002) e BOTTA *et al.* (2006).

#### a) Ajuste de pH

Na etapa de ajuste de pH, alíquotas da amostra tem o pH alterado para pH 3 e pH 11, retornando ao pH inicial para a condução dos testes de toxicidade. Mudanças no pH podem alterar a solubilidade, polaridade, volatilidade, estabilidade, especiação, biodisponibilidade e com isso a toxicidade, principalmente de ácidos e bases. Muitos compostos orgânicos e inorgânicos podem ser degradados em função da alteração de pH, com consequente perda da

toxicidade. Especialmente em pH 11, pode haver precipitação de compostos metálicos e orgânicos pelo processo de adsorção, levando à perda de toxicidade.

b) Filtração com ajuste de pH

O processo de filtração em filtros de fibra de vidro ou de acetato de celulose fornece informações sobre a presença de compostos tóxicos associados com materiais filtráveis. O grau em que um composto permanece adsorvido ou em solução depende de vários fatores, incluindo, carga e superfície da partícula, polaridade e carga do composto e solubilidade. As alterações de pH influenciam diretamente a solubilidade dos compostos, atuando na formação de compostos metálicos insolúveis, na transformação de ácidos e bases orgânicos da forma iônica para a forma não iônica, na alteração da polaridade dos compostos tóxicos aumentando a força de associação entre o composto tóxico e o particulado, e na destruição ou dissolução das partículas de forma a remover a superfície de adsorção ou mesmo alterar o equilíbrio dissolvido/adsorvido. A redução da toxicidade está associada à remoção dos compostos tóxicos através de precipitação, sorção, mudanças no equilíbrio ou volatilização.

c) Aeração com ajuste de pH

A aeração da amostra tem o objetivo de identificar a toxicidade causada pela presença de compostos voláteis, subláteis ou oxidáveis. É realizada também com ajuste de pH pois diferentes compostos podem ser removidos ou oxidados mais facilmente em diferentes valores de pH. Deve-se diferenciar se os efeitos foram causados pelo borbulhamento, pela oxidação ou sublação. Substituindo-se o ar pelo nitrogênio e repetindo os testes de toxicidade com a amostra, pode-se definir se foi a oxidação ou o borbulhamento a causa da redução de toxicidade. A redução da toxicidade após o borbulhamento com nitrogênio está associada à presença de compostos voláteis. A aeração remove por sublação compostos como resinas ácidas, sabões, detergentes e polímeros de estabilização ou de coagulação utilizados em indústrias químicas. Estes compostos possuem superfícies ativas que se unem na interface líquida/gás das bolhas de ar e nitrogênio, depositando-se nas paredes dos recipientes das amostras. A redução da toxicidade devida a compostos subláteis pode ser confirmada lavando-se as paredes do frasco de aeração com água de diluição ou solvente.

d) Extração em coluna de C18 com ajuste de pH

A extração em coluna de octadecil (C18) tem por objetivo identificar compostos orgânicos e complexos metálicos relativamente não polares. Na passagem pela coluna, os compostos presentes na amostra interagem em função da polaridade e solubilidade com o octadecil e são extraídos da amostra para o sorvente. O ajuste do pH para ácido ou básico permite extrair alguns compostos orgânicos ácidos e básicos que se tornam menos polares e predominantemente não ionizados, os quais serão adsorvidos na coluna. Após a passagem da amostra é necessário fazer a eluição da coluna com metanol ou outro solvente para testes subsequentes caso ocorra redução de toxicidade nesta etapa. Alguns metais também podem ficar retidos pela coluna, porém, para recuperá-los deve-se eluir a coluna com água de diluição em pH 3 ou pH 9, já que os metais geralmente não são eluídos com metanol.

e) Tratamento com tiosulfato de sódio

Os testes com tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), um agente redutor e ao mesmo tempo quelante para alguns metais catiônicos, tem por finalidade identificar a toxicidade devida a compostos oxidantes presentes na amostra, como cloro, ozônio, dióxidos, mono e dicloroaminas, brominas, íons de manganês, iodo e alguns orgânicos hidrofílicos. Frequentemente, estes compostos na forma reduzida tendem a ser menos tóxicos. O tiosulfato de sódio pode formar complexos metálicos com alguns metais catiônicos, tais como o cádmio, o cobre, a prata, o mercúrio e o selênio. O gradiente de concentração de tiosulfato de sódio escolhido deve ser baseado na CL50 do organismo teste, utilizando concentrações menores que esta, para não haver mortalidade associada à toxicidade do tiosulfato.

f) Tratamento com EDTA

O tratamento da amostra com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), um quelante orgânico que forma complexos metálicos relativamente não tóxicos, tem por finalidade detectar a presença de metais como alumínio, bário, cádmio, cobalto, cobre, ferro, chumbo, manganês, níquel, estrôncio e zinco. O EDTA tem baixa especificidade para prata, cromo e tálio e não complexa metais aniônicos. Assim como para o tiosulfato de sódio, o gradiente de concentração de EDTA escolhido deve ser baseado na CL50 do organismo teste, e o aumento

da toxicidade pode estar relacionada com a toxicidade do EDTA. O EDTA também pode reduzir a toxicidade de surfactantes catiônicos, portanto o resultado desta etapa deve ser comparado com os resultados da etapa de aeração. Como o EDTA é um ácido, a acidificação da amostra após a sua adição ( $\text{pH} \leq 4$ ) pode mascarar os resultados caso exista outros contaminantes, como amônia ou sulfeto de hidrogênio, determinando a importância do controle do pH nessa etapa.

#### g) Graduação de pH

Na etapa de graduação de pH, o pH da amostra é ajustado para uma faixa fisiologicamente aceitável para os organismos antes dos testes, de pH 6 a pH 9, com a finalidade de indicar a presença de compostos dependentes do pH, principalmente amônia ( $\text{NH}_3$ ) e sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ). As alterações de pH também podem afetar a toxicidade de muitos pesticidas ionizáveis, e alterar a biodisponibilidade e toxicidade de alguns metais pesados e surfactantes. Em um composto dependente do pH o seu pK permite diferenças na dissociação na faixa de pH fisiologicamente tolerável, (de 6 a 9), e as duas formas do composto (ionizada e não-ionizada) devem causar toxicidade diferenciada aos organismos-teste. No caso da amônia, a forma não ionizada ( $\text{NH}_3$ ), mais tóxica, predomina em pH básico, já no caso do sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), a toxicidade é maior em pH ácido.

#### h) Tratamentos adicionais

Nos casos em que os tratamentos tradicionais acima descritos não forem eficientes na remoção da toxicidade, devem ser realizados tratamentos adicionais e/ou combinados, como combinações dos tratamentos da Fase I, utilização de resinas de troca iônica, carvão ativado e outros ligantes (além do EDTA), descritos com mais detalhes em USEPA (1991a).

### 3.1.2 Fase II – Identificação

A partir dos resultados obtidos na fase I, inicia-se a fase II, com o objetivo de identificar compostos específicos dentre as diferentes classes indicadas na fase I. Os procedimentos da fase II são específicos para cada amostra em função dos resultados

previamente obtidos. A identificação dos compostos é feita através de técnicas analíticas variadas, envolvendo etapas de separação e/ou concentração dos componentes da amostra e testes de recuperação da toxicidade, seguidos de análises específicas (BOTTA *et al.*, 2006).

Conforme o protocolo da fase II da USEPA (1993a), os procedimentos têm-se limitado à identificação de metais, compostos orgânicos não polares, amônia, surfactantes e cloro, que são os contaminantes mais comumente encontrados em efluentes industriais. No caso de compostos orgânicos não polares, é utilizado a Cromatografia Gasosa com detector de massas, com uma análise qualitativa dos compostos. Já para os metais, a identificação é feita utilizando-se Espectroscopia Óptica de Emissão.

### 3.1.3 Fase III – Confirmação

Na fase III, tendo como base os resultados obtidos nas fases anteriores, realizam-se os procedimentos necessários para confirmar os compostos identificados como prováveis causadores da toxicidade. Os procedimentos publicados no protocolo da USEPA (1993b) mais utilizados são resumidos abaixo, conforme descritos por BOTTA *et al.* (2006).

- a) Correlação: Deve-se estabelecer uma correlação entre a toxicidade observada com a toxicidade esperada em função da concentração medida do composto identificado;
- b) Sensibilidade relativa de diferentes espécies indicadoras: São realizados testes de sensibilidade com a amostra e a substância suspeita com pelo menos duas espécies de sensibilidade diferente ao composto. Se as espécies apresentarem diferenças na sensibilidade em relação ao agente suspeito e à amostra com o mesmo padrão, o composto suspeito pode ser considerado verdadeiro;
- c) Observação de sintomas: Comparação de sintomas, como o tempo de mortalidade dos organismos teste expostos ao tóxico suspeito e à amostra;
- d) Balanço de massa: Pode ser utilizado quando a filtração removeu a toxicidade e a extração com solvente e/ou água de diluição em pH 3 recuperou a toxicidade. No caso de compostos orgânicos podem-se realizar separações cromatográficas para fracionar as diferentes classes de compostos identificados. Estas frações são testadas separadamente quanto à toxicidade e a soma destas deve ser comparada com a toxicidade perdida na filtração;

- e) Extração da amostra com resinas de troca iônica: Realiza-se o tratamento da amostra com a resina específica para o composto suspeito. Com a redução da toxicidade após o tratamento, o composto suspeito é confirmado como o responsável pela toxicidade;
- f) Contaminação de amostras de sedimento com o tóxico suspeito e comparação com o teste de toxicidade com a amostra.

### 3.1.4 Utilização do estudo de AIT no Brasil

A avaliação e identificação da toxicidade têm sido realizada em alguns centros de pesquisa no Brasil, a partir do trabalho pioneiro de Bohrer (1993, *apud* PIRES, 2006) na aplicação de AIT para o efluente do Pólo Petroquímico do Sul, RS. Outros estudos desenvolvidos desde então foram aplicados principalmente em amostras de água e sedimento, tanto para ambientes de água doce como marinho.

Badaró-Pedroso (1999, *apud* BARBOSA, 2010) aplicou a AIT em amostras de efluentes de uma indústria petroquímica utilizando espécies de ouriços-do-mar. Os resultados indicaram os compostos orgânicos apolares e a amônia como os principais responsáveis pela toxicidade, e os metais e substâncias associadas ao material particulado como contribuintes em menor proporção. O uso de zeólita e da alga *Ulva lactuca* confirmaram a amônia durante a Fase III.

Botta (2002) realizou o estudo de AIT em amostras de sedimento de três reservatórios do estado de São Paulo (Barra Bonita, Salto Grande e Rasgão), utilizando o solubilizado como fase líquida. O reservatório de Barra Bonita tem como principais formadores os rios Tietê e Piracicaba, recebendo descargas de águas residuárias de núcleos urbanos altamente povoados e industrializados. Nos testes de toxicidade realizados, a redução da toxicidade observada para *C. dubia* na etapa de graduação em pH 6 e pH 8 e no tratamento com EDTA pode estar associada à presença dos metais cobre e/ou chumbo (pH 6) e níquel, zinco e/ou cádmio (pH 8). Portanto, o estudo de AIT indicou os metais como uma das classes de compostos químicos responsáveis pela toxicidade, sendo que essa evidência pode ser confirmada pelas relações entre metais e sulfetos volatilizáveis por acidificação encontradas no estudo.

O reservatório de Salto Grande tem como principal formador o rio Atibaia, recebendo contribuição de resíduos industriais e esgoto doméstico. A toxicidade encontrada no

sedimento foi relacionada aos efeitos fisiológicos da acidez, sendo que para *V. fisheri* – sistema Microtox, os resultados obtidos mostraram que a acidez foi a principal causa da toxicidade. Em pH 9,5 a amostra permaneceu tóxica, sugerindo a presença de amônia, confirmada pelo tratamento com a resina zeólita, que mostrou redução da toxicidade (BOTTA, 2002).

O reservatório de Rasgão, no rio Tietê, tem as principais fontes de contaminação provenientes dos esgotos domésticos e industriais. Os resultados obtidos no estudo de AIT indicaram os compostos ácidos voláteis (ácido sulfídrico), os compostos orgânicos não iônicos e a amônia como possíveis responsáveis pela toxicidade com *V. fisheri* - sistema Microtox e *C. dubia*. Após o tratamento da amostra com a resina zeólita, a amônia foi confirmada como o principal composto responsável pela toxicidade causada para *C. dubia* (BOTTA, 2002).

Estudos ecotoxicológicos foram conduzidos por Pires (2006) para avaliar a qualidade das águas do rio Sarapuí, bacia da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, e dos efluentes líquidos do Pólo Industrial de Belford Roxo, no curso final deste rio, cujas principais atividades são as linhas de produção de poliuretânicos e produtos veterinários. Para a amostra de efluente, os tratamentos convencionais de AIT não apresentaram redução de toxicidade em nenhuma das frações e concentrações testadas com *C. dubia*. Devido à elevada salinidade da amostra, foi introduzido o tratamento com resina de troca iônica. Nos resultados obtidos houve redução de toxicidade com *D. similis* pelos tratamentos de filtração (em pH inicial e 11) e aeração (em pH inicial e 3), indicando toxicidade por sólidos suspensos, sulfeto e íons, com destaque para o tratamento com resina aniônica na redução da toxicidade.

Em novas campanhas, Pires (2006) utilizou uma coluna de troca iônica mista (sequência de colunas catiônica e aniônica), sendo o único tratamento que apresentou redução de toxicidade. A partir destes resultados, a confirmação da salinidade, indicada pelo íon cloreto, (que apresentou maior coeficiente de correlação), como principal causador da toxicidade, foi feita pela comparação das curvas concentração-resposta para *D. similis* das concentrações calculadas do íon no efluente e das concentrações utilizadas no teste de sensibilidade com NaCl. Portanto, verificou-se que o principal efeito tóxico é o desequilíbrio iônico causado pela salinidade, além de efeitos aditivos de outras substâncias encontradas nas amostras.

Para a amostra de água do rio Sarapuí, coletada no ponto de descarte do efluente, os tratamentos de ajuste de pH e filtração e aeração com ajuste de pH (inicial, 3 e 11) apresentaram redução da toxicidade para *D. similis*. Desse modo, estimam-se como principais

agentes tóxicos os sólidos suspensos, amônia e sulfeto, além do fósforo, presente em elevada concentração na amostra. No caso da amostra de água do rio, não pode ser comprovada a eficiência da resina de troca iônica, pois os resultados obtidos são semelhantes aos da amostra filtrada e não submetida à troca iônica (PIRES, 2006).

Buratini *et al.* (2007) aplicaram as manipulações da Fase I e Fase II da AIT em amostras de água superficial do rio Baquirivu-Guaçu, na bacia do Alto Tietê. Para as três amostras estudadas, apenas a extração em coluna C18 reduziu a toxicidade de duas amostras à espécie *C. dubia*, com recuperação da toxicidade no teste com o extrato eluído da coluna, indicando os compostos orgânicos apolares como responsáveis pela toxicidade. Para outra amostra, apenas a adição de EDTA reduziu a toxicidade indicando toxicidade por metais catiônicos, sendo o zinco identificado na Fase II.

Nilin (2008) avaliou a qualidade do sedimento do estuário do rio Ceará, em Fortaleza, Ceará, que recebe efluentes industriais e domésticos, através de ensaios ecotoxicológicos e do estudo de AIT com o elutriato de amostras de quatro pontos do estuário. De forma geral, os elutriatos dos quatro pontos tiveram a toxicidade reduzida para embriões do ouriço do mar *Lytechinus variegatus* após as manipulações de aeração, filtração, adição de EDTA, adição de tiosulfato de sódio e *Ulva sp.*, indicando que os responsáveis pela toxicidade são a amônia, metais, compostos oxidáveis, voláteis e particulados. A aplicação de correlação linear e a análise dos componentes principais entre os parâmetros abióticos, metais e toxicidade não evidenciou correlação significativa dos metais pesquisados (Cu, Cr, Pb e Zn), fração de finos e de areia, carbonatos e matéria orgânica com a toxicidade nos testes, sugerindo que outros contaminantes são os responsáveis. Apesar dos resultados não serem conclusivos, pode-se observar que diversas classes químicas são responsáveis pela toxicidade no estuário.

Barbosa (2010) aplicou a Fase I em amostras de água e sedimento de nascentes na bacia do rio Mogi-Guaçu, município de Bom Repouso, MG, em ensaios crônicos com *C. dubia*. Para a amostra de água, a graduação em pH 7 e o tratamento com tiosulfato de sódio (10 mg.L<sup>-1</sup>) reduziram a toxicidade. O sedimento foi analisado a partir do elutriato, apresentando redução de toxicidade na graduação em pH 7 e pH 9 e na extração em coluna C18, porém sem recuperação no teste com o elutriato. O autor atribuiu os efeitos a um conjunto de fatores, como baixo pH e dureza da amostra de água além de outras substâncias, evidenciadas pelo teste de referência realizado. Para o sedimento, o *stress* dos organismos e a presença de substâncias orgânicas foram apontados como responsáveis pela toxicidade.



## 3.2 ÁREA DE ESTUDO

### 3.2.1 Bacia do Rio Paraíba do Sul

A bacia do rio Paraíba do Sul (Figura 1), situada na região sudeste do Brasil, ocupa uma área de aproximadamente 55.500 km<sup>2</sup>, formada pelos estados de São Paulo (13.900 km<sup>2</sup>), Rio de Janeiro (20.900 km<sup>2</sup>) e Minas Gerais (20.700 km<sup>2</sup>). No Rio de Janeiro, a bacia abrange 63% da área total do estado, enquanto em São Paulo e Minas Gerais, é de apenas 5% e 4%, respectivamente. (CEIVAP, 2010).

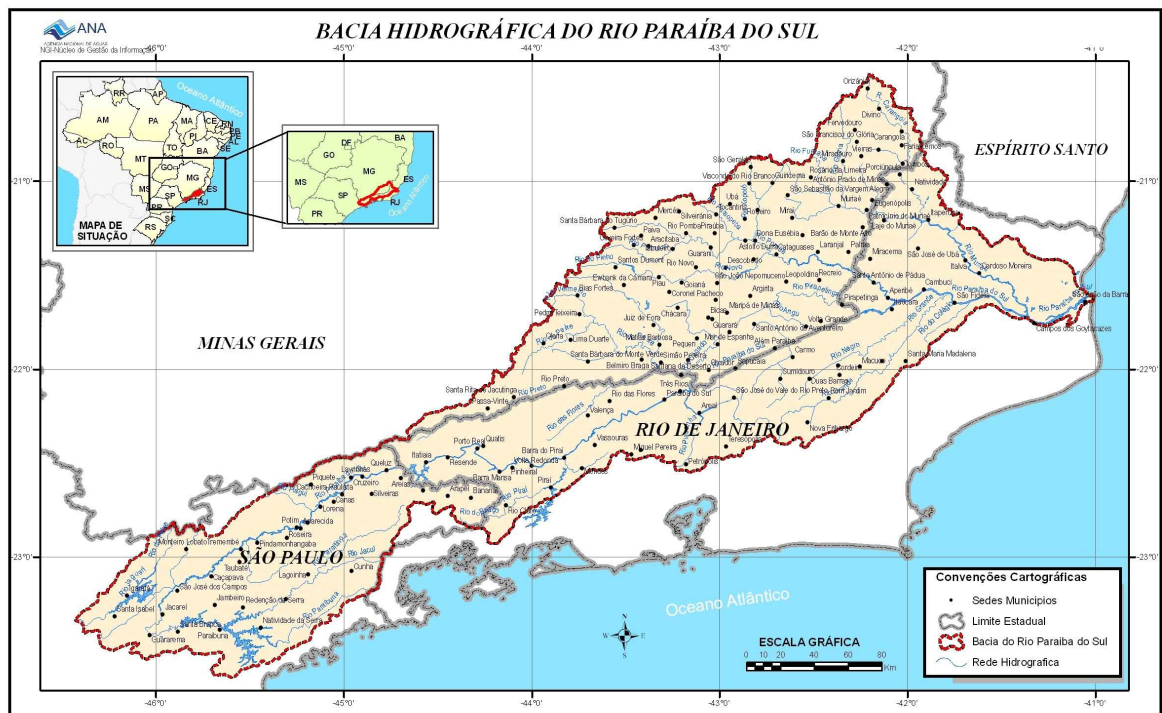


Figura 1 - Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (CEIVAP, 2010).

Aproximadamente 14,2 milhões de pessoas se abastecem das águas provenientes desta bacia. Os principais usos da água são para abastecimento, despejo de esgotos, irrigação e geração de energia hidroelétrica, ocorrendo em menor escala a pesca, aquicultura, recreação, navegação, e outros. (Fundação COPPETEC, 2001 *apud* CEIVAP, 2010).

A bacia abrange 180 municípios, sendo 39 no estado de São Paulo, 53 no Rio de Janeiro e 88 em Minas Gerais. Cerca de 90% dos municípios não possuem estação de tratamento de esgotos, despejando por dia aproximadamente 1 bilhão de litros de esgoto sem

tratamento nos rios. Das 300 toneladas de DBO por dia que atingem a bacia, 86% são provenientes de efluentes domésticos e apenas 14% são de origem industrial. Além dos problemas gerados pela descarga de efluentes nos rios, outras ações de grande impacto negativo somam-se na degradação da qualidade ambiental da bacia. Dentre elas destacam-se a disposição inadequada do lixo, o desmatamento indiscriminado, a retirada de recursos minerais para a construção civil, o uso não controlado de agrotóxicos, a extração abusiva de areia, a ocupação desordenada do solo, a pesca predatória, entre outros (CEIVAP, 2010).

Por esses motivos, a qualidade de água do rio Paraíba do Sul vai se deteriorando ao longo de seu percurso. As usinas hidroelétricas construídas em diversos pontos da bacia foram responsáveis pela alteração na hidrodinâmica deste rio, e com o intenso aporte de nutrientes e contaminantes intenso, ocorrem sérios problemas de contaminação e eutrofização das águas dos reservatórios, reduzindo a biodiversidade aquática e facilitando o acúmulo de sedimentos (ALERJ, 2005).

### **3.2.2 Reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil**

O Reservatório da Usina Hidrelétrica de Funil (22° 30'S e 44° 45'W), administrada pela concessionária Eletrobrás Furnas, é a primeira barragem do rio Paraíba do Sul em área fluminense, conforme Figura 2, localizado entre os municípios de Itatiaia e Resende. Sua construção foi finalizada em 1969, com a função principal de gerar energia elétrica, mas é também responsável por regularizar a vazão do rio, atenuando o impacto de cheias nas cidades à jusante, além da grande importância para o sistema elétrico por estar localizada próxima aos grandes centros consumidores (FURNAS, 2010).

Com uma potência de 216 MW, o reservatório possui uma área inundada de 40 km<sup>2</sup>, 16.800 km<sup>2</sup> de bacia de drenagem, sendo a maior parte situada em território paulista, profundidade média de 22 m, com máxima de 70 m no corpo central e tempo de residência entre 10 e 50 dias (ROCHA *et al.*, 2002).

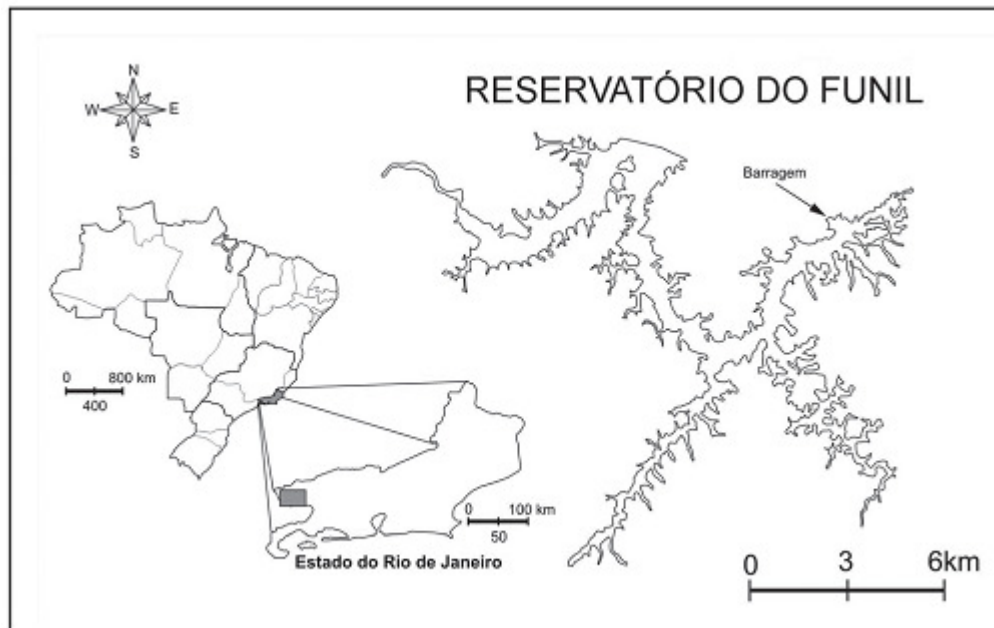


Figura 2 - Localização do Reservatório da UHE de Funil (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b).

Observa-se, atualmente, pouca cobertura vegetal em torno do reservatório, com grande área ocupada por pastagens, destacando a pecuária extensiva como a principal atividade econômica local. Também ocorre o cultivo de eucaliptos, como auxiliar no controle da erosão, mas não tão eficiente como a cobertura florestal original, de mata atlântica (FIGUEREDO, 2002). Sua bacia de drenagem também possui reduzida cobertura vegetal, devido à expansão do plantio de café na região, e atualmente, por pastagens, o que intensifica os processos erosivos na região (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b). Porém, segundo Figueredo (2002), o principal aporte de partículas em suspensão no reservatório é proveniente do rio Paraíba do Sul, e não das margens do reservatório, além do lixo trazido por este rio.

Pelo fato da maior parte da bacia de drenagem do reservatório pertencer ao estado de São Paulo, a qualidade da água sofre grande influência das atividades desenvolvidas a montante. O tipo de ocupação da bacia hidrográfica, com crescimento da população e dos setores industrial e agrícola, são os principais fatores de degradação da qualidade da água (INEA, 2010). A maior carga poluidora é proveniente do trecho paulista da bacia, uma região altamente urbanizada e de diversificado parque industrial, com indústrias de grande porte e potencial poluidor, existindo 19 indústrias químicas, 26 metalúrgicas e siderúrgicas, 5 indústrias de material elétrico e eletrônico, 1 petroquímica, 3 de papel e celulose, dentre outras alimentícias e têxteis (PRIMO, 2006).

O reservatório de Funil atua como um decantador natural de material em suspensão e, conseqüentemente, de outras substâncias potencialmente tóxicas, melhorando a qualidade da água do rio Paraíba do Sul a jusante do reservatório (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b;

FIGUEREDO, 2002; INEA, 2010). Cerca de 70 a 80% da carga de sólidos em suspensão transportada pelo rio Paraíba do Sul é acumulada no reservatório, sendo a maior parte depositada no seu trecho inicial (ALERJ, 2006).

Diversos estudos demonstram a presença de metais pesados em elevadas concentrações na bacia do rio Paraíba do Sul (AZCUE *et al.*, 1987) e no reservatório de Funil (ALERJ, 2005; 2006).

Estes dados foram confirmados recentemente por Primo (2006). O autor identificou arsênio, níquel e chumbo em doze pontos de amostragem da bacia (montante, jusante e no reservatório) e alumínio, cromo e ferro na maioria desses pontos apresentando concentrações na água acima do máximo permitido pela Conama 357/05 para águas de classe II, onde se enquadra o rio Paraíba do Sul. A maioria dos elementos estudados (Al, As, Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb) apresentou concentrações nas amostras de água a montante do reservatório superior às verificadas a jusante, e as maiores concentrações de Al, As, Cd, Fe, e Pb no sedimento foram verificadas em alguns pontos onde a concentração desses elementos eram menores na água, mostrando mais uma vez a função de decantador do reservatório. O autor identificou também a presença de arsênio, cádmio, cromo e chumbo no sedimento em quase todos os pontos estudados, sendo o ferro o elemento que apresentou as maiores concentrações.

Como consequência da poluição proveniente do rio Paraíba, e o grande aporte de nutrientes, o reservatório de Funil sofre um processo crescente de degradação e eutrofização artificial em toda sua extensão, levando-o à classificação na categoria de hipereutrófico (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b). Portanto, o reservatório possui as condições ambientais adequadas ao desenvolvimento de florações de cianobactérias, dentre elas as potencialmente produtoras de cianotoxinas. A Figura 3 ilustra uma floração de cianobactérias ocorrida neste reservatório em janeiro de 2010.



Figura 3 - Floração de cianobactérias no reservatório de Funil em 12/01/2010 (Autora).

Estudos realizados pela Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (FEEMA) no fim da década de 1970 demonstraram baixa produtividade primária e concentração de fósforo, com dominância de algas verdes (FEEMA, 1987 *apud* FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b). Os estudos realizados entre 1987 e 1991 demonstraram alta concentração de fósforo e dominância de cianobactérias (FEEMA, 1989 *apud* FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b). Um estudo posterior realizado por Bobeda (1993, *apud* Rocha *et al.*, 2002) verificou a presença constante da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, com florações capazes de produzir toxinas (microcistinas).

O Instituto Estadual do Ambiente do Rio de Janeiro – Inea realiza levantamentos de dados sobre a comunidade fitoplantônica no reservatório de Funil. Os resultados demonstram a dominância de cianobactérias, que chegam a atingir níveis de abundância relativa acima de 90% no verão, com dominância de *Microcystis aeruginosa flos-aquae*, *Microcystis sp.* e *Oscillatoria*, formando intensas florações (INEA, 2010). A distribuição espacial das florações pode até ser mapeada por imagens de satélite coincidentes com episódios de alta concentração de clorofila-a, onde a composição colorida resulta em coloração verde da água do reservatório (NOVO *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Branco *et al.* (2002) e Rocha *et al.* (2002) durante o ano de 1995, Ferrão-Filho *et al.* (2009b) entre 2002 e 2006, e Rosa (2008), verificaram que a comunidade zooplantônica possui dominância de copépodos, seguido por rotíferos e cladóceros. Segundo os autores, as espécies presentes são geralmente encontradas em reservatórios eutróficos brasileiros, podendo atuar como indicadores do grau de trofia destes, onde as florações de cianobactérias podem alterar a estrutura da comunidade zooplantônica.

Um amplo estudo realizado por Ferrão-Filho *et al.* (2009b) no período de junho de 2002 a março de 2006 no reservatório de Funil, mostrou uma tendência no aumento da densidade de cianobactérias, sendo *Anabaena circinalis*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis* spp. os principais táxons encontrados, as quais são potencialmente produtoras de microcistinas (hepatotoxinas) e saxitoxinas (neurotoxinas). Também foram observados efeitos tóxicos em cladóceros, além de elevadas concentrações de toxinas no zooplâncton.

Ferrão-Filho *et al.* (2008) observaram o efeito nos cladóceros *D. pulex* e *M. micrura*, caracterizado pela paralisia total dos movimentos natatórios em função da presença de saxitoxina, produzida por cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas do reservatório de Funil. Os organismos foram expostos a diferentes concentrações celulares da referida cianobactéria. O mesmo efeito foi observado nos ensaios com água bruta, no qual por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), detectou-se, além de saxitoxina, a

presença de microcistina. Em outro trabalho, Ferrão-Filho *et al.* (2009a) utilizaram duas espécies de zooplâncton, *Daphnia gessneri* e *Moina micrura*, em testes agudos e crônicos com amostra da água do reservatório de Funil em diversas diluições. Os resultados mostraram efeitos adversos como mortalidade, paralisia, e reduzida taxa de crescimento populacional, sendo relacionados com a presença de toxinas de cianobactérias, principalmente microcistina e saxitoxina.

A perda da qualidade ambiental do Reservatório de Funil, conseqüente dos diversos impactos antrópicos na bacia do rio Paraíba do Sul é um fato preocupante, visto que este ambiente possui as condições favoráveis ao desenvolvimento de florações de cianobactérias, potencialmente produtoras de toxinas. Visando atender aos usos múltiplos dos reservatórios, faz-se necessário um estudo amplo, através de levantamento, integração e análise de dados, identificação das fontes dos principais poluentes e monitoramento, facilitando a elaboração de medidas mitigadoras eficientes para a gestão da bacia deste reservatório.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas das amostras de água e sedimento foram realizadas em abril e outubro de 2010 e em janeiro de 2011, em dois pontos de amostragem, indicados na Figura 4. O primeiro ponto (P1) situa-se próximo à barragem, nas coordenadas 22°31'42" S 44°33'49" W, e o segundo ponto (P2), ao longo do corpo do reservatório, com coordenadas 22°33'50" S 44°35'37" W.

Os pontos foram escolhidos com base em: dados de toxicidade da água superficial deste reservatório, observados em amostras coletadas próximo à barragem (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009a); dados da literatura que indicam que as partículas mais finas do sedimento, que apresentam maior grau de adsorção das moléculas de pesticidas, bifenilas policloradas e metais, se depositam próximo à barragem (CALHEIROS, 1993; BORGLIN *et al.*, 1996); nos pontos do monitoramento realizado por Furnas no reservatório, com intuito de facilitar as coletas, as quais foram realizadas com a ajuda dos funcionários de Furnas, nos mesmos dias de coleta estabelecidos para o monitoramento da empresa.

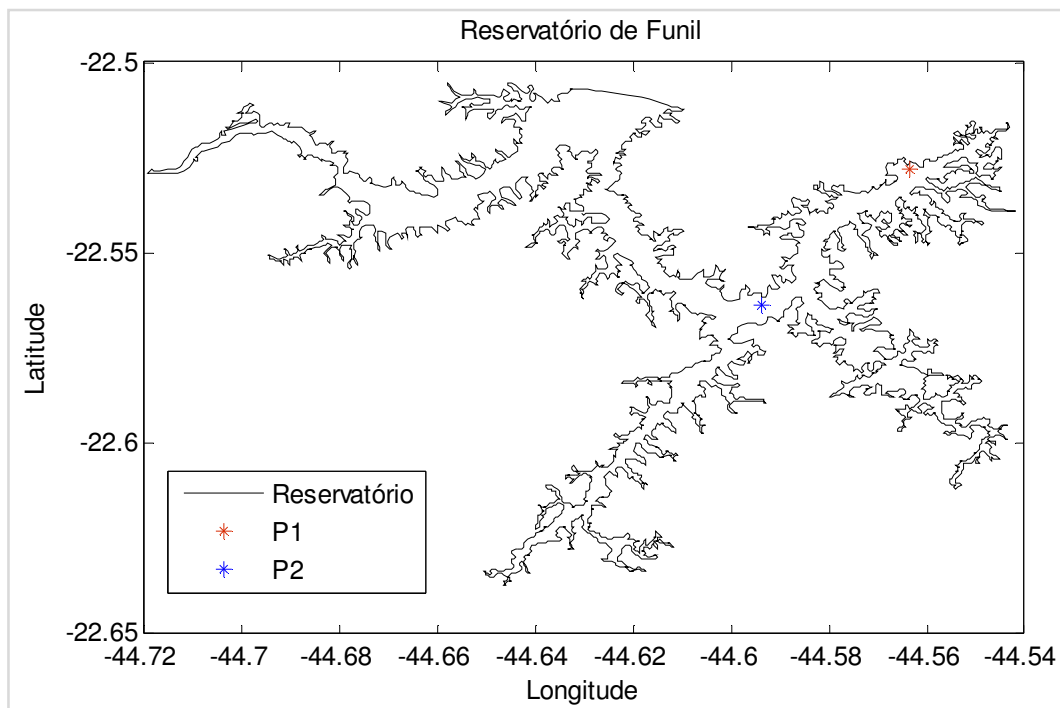


Figura 4 - Pontos de amostragem. P1 próximo à barragem e P2 no corpo do reservatório.

As amostras de água foram coletadas a 1 metro da superfície, com uma garrafa de Van Dorn e transferidas para galões de 10 litros previamente lavados e identificados.

Para as amostras de sedimento utilizou-se uma draga de Petersen. Para cada ponto de coleta foram realizadas 10 dragadas, possibilitando a obtenção de volume de sedimento suficiente para a extração da água intersticial, determinação do teor de matéria orgânica e granulometria. As amostras de sedimento coletadas foram dispostas em bandeja plástica, homogêneas e acondicionadas em sacos plásticos não tóxicos.

Imediatamente, as amostras de água e sedimento foram dispostas em caixa de isopor com gelo, e transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI, onde foram armazenadas a 4°C. Na segunda e terceira coletas, as amostras de sedimento foram congeladas.

Na primeira coleta, as amostras mantidas em gelo foram enviadas para o Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada – CRHEA, da USP de São Carlos. A primeira etapa deste trabalho foi realizada no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia Aquática da referida instituição, com a finalidade de aprendizado da técnica de AIT, através do acompanhamento da Profa. Dra. Clarice M. Rispoli Botta, co-orientadora da presente dissertação, possibilitando a realização das etapas posteriores no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI.

#### 4.2 CULTIVO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE

As espécies utilizadas nos experimentos foram os cladóceros *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Tanto no laboratório do CRHEA/USP como no da UNIFEI, os organismos são cultivados de acordo com as recomendações das normas brasileiras da ABNT (NBR 12713:2009; NBR 13373:2005), com água de fonte natural, sendo a dureza de 40 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, pH entre 7,0 e 7,6, condutividade elétrica aproximada de 160 µS.cm<sup>-1</sup> e oxigênio dissolvido entre 7,5 e 8,0 mg.L<sup>-1</sup>. Os cristalizadores são mantidos em estufa incubadora a 23°C ± 2 e fotoperíodo de 12 horas. A troca de água do cultivo é realizada a cada dois dias, sendo utilizado como alimento uma concentração de 10<sup>5</sup> cels.ml<sup>-1</sup> da clorófitica *Pseudokirchneriella subcapitata*, e um composto preparado com ração para peixe fermentada e levedura a 1 ml.L<sup>-1</sup>.



Para avaliar o estado de saúde dos organismos foram realizados testes de sensibilidade com substâncias de referência (ZAGATTO, 2006) de acordo com os procedimentos descritos pela NBR 12713 (ABNT, 2009). No laboratório do CRHEA/USP, os testes de toxicidade aguda para avaliação da sensibilidade das culturas de *D. similis* e *C. silvestrii* são feitos mensalmente com solução de cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl), respectivamente. No laboratório da UNIFEI, utiliza-se cloreto de sódio (NaCl) para ambas as espécies. A CE50 48 h foi calculada através do método estatístico Trimmed Spearman – Karber (HAMILTON *et al.*, 1977), compondo os dados que geram a carta-controle (ZAGATTO, 2006).

#### 4.3 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS AMOSTRAS

A quantificação dos teores de nutrientes (Série do Nitrogênio e Fósforo), sólidos totais e dissolvidos e clorofila das amostras de água dos dois pontos amostrais foi realizada por FURNAS, dentro da rotina do Sistema de Monitoramento Limnológico da Qualidade da Água desta empresa. Com estes dados, determinou-se o Índice do Estado Trófico (IET) do reservatório, considerando o teor de fósforo total e clorofila-a, conforme CETESB (2011).

Para a quantificação das frações texturais realizou-se a análise granulométrica, utilizando-se o Método da Pipeta desenvolvido pela EMBRAPA (1997). Na 1ª coleta esta análise foi realizada apenas para a amostra de P1, e na 2ª e 3ª para os dois pontos.

As porcentagens de matéria orgânica e inorgânica dos sedimentos foram obtidas através do método de incineração (APHA – Standard Methods, 1992). Esta análise foi realizada na 1ª coleta apenas para P1 e na 2ª coleta para os dois pontos. As análises acima mencionadas foram realizadas no Laboratório de Solos da UNIFEI.

A presença e concentração de metais totais na amostra de sedimento de P1 da 1ª coleta foram analisadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, pelo método 3050B, através de digestão ácida, proposto pela USEPA (1996).

Com o uso dos aparelhos descritos entre parênteses, os parâmetros pH (CRHEA: Micronal B374; UNIFEI: Digimed DM - 20), oxigênio dissolvido (CRHEA: YSI 55-25 FT; UNIFEI: Handylab OX1/set) e condutividade (CRHEA: Orion 145 Plus; UNIFEI: Alfa Mare

mcA 150) foram determinados no início e fim dos ensaios. A dureza foi determinada somente no início, através de titulação.

#### 4.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE INICIAIS

##### 4.4.1 Amostras de água

Em todas as coletas, os ensaios de ecotoxicidade iniciais foram realizados com as amostras dos dois pontos (P1 e P2, Figura 4), sendo que nos ensaios de toxicidade aguda foi utilizada a espécie *D. similis* e nos ensaios de toxicidade crônica a espécie *C. silvestrii*, conforme NBR 12713 e NBR 13373 (ABNT, 2009; 2005), respectivamente. Optou-se por iniciar os ensaios de toxicidade crônica no mesmo dia dos ensaios de toxicidade aguda, para obtenção da resposta crônica em menor intervalo de tempo, caso as amostras não apresentassem efeito agudo para *D. similis*. Na 2ª e 3ª amostragens, os ensaios foram iniciados no mesmo dia da coleta. Na 2ª coleta, realizou-se o ensaio de toxicidade crônica apenas com a amostra de P2.

Nos ensaios de toxicidade aguda foram utilizadas 4 réplicas de 10 ml com 5 organismos em cada, além do controle, com leitura dos ensaios após 48 horas. Para os ensaios de toxicidade crônica foram utilizadas 10 réplicas de 15 ml contendo 1 organismo em cada, além do controle. A troca das águas foi realizada a cada 2 dias, quando era feita a contagem dos neonatos e a alimentação.

##### 4.4.2 Amostras de água intersticial do sedimento

A toxicidade do sedimento foi avaliada utilizando-se a água intersticial como fase líquida. Na primeira amostragem, para os ensaios de toxicidade inicial, uma pequena alíquota das amostras de sedimento dos dois pontos (P1 e P2) foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm (centrífuga FANEM 204/NR), seguindo-se imediatamente à montagem dos ensaios. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda conforme NBR 12713 (ABNT, 2009) com *D.*

*similis* e *C. silvestrii*, utilizando 4 réplicas de 10 ml com 5 organismos em cada, sem diluição das amostras, além do controle, e leitura após 48 horas.

Posteriormente, a amostra de P1 foi centrifugada em centrífuga refrigerada (MLW K26) por 30 minutos a 5000 rpm, no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. A água intersticial obtida foi mantida refrigerada até o início das manipulações do método de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT).

Na segunda amostragem, a extração da água intersticial das amostras dos dois pontos foi feita por congelamento e descongelamento, seguida de centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (JOUAN CR4i), no Laboratório da Escola de Engenharia de Lorena – USP. A água intersticial obtida foi mantida refrigerada até a realização dos ensaios iniciais. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* e de toxicidade crônica com *C. silvestrii*, conforme NBR 12713 e NBR 13373 (ABNT, 2009; 2005), respectivamente, como descrito para as amostras de água.

Na terceira amostragem, pequenas alíquotas das amostras de P1 e P2 foram centrifugadas por 30 minutos a 5000 rpm, em centrífuga refrigerada (MEGAFUGE 16R), no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI, seguindo-se imediatamente à montagem dos ensaios de toxicidade iniciais. Foram realizados apenas ensaios agudos com *D. similis* conforme NBR 12713 (ABNT, 2009), sendo 4 réplicas de 10 ml com 5 organismos em cada, sem diluição das amostras, além do controle.

#### 4.5 AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT)

Tanto para as amostras de água como para o sedimento, os procedimentos realizados nas etapas da Fase I com a amostra e o branco (água de cultivo submetida aos mesmos procedimentos) seguiram as recomendações da USEPA (1991a; 2007), utilizando a espécie *D. similis*, sendo descritos a seguir e apresentados na forma de fluxograma nas Figuras 5, 6 e 7.

Também foram utilizados os controles, ou seja, ensaios somente com a água de cultivo, para checar a qualidade dos organismos-teste, da água e das condições de teste em todos os dias em que se iniciaram novos ensaios de toxicidade com a amostra manipulada. Foram feitas 4 réplicas de 10 ml com 5 organismos cada.

### 4.5.1 Amostra de água

Nos três períodos amostrais realizados, os experimentos de AIT foram conduzidos com a amostra de água de P2, a qual apresentou toxicidade aguda a *D. similis* no ensaio de toxicidade inicial, o que não ocorreu com a amostra de P1, que foi tóxica apenas na 3ª coleta. Os procedimentos realizados seguem descritos a seguir, e o fluxograma com as etapas é apresentado nas Figuras 5 e 6.

Na primeira amostragem, para otimizar o tempo de análise, optou-se por realizar inicialmente as etapas de filtração, aeração e extração em coluna de C18 apenas com a amostra em pH inicial, tendo em vista que a etapa de ajuste de pH pode reduzir a toxicidade, tornando desnecessário as demais manipulações com ajuste de pH. Nas demais coletas, realizou-se junto com as demais etapas a filtração, aeração e extração em coluna de C18 com ajuste em pH 3 e pH 11.

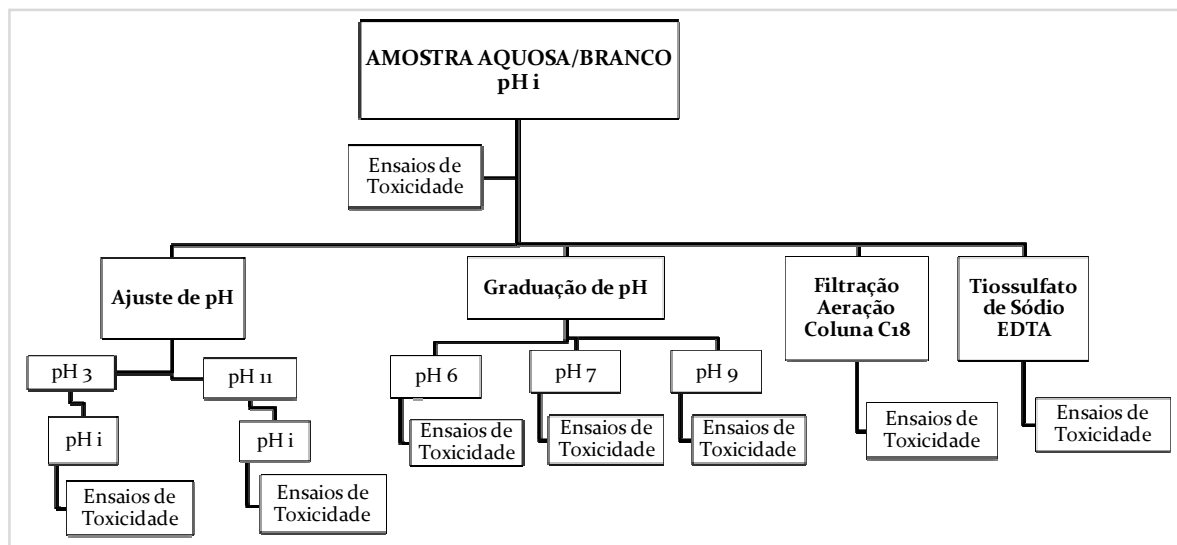


Figura 5- Etapas da Fase I realizadas na 1ª campanha com a amostra de água de P2.

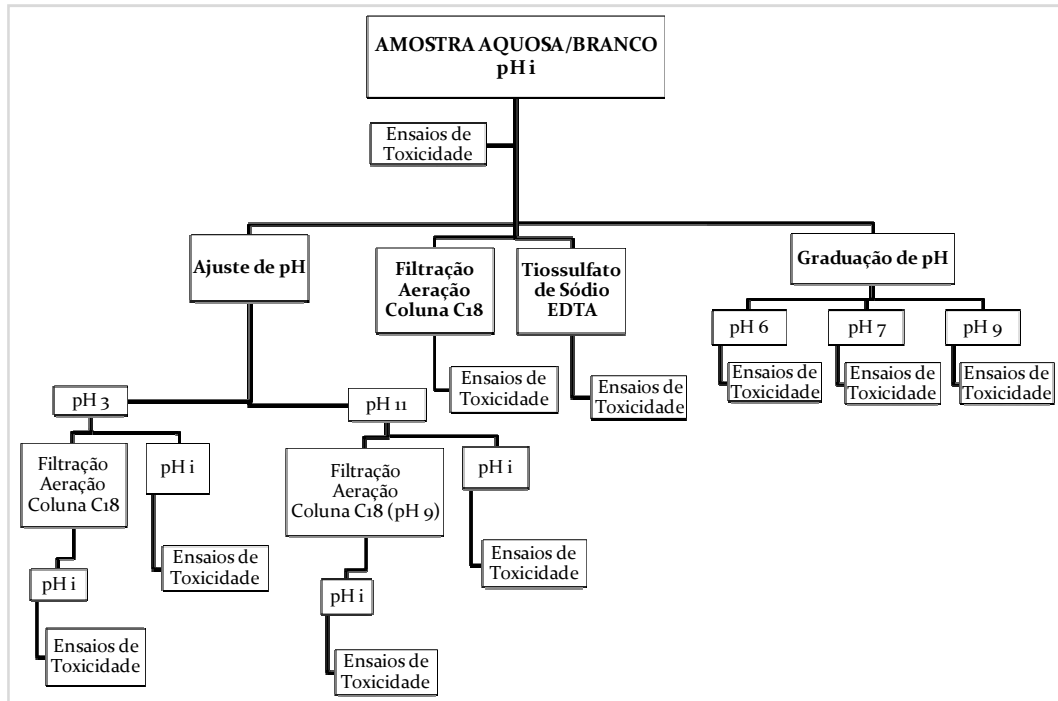


Figura 6 - Etapas da Fase I realizadas na 2ª e 3ª campanhas com a amostra de água de P2.

a) Teste base

A amostra sem manipulação foi testada nos dias em que se iniciou algum tratamento da amostra, com intuito de verificar a presença de toxicidade em comparação com o ensaio inicial e com os efeitos das diferentes etapas na toxicidade. Foram feitas 4 réplicas de 10 ml com 5 organismos cada, com a amostra em 100%, 50% e 25%, utilizando a água de cultivo para a diluição. As citadas réplicas e diluições também foram utilizadas nas demais etapas de AIT. Apenas na 2ª campanha não foi feita diluição da amostra tratada.

b) Ajuste de pH

Os ajustes de pH para os valores requeridos nessa etapa, pH 3 e pH 11, foram realizados com adição de solução de ácido clorídrico (HCl 1N e 0,1N) e de hidróxido de sódio (NaOH 1N e 0,1N), respectivamente, a 80 ml (1ª coleta) e 500 ml (2ª e 3ª coletas) de amostra e água de cultivo (brancos) sob agitação constante. Decorrido 4 horas as amostras foram reajustadas ao pH inicial e submetidas aos ensaios. Cuidou-se para que o volume final de ácido/base utilizado no ajuste inicial e no retorno para o pH inicial não ultrapassasse 10% do volume total da amostra. Foram feitas 3 réplicas de 10 ml com 5 organismos cada, sendo esse mesmo número de réplicas utilizado nas demais etapas de AIT.

Na primeira amostragem, como os ensaios em pH 11 com a amostra diluída em 50 e 25% apresentaram toxicidade, esta etapa foi repetida para verificar possível contaminação durante o tratamento. Para a 2ª e 3ª coletas também foi feito o ajuste para pH 9 (250 ml), para utilização na etapa de extração em coluna C18.

c) Graduação de pH

Os acertos de pH para os valores requeridos, pH 6 e pH 9, foram realizados com adição de solução de ácido clorídrico (HCl 1N e 0,1N) e de hidróxido de sódio (NaOH 1N e 0,1N), respectivamente, a 80 ml de amostra sob agitação constante. Seguiu-se imediatamente à montagem dos ensaios. Neste caso, foi usada a água de cultivo em pH 6 e pH 9 para a diluição da amostra em 50% e 25%, a fim de não alterar o valor de pH do teste.

d) Filtração em pH inicial/pH 3/pH 11

Alíquotas de 300 ml de amostra e água de cultivo foram filtradas a vácuo em membrana de acetato de celulose (Sartorius Stedim Biotech) com 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro. As membranas foram previamente lavadas com água ultra pura (50 ml) e em seguida filtrou-se a água de cultivo e a amostra. Do total de amostra filtrada, 200 ml foram separadas para a etapa de extração em coluna C18 e o restante foi utilizado nos ensaios de toxicidade desta etapa. O filtro foi guardado em geladeira embrulhado em papel alumínio.

Na primeira campanha, para o teste de recuperação de toxicidade procedeu-se a sonificação do filtro por 1 hora com água de diluição, em aparelho de banho de ultrassom (Ultrasonic 1440, Odontobrás). O filtro foi cortado ao meio, sendo uma metade usada com água de diluição em pH inicial e a outra metade com a água em pH 3, para possível identificação de metais, retornando ao pH inicial para exposição aos organismos.

e) Aeração em pH inicial/pH 3/pH 11

Alíquotas de 80 ml de amostra e água de cultivo foram colocadas em béqueres de 100 ml, mantidos sob aeração moderada durante 1 hora através de uma pipeta Pasteur presa a uma mangueira de silicone ligada a um aerador moderado. Na retirada da amostra do béquer utilizou-se uma pipeta, a fim de evitar contaminação da amostra com os possíveis compostos aderidos na parede do recipiente.

Após a aeração, para a realização do teste de recuperação de toxicidade, a parede do béquer foi lavada vigorosamente com 20 ml de água de cultivo, seguindo-se ao ensaio de toxicidade com esta água. Na primeira campanha, a aeração foi repetida para a realização deste ensaio.

f) Extração em coluna de C18 em pH inicial/pH 3/pH 9

O procedimento de extração em coluna C18 envolve uma etapa inicial de condicionamento da coluna. Iniciou-se passando 10 ml de metanol seguido de 15 ml de água ultra pura pela coluna (AccuBond SPE ODS-C18 500 mg, 3 ml), que são descartados. Em seguida, passou-se 70 ml de água de diluição, descartando os 20 ml iniciais, e os 200 ml da amostra filtrada, descartando os 25 ml iniciais. Tomou-se o cuidado de não deixar a coluna secar entre as passagens de metanol, água ultra-pura, água de diluição e amostra. Após a passagem da amostra, a coluna já seca foi eluída com 2 ml de metanol (extrato 100x mais concentrado), seguindo-se ao ensaio de recuperação da toxicidade com o eluído. De forma a manter a concentração do solvente abaixo do valor de CE50 para o organismo-teste, colocou-se 150 µl do eluído para 10 ml de água de diluição.

g) Tratamento com EDTA e Tiosulfato de Sódio:

A escolha das concentrações de EDTA e tiosulfato de sódio foi baseada nos valores de CE50 destes compostos para o organismo-teste, previamente determinados. Os ensaios foram realizados com cinco concentrações diferentes de EDTA/tiosulfato, adicionados a amostra e água de cultivo, correspondentes a 1x, 0,8x, 0,6x, 0,4x e 0,2x o valor da CE50. Para tanto, a partir de uma solução estoque de 1,2 g.L<sup>-1</sup> de EDTA e 10 g.L<sup>-1</sup> de tiosulfato de sódio foi adicionado aos recipientes do teste 1; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 ml de solução, sendo completado para 10 ml com a amostra pura, correspondendo a concentrações de 1; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 g.L<sup>-1</sup> de tiosulfato de sódio, e 0,12; 0,096; 0,072; 0,048; 0,024 g.L<sup>-1</sup> de EDTA. O mesmo foi feito para a água de diluição. Como a reação de complexação não é imediata, as amostras ficaram em contato com o EDTA/tiosulfato por 2 horas antes de iniciar os ensaios de toxicidade.

#### 4.5.2 Amostra de água intersticial do sedimento

O estudo de AIT para o sedimento só foi realizado com a amostra da primeira coleta, pois as demais não apresentaram toxicidade aos organismos nos ensaios iniciais.

Os experimentos de AIT foram realizados com a água intersticial da amostra de sedimento do ponto P1, o qual apresentou toxicidade aguda a *D. similis* maior que a causada pela amostra do ponto P2 no teste de toxicidade inicial.

Assim como feito com a amostra de água, optou-se por realizar inicialmente as etapas de filtração, aeração e extração em coluna de C18 apenas com a amostra em pH inicial. As etapas realizadas são apresentadas no fluxograma da Figura 7.

Seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, foram realizados os testes base, as etapas de graduação de pH e filtração em pH inicial no mesmo dia da extração da água intersticial. No dia seguinte, repetiu-se o teste base e seguiu-se as etapas de ajuste de pH (pH 3 e 11), aeração e extração em coluna de C18 em pH inicial. Em todos os casos foram utilizadas 3 réplicas de 10 ml com 5 organismos cada, com a amostra em 100%, 50% e 25%, sendo usada a água de cultivo para diluição.

No terceiro dia de manipulação da amostra, seguiu-se a realização das etapas de filtração, aeração e extração em coluna de C18 com a amostra ajustada para pH 3, retornando-se ao pH inicial para exposição dos organismos após os tratamentos e realizou-se também os testes de recuperação de toxicidade para cada etapa. A leitura destes ensaios foi realizada em 24 horas, visto que desde o ensaio inicial, a amostra apresentou toxicidade aguda em 24 horas.



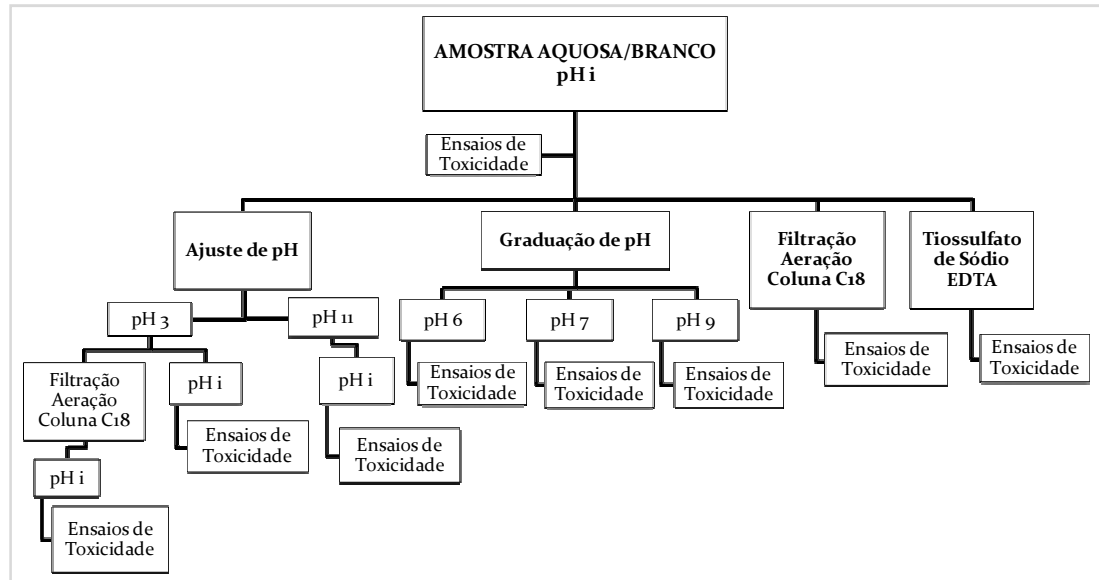


Figura 7 - Etapas da Fase I realizadas na 1ª campanha com a água intersticial da amostra de sedimento de P1.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa TOXSTAT 3.4. Para verificar diferenças estatisticamente significativas dos resultados entre as amostras e o tratamento controle, quanto à sobrevivência nos ensaios de toxicidade aguda e crônica utilizou-se o método Fisher's Exact Test. Para os ensaios de toxicidade crônica também foi verificada a normalidade dos dados de reprodução pelo teste Chi-quadrado, seguido do teste de homogeneidade (Hartley para mais de uma amostra e F para uma amostra). Para dados normais e homogêneos seguiu-se à análise de variância pelo teste t, e para os não homogêneos e/ou não normal, seguiu-se ao teste não-paramétrico Steel Many One (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONTROLE DE QUALIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE

Para se controlar a qualidade das culturas mantidas em laboratório devem-se realizar mensalmente testes de toxicidade aguda com uma substância de referência, estabelecendo a faixa de sensibilidade do organismo a esta substância. Estes testes de sensibilidade avaliam as condições fisiológicas, ou a saúde dos organismos, portanto devem ser utilizadas para testes somente as culturas que apresentarem valores de CE50 dentro da faixa de sensibilidade estabelecida (ZAGATTO, 2006).

Para os organismos mantidos no CRHEA/USP, os resultados obtidos nos testes de sensibilidade de *D. similis* e *C. silvestrii*, mostraram que as culturas estão sendo mantidas em condições uniformes ao longo do tempo (Apêndice A - Figuras 15 e 16). Os valores de CE50 obtidos mensalmente estiveram dentro das faixas de sensibilidade já estabelecidas para cada organismo, sendo a média de 514,8 (433 - 596) mg.L<sup>-1</sup> de KCl para *D. similis* e 1,44 (1,05 - 1,82) g.L<sup>-1</sup> de NaCl para *C. silvestrii*.

As cartas controle (Apêndice A - Figuras 17 e 18) dos organismos cultivados na UNIFEI foram obtidas considerando apenas os testes de sensibilidade realizados no período em que foi realizado este trabalho. A CE50 média para *D. similis* foi de 1,83 (1,58 - 2,08) g.L<sup>-1</sup> de NaCl. Para *C. silvestrii*, a CE50 média foi de 1,30 (0,92 - 1,68) g.L<sup>-1</sup> de NaCl.

### 5.2 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DAS AMOSTRAS

Os resultados, de interesse neste trabalho, da análise química das amostras de água da primeira amostragem, fornecido por FURNAS, segue apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise química das amostras de água obtidas nos dois pontos amostrais (P1 e P2) do reservatório de Funil em abril/2010.

	<b>NH<sub>4</sub> (µg/L)</b>	<b>P<sub>Total</sub> (µg/L)</b>	<b>Clorofila-a (µg/L)</b>
<b>P1</b>	Não detectado	19,0	5,1
<b>P2</b>	Não detectado	24,0	5,7

O IET foi calculado pela média do Índice do Estado Trófico para o fósforo total – IET (PT) e o Índice do Estado Trófico para a clorofila-a – IET (CL), de acordo com CETESB (2011), obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Índice do Estado Trófico e grau de trofia do reservatório de Funil no mês de abril/2010.

	<b>IET (PT)</b>	<b>IET (CL)</b>	<b>IET</b>	<b>Categoria (Estado Trófico)</b>
<b>P1</b>	52,31	54,75	53,53	Mesotrófico
<b>P2</b>	53,72	55,24	54,48	Mesotrófico

Verifica-se que neste caso, o reservatório se enquadra no grau mesotrófico, diferindo dos dados da literatura que classificam o reservatório como hipereutrófico. Isso pode ser justificado pela data em que foi realizada a coleta, representativa do período chuvoso, o qual possibilita maior dissolução dos nutrientes na água e com isso as baixas concentrações de fósforo e clorofila-a resultam em menor IET.

Conforme apresentado na Tabela 3, o resultado da análise granulométrica das amostras de sedimento de P1 e P2 mostrou predominância das frações mais finas. Na média, de acordo com o Diagrama Triangular utilizado pela EMBRAPA (1997), este sedimento classifica-se na classe textural argilosa, o que implica numa maior possibilidade de adsorção de contaminantes.

Tabela 3 - Teores médios de areia, silte e argila das amostras de sedimento dos dois pontos amostrais (P1 e P2) do reservatório de Funil.

<b>Amostra</b>	<b>P1</b>			<b>P2</b>			
	<b>Fração (%)</b>	<b>Areia</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>	<b>Areia</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>
<b>1ª coleta</b>		0,18	68,02	31,80	--	--	--
<b>2ª coleta</b>		0,22	33,44	66,33	0,19	35,14	64,67
<b>3ª coleta</b>		23,00	29,00	48,00	18,00	26,00	56,00

--: análise não realizada.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 4, o teor de matéria orgânica obtido classifica este sedimento como orgânico, pois apresenta concentração de matéria orgânica superior a 10%, segundo Ungemach (1960 *apud* ESTEVES, 1988). De forma geral,

sedimentos orgânicos acumulam grande quantidade de nutrientes, que neste caso, pode ser em sua maioria, proveniente de esgotos domésticos, atividades agrícolas e de fontes industriais.

Tabela 4 - Porcentagem de matéria orgânica das amostras de sedimento dos dois pontos amostrais (P1 e P2) do reservatório de Funil.

Amostra	Matéria Orgânica (%)	
	P1	P2
1ª coleta	13	--
2ª coleta	13	14

--: análise não realizada.

É de grande importância a determinação das variáveis acima descritas quando se avalia a toxicidade de sedimentos devido às correlações existentes entre o tamanho de grão, a matéria orgânica e a distribuição de metais e compostos orgânicos não iônicos no sedimento (BOTTA, 2002). Segundo Förstner (1990, *apud* BOTTA, 2002) os metais pesados associam-se preferencialmente às frações finas do sedimento, através de processos de adsorção e complexação.

Conforme a Tabela 5, a presença de metais no sedimento foi verificada pelo resultado obtido na análise de metais realizada na amostra de sedimento de P1 da primeira campanha.

Tabela 5 - Concentração de metais totais encontrados na amostra de sedimento do ponto amostral (P1) próximo à barragem do reservatório de Funil.

Metal	Al	Fe	Mn	Pb	Cu	Ni	Zn
<b>Concentração (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	13601,9	18151,7	526,1	25,6	57,8	17,1	31,3

A Resolução Conama 344/04 (BRASIL, 2004) estabelece os níveis de classificação do material a ser dragado, os quais podem ser utilizados como valores orientadores para qualidade de sedimento. A Tabela 6 apresenta apenas os valores estabelecidos pela norma, dos metais que foram identificados na amostra de sedimento do reservatório de Funil. Ao se comparar os valores das Tabelas 5 e 6, verifica-se que todos os elementos encontram-se abaixo do nível 1, com exceção apenas do cobre (Cu), que está entre os dois níveis. Porém, é necessário analisar esses resultados junto com resultados de análise de metais biodisponíveis para obter uma conclusão mais realista a respeito dos efeitos sobre a biota.

Tabela 6 – Níveis de classificação estabelecidos pela Conama 344/04 (BRASIL, 2004) dos metais encontrados na amostra do sedimento do reservatório de Funil.

<b>Metais pesados</b>	<b>Pb</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>	<b>Zn</b>
<b>Nível 1<sup>a</sup> (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	35,0	35,7	18,0	123,0
<b>Nível 2<sup>b</sup> (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	91,3	197,0	35,9	315,0

a: Nível 1: limiar abaixo do qual se prevê baixa probabilidade de efeitos adversos à biota.

b: Nível 2: limiar acima do qual se prevê um provável efeito adverso à biota.

Primo (2006) determinou, em dois períodos amostrais, a presença de diversos metais em seis pontos de coleta no reservatório de Funil, verificando que o chumbo esteve presente abaixo do nível 1 no início do reservatório apenas na época de chuva; variando entre 1 e 2 e acima do nível 2 ao logo deste; e acima do nível 2 próximo à barragem nas estações chuvosa e seca. O níquel sempre esteve abaixo do nível 1 em todos os pontos de coleta, com exceção do ponto próximo à barragem, no período chuvoso, onde esteve entre os níveis 1 e 2. Quanto aos elementos não previstos na norma, nos dois períodos amostrais e no ponto próximo à barragem, o alumínio e o ferro apresentaram valores acima dos obtidos neste trabalho, enquanto o manganês apresentou valores bem menores. O autor verificou ainda o papel decantador do reservatório em relação aos metais.

### 5.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE INICIAIS

#### 5.3.1 Amostras de água

Os testes de toxicidade iniciais, realizados com as amostras de água dos dois pontos de amostragem, sem diluição, comprovaram o potencial tóxico do ambiente em estudo em todos os meses avaliados. Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda estão apresentados na Figura 8, em % de imobilidade.

De acordo com a análise estatística (teste de Fisher,  $p = 0,05$ ), para as amostras da 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> campanhas, somente o ponto P2 apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle (água de cultivo), indicando que essa amostra causou efeito agudo. No entanto, na 3<sup>a</sup> campanha os dois pontos se apresentaram tóxicos. Este resultado levou à utilização da amostra de P2 para a AIT em todas as amostragens.

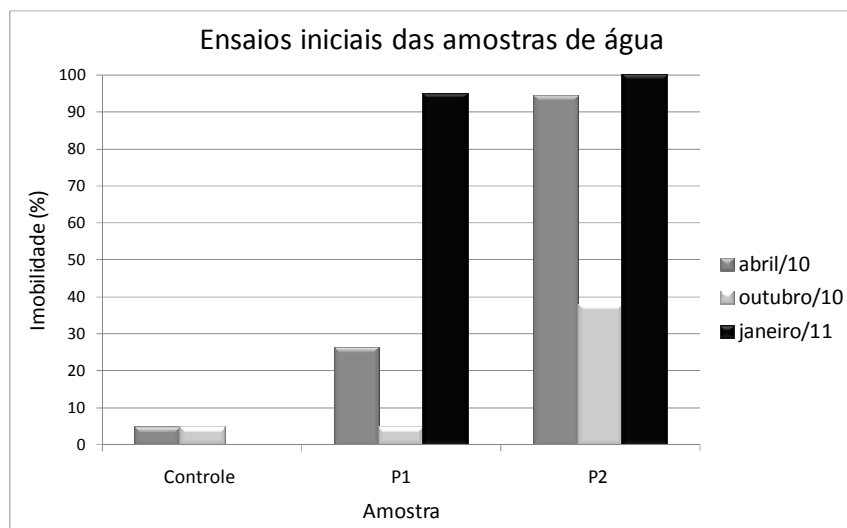


Figura 8 - Imobilidade de *D. similis* expostas às amostras de água dos pontos P1 e P2 do reservatório de Funil após exposição aguda.

A Tabela 7 apresenta os dados de sobrevivência e número de neonatas obtidos nos ensaios de toxicidade crônica. O resultado da 1ª amostragem indicou que nenhuma das amostras apresentou efeito crônico à espécie *C. silvestrii*, o mesmo ocorrendo com a amostra de P2 da 2ª coleta. Pela análise estatística, nestes meses não houve diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência e fecundidade entre os organismos expostos às amostras e ao tratamento controle. Na 3ª coleta, a amostra de P1 causou mortalidade de 80% dos organismos em apenas 3 dias de exposição, e a de P2 40%. Decorridos 6 dias, todos os organismos expostos às amostras estavam mortos, indicando diferença significativa na sobrevivência.

Tabela 7 - Sobrevivência e número de neonatas de *C. silvestrii* expostas às amostras de água de P1 e P2 em teste de toxicidade crônica.

Amostra	Sobrevivência (%)			Número de neonatas		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
<b>Controle</b>	90	100	100	28	264	15
<b>P1</b>	70	--	0*	49	--	0
<b>P2</b>	70	100	0*	37	325	0

\*: diferença estatisticamente significativa segundo o teste de Fisher ( $p = 0,05$ ).

--: ensaio não realizado.

Observa-se que as amostras foram capazes de causar efeito agudo em *D. similis*, mas não causou efeito crônico em *C. silvestrii*, o que indica que esta foi mais resistente à presença de cianobactérias presentes nas amostras de água do reservatório. Efeito contrário foi obtido por Sotero-Santos *et al.* (2006) ao investigarem os efeitos de extratos de cianobactérias tóxicas do reservatório de Barra Bonita, SP, sobre estes mesmos organismos, sendo *C.*

*silvestrii* mais sensível em ensaio agudo. Segundo Chistoffersen (1996), a concentração de toxina capaz de afetar um organismo depende da toxicidade da célula da cianobactéria, da eficiência de assimilação e sensibilidade do organismo, sendo que o efeito pode ser muito variável entre as espécies.

### 5.3.2 Amostras de água intersticial do sedimento

Por meio dos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis*, utilizando-se amostras de água intersticial como fase líquida do sedimento, a toxicidade do sedimento foi comprovada apenas para a primeira amostra. Para os demais períodos, as amostras não causaram efeito agudo para a espécie utilizada.

Conforme a Figura 9, a amostra coletada próximo à barragem (P1) apresentou efeito tóxico maior aos organismos-testes do que a amostra de P2. A resposta tóxica foi comprovada em apenas 24 horas de teste. De acordo com a análise estatística (teste de Fisher,  $p = 0,05$ ), os dois pontos causaram efeito agudo, apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparadas com os organismos do tratamento controle. O ensaio de toxicidade aguda realizado com *C. silvestrii* não pode ser considerado, pois apesar das amostras dos dois pontos causarem mortalidade a todos os organismos expostos, houve mortalidade de 60% dos organismos do controle, invalidando o ensaio com esta espécie.

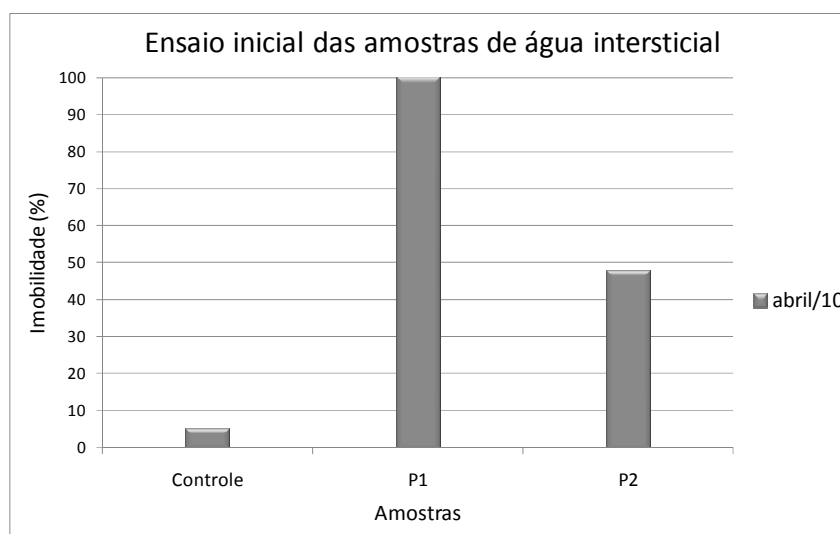


Figura 9 - Imobilidade de *D. similis* expostas às amostras de água intersticial de P1 e P2 em ensaios de toxicidade aguda.

Para a amostra da 2ª coleta, após verificar a ausência de toxicidade aguda, realizou-se o ensaio de toxicidade crônica (Tabela 8). Segundo a análise estatística, a amostra de P2 apresentou-se tóxica à espécie *C. silvestrii*, afetando seu ciclo de vida, o que foi representado pela menor reprodução dos organismos expostos a esta amostra. Não foi possível realizar o ensaio de toxicidade crônica com a amostra da 3ª coleta.

Tabela 8 - Sobrevivência e número de neonatas de *C. silvestrii* expostas às amostras de água intersticial de P1 e P2 em ensaio de toxicidade crônica em outubro/2010.

<b>Amostra</b>	<b>% de sobrevivência</b>	<b>Número de neonatas</b>
<b>Controle</b>	100	235
<b>P1</b>	90	189
<b>P2</b>	80	160*

\*: diferença estatisticamente significativa segundo o teste Steel Many One ( $p = 0,05$ ).

O congelamento da amostra de sedimento também é usado como método de extração de água intersticial (COSTA, 2008; HJORTH, 2004), que pode ser utilizado quando não é possível realizar as análises imediatamente após a coleta (HJORTH, 2004), pois o descongelamento libera a água intersticial, ficando por cima do sedimento.

Segundo Geffard *et al.* (2004), muitos autores tem estudado os efeitos do método e tempo de armazenamento do sedimento, obtendo-se resultados muito diferentes e poucos determinam os motivos dessa variação. Alguns pesquisadores encontraram aumento de toxicidade gerada pelo congelamento da amostra (JUNG e BATLEY, 2004) e longo período de armazenamento (GEFFARD *et al.* 2004), enquanto outros detectam redução decorrente do congelamento (SCHUYTEMA *et al.*, 1989). De acordo com o manual de coleta e armazenamento de sedimento da USEPA (2001b), o congelamento altera a estrutura do sedimento, o que pode alterar a biodisponibilidade dos contaminantes presentes, sendo que o congelamento pode ser usado para algumas análises químicas de metais e orgânicos.

USEPA (2001b) recomenda que as amostras de sedimento devam ser testadas quanto à toxicidade no máximo duas semanas após a coleta, a menos que se conheçam as características do ambiente em estudo. Sedimentos contaminados com compostos instáveis como amônia e orgânicos voláteis, podem ter sua toxicidade reduzida devido à perda destes compostos pelo longo período de armazenamento.

Neste trabalho, a amostra de sedimento da 2ª campanha foi testada quanto à toxicidade três semanas após a coleta, enquanto a amostra da 3ª campanha foi testada cinco semanas após a coleta. Portanto, o fato das amostras de sedimento da 2ª e 3ª coletas não causarem



toxicidade aguda à espécie testada pode ser decorrente do congelamento das amostras e do período de armazenamento, visto que a amostra da 1ª coleta foi testada 1 semana após sua coleta. É importante ponderar que a ausência de toxicidade pode ser decorrente das características dos compostos tóxicos provavelmente presentes no sedimento, que podem perder a toxicidade independentemente do tempo e forma de armazenamento.

## 5.4 AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA TOXICIDADE (AIT)

### 5.4.1 Amostra de água

Os estudos de AIT foram conduzidos com as amostras de P2, as quais se apresentaram tóxicas a *D. similis* nos testes iniciais na 1ª e 2ª campanhas, o que não ocorreu com a de P1.

Os resultados dos ensaios de toxicidade aguda com *D. similis* antes (teste base) e após as etapas da fase I do estudo de AIT realizadas com a amostra de P2 obtida na 1ª coleta estão apresentadas na Figura 10, considerando apenas os resultados da amostra em 100%. As etapas de filtração, aeração e extração em coluna foram realizadas apenas em pH inicial. Para o tratamento com Tiosulfato de sódio, consideraram-se nesta figura apenas as concentrações que reduziram a toxicidade (0,4 e 0,2 x CE50).

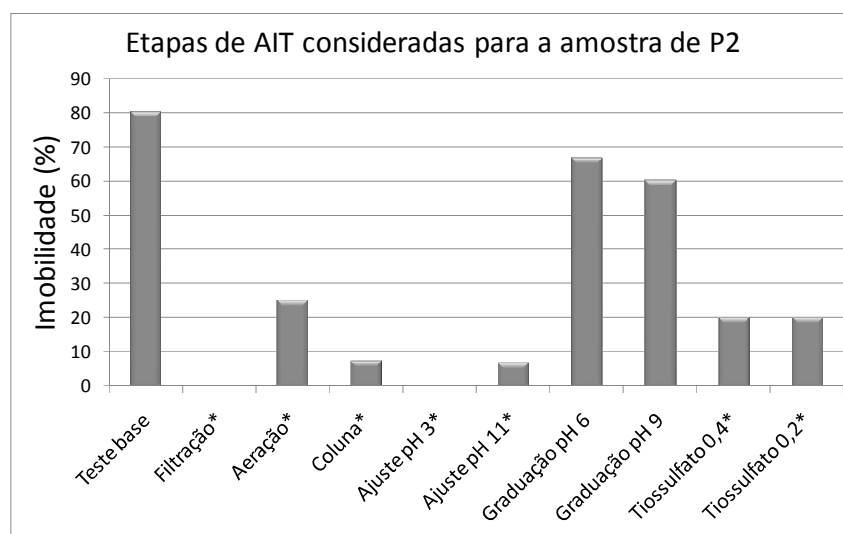


Figura 10 - Imobilidade de *D. similis* expostas aos tratamentos de AIT em ensaios de toxicidade aguda para a amostra de água do ponto P2 do reservatório de Funil.

\*: etapas com redução de toxicidade, segundo o teste de Fisher ( $p = 0,05$ ).

No teste base, a amostra pura causou imobilidade a 80% dos organismos, verificando-se uma pequena redução da toxicidade quando comparada com o ensaio inicial (Figura 8). A CE50 obtida para o teste base foi de 51,73 (33,46 – 79,98) %.

Não houve redução significativa de toxicidade pela etapa de graduação de pH, tanto em pH 6 como em pH 9, descartando a possibilidade de ser a amônia ou o sulfeto os responsáveis pelo efeito tóxico. Esse resultado foi confirmado pela análise química, que não detectou presença de amônia nas amostras dos dois pontos de coleta. A etapa de graduação de pH foi a única em que foi possível o cálculo das CE50, as quais foram de 73,84 (49,11 – 111,02) % e de 88,36 (68,18 – 114,50) % para o pH 6 e o pH 9, respectivamente. Deste modo, pode-se observar que a diluição da amostra nestes casos resulta em redução da toxicidade, pela diminuição da concentração dos compostos tóxicos, independente do pH.

O tratamento com EDTA não pode ser considerado, pois apresentou mortalidade em todas as concentrações utilizadas, inclusive no branco, indicando toxicidade causada pelo EDTA. Já o tiosulfato de sódio causou efeito tóxico nas três maiores concentrações utilizadas. Resultado semelhante foi encontrado por Barbosa (2010), que trabalhou com amostras de água e sedimento de nascentes em ensaios crônicos com *C. dubia*. Para a amostra de água, o tratamento com EDTA a 3,0 mg.L<sup>-1</sup> e 8,0 mg.L<sup>-1</sup> causou a morte de 40% e 60% dos organismos, respectivamente, apresentando também efeito tóxico no branco dos ensaios com elutriato do sedimento. Já o tiosulfato de sódio a 25 mg.L<sup>-1</sup> gerou toxicidade na amostra de elutriato do sedimento e no branco.

Estes resultados indicam que novos testes com EDTA e tiosulfato de sódio devem ser realizados para determinação da CE50, CENO e CEO dos organismos utilizados nestes ensaios ecotoxicológicos, pois os valores utilizados são baseados em dados da literatura e deve-se considerar que existem diferenças de sensibilidade entre os organismos-teste.

Os resultados da fase I indicaram redução da toxicidade nos procedimentos de ajustes de pH 3 e 11 (compostos ácidos e básicos); filtração (sólidos filtráveis, compostos voláteis, metais); aeração (compostos voláteis, oxidáveis, subláveis); coluna C18 (compostos orgânicos apolares, compostos orgânicos voláteis); e tiosulfato de sódio (compostos oxidantes, metais).

A redução do efeito tóxico nas etapas de ajuste de pH 3 e pH 11, que a princípio não deve alterar a toxicidade, confirmou a hipótese de que a etapa de ajuste de pH pode fornecer evidências de compostos tóxicos pH dependentes (USEPA, 1991a), o que tornou desnecessário as demais manipulações com ajuste de pH, visto que a redução de toxicidade não seria devida às etapas e sim à alteração de pH. De acordo com os demais resultados, a redução da toxicidade em pH 3 e pH 11 pode ser devida a reações irreversíveis, como a

degradação ou volatilização do(s) composto(s) tóxico(s), pois diversos compostos orgânicos e inorgânicos podem ser degradados em função da alteração do pH gerando compostos não tóxicos (USEPA, 1991a).

A redução de toxicidade pela etapa de aeração indica a presença de compostos voláteis, oxidáveis ou subláveis. Esta redução simultânea com as etapas de filtração e tratamento com tiosulfato de sódio poderiam confirmar a presença de compostos voláteis e oxidáveis, respectivamente. O tiosulfato de sódio, além de indicar compostos oxidáveis pode indicar também a presença de alguns metais, o que também pode ser indicado pela filtração e pelo ajuste de pH 11. A presença de metais na água do reservatório já foi verificada por diversos pesquisadores, mas não pode ser confirmada neste estudo pelo resultado obtido no tratamento com EDTA e por não ter sido realizada a análise de metais.

Foram realizados os ensaios de recuperação de toxicidade do filtro, através de sonificação do filtro com água de cultivo em pH inicial e pH 3, para verificar a possível presença de metais aderidos ao material em suspensão (USEPA, 1991a). Porém, estes ensaios não recuperaram a toxicidade, o que descarta a hipótese de presença de metais ou compostos tóxicos associados às partículas filtráveis. A perda de toxicidade nas etapas de aeração e filtração pode indicar presença de compostos voláteis, mas isso só poderia ter sido confirmado se tivesse sido possível a realização da etapa de aeração com nitrogênio.

Mesmo com a redução de toxicidade após o tratamento com a coluna C18 (Figura 10), não houve recuperação da toxicidade nos ensaios com o extrato de metanol eluído da coluna. Como esta etapa foi realizada com a amostra previamente filtrada, o efeito de redução de toxicidade pode ser devido à filtração e não pela retenção da coluna, o que também pode justificar a não recuperação pelo eluído. Resultado semelhante foi obtido por Schubauer-Berigan e Ankley (1991), onde a filtração reduziu metade da toxicidade, incluindo a toxicidade devida a compostos orgânicos apolares e metais.

Ankley *et al.* (1990), estudaram o comportamento de diversos tipos de surfactantes submetidos ao estudo de AIT, verificando que a extração em coluna de C18 é eficiente na remoção destes compostos, porém a recuperação através de eluição com soluções de metanol e água não é possível para surfactantes catiônicos, somente para aniônicos e não iônicos. Este estudo também demonstrou que a toxicidade de surfactantes pode ser reduzida através de aeração, por sublação, e de filtração, associado à matéria particulada, e mais uma vez a recuperação da toxicidade só é possível para alguns tipos de surfactantes. Portanto, devido aos resultados encontrados de redução de toxicidade pelas etapas de extração coluna, aeração e

filtração, e às características do ambiente em estudo, a presença de surfactantes pode ser considerada.

Verificada a redução de toxicidade pela etapa de aeração, esta foi repetida para realização do ensaio de recuperação da toxicidade, visando avaliar a presença de compostos sublúteis. Porém, houve mortalidade no branco, indicando contaminação durante o procedimento, sendo que a imobilidade da amostra tratada foi maior que a do teste base.

Não foi possível o prosseguimento das demais fases do estudo de AIT, pois não houve recuperação da toxicidade pelo filtro nem pelo eluído da coluna, impossibilitando a realização da fase II. Visto que a amostra perdeu a toxicidade, não foi possível realizar novos ensaios confirmatórios. Conforme ilustrado na Figura 11, a imobilidade no teste base do segundo dia de manipulação da amostra foi reduzida para 20% dos organismos, indicando que a amostra perdeu a toxicidade, visto que no ensaio inicial apresentou 94% e no teste base (1) das primeiras manipulações 80% de organismos imóveis. Esse fato evidencia a indicação de toxicidade por voláteis e oxidáveis, indicadas na aeração, filtração e adição de tiosulfato.

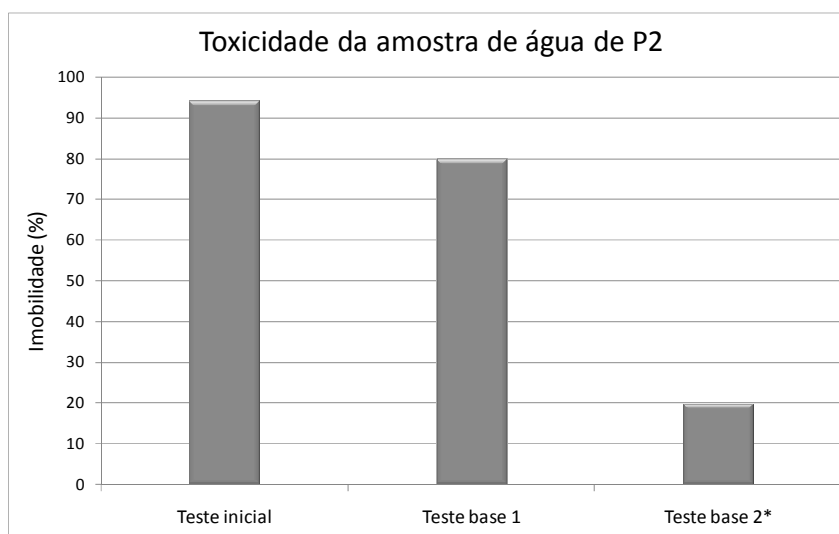


Figura 11 - Imobilidade de *D. similis* expostas às amostras do ponto P2 do reservatório de Funil em testes bases de toxicidade aguda.

\*: amostra não tóxica, segundo o teste de Fisher ( $p = 0,05$ ).

Para a amostra da 2ª coleta realizou-se os procedimentos de AIT no terceiro dia após a coleta das amostras, pois se esperou a leitura em 48 horas do ensaio inicial. Somente a amostra de P2 apresentou diferença estatisticamente significativa na sobrevivência em relação ao controle, mostrando-se tóxica, e por isso utilizada na AIT. Optou-se por realizar todas as etapas da Fase I, inclusive com ajuste de pH na filtração, aeração e extração em coluna C18, visto que a amostra do período anterior perdeu a toxicidade após uma semana. Porém, na

leitura final dos ensaios verificou-se que a amostra já havia perdido a toxicidade, pois não houve mortalidade no teste base. Desta forma, esta amostragem não forneceu dados conclusivos para a AIT.

As amostras de água de P1 e P2 da 3ª coleta causaram toxicidade aguda a *D. similis* em apenas 24 horas de ensaio. Assim como nas outras duas amostragens, realizou-se a AIT com a amostra de P2, para melhor concordância dos dados. Porém, só foi possível a realização dos procedimentos de AIT uma semana após a amostragem, optando-se por realizar todas as etapas da Fase I, assim como feito para a amostra de outubro. Na leitura final dos ensaios, o teste base apresentou pequena toxicidade em relação ao controle, porém em relação ao ensaio inicial, a amostra havia perdido a toxicidade. Nos resultados da AIT, todas as etapas reduziram a toxicidade, o que pode ter sido causado pela volatilização, oxidação ou degradação do composto tóxico durante as manipulações da amostra, e não pelos efeitos de cada etapa sobre a toxicidade da amostra, o que concorda com os resultados das amostras anteriores.

Em um estudo de AIT realizado com água intersticial e com o elutriato do sedimento amostrado do reservatório de Rasgão, Araújo *et al.* (2006b) verificaram a perda de toxicidade a *Vibrio fischeri*, após o armazenamento da amostra por três dias. Para verificar que a toxicidade era devida a compostos orgânicos, amostras de água intersticial recém extraída e armazenadas por três dias foram submetidas à análise cromatográfica, a qual demonstrou um decréscimo na quantidade de compostos orgânicos na amostra armazenada. Segundo USEPA (2001a), a complexidade do estudo de AIT aumenta à medida que a persistência, magnitude e frequência da toxicidade das amostras diminuem.

Ferrão-Filho *et al.* (2009a; 2009b) realizaram ensaios de toxicidade aguda e crônica em cladóceros nativos, com amostras de água do Reservatório de Funil de novembro de 2002 a outubro de 2003, observando predominantemente efeitos agudos nos meses mais quentes e crônicos nos mais frios. Os autores relacionaram os efeitos observados aos mecanismos de ação das cianotoxinas produzidas pelas espécies de cianobactérias encontradas. Porém, em alguns meses (janeiro e abril de 2003) nenhum efeito foi observado, sendo que em um mês (setembro de 2003) houve efeito positivo na reprodução de *Moina micrura*. Os autores justificaram como sendo devido ao grande tamanho das colônias de *Microcystis* (>100 µm), impossibilitando de serem ingeridas pelos cladóceros, e ao aporte de água carreando nutrientes ao reservatório.

Ferrão-Filho *et al.* (2008) observaram redução na atividade da enzima acetilcolinesterase em cladóceros expostos a amostra de água do Reservatório de Funil,

porém, devido ao grande tamanho dos filamentos de *Anabaena* encontrados, os autores acreditam que este efeito não foi causado apenas pela ação de anatoxina-a(s). Outros compostos capazes de agir sobre esta enzima, como organofosforados e carbamatos poderiam estar presentes na água do reservatório (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009b).

Segundo Molica e Azevedo (2009), devido à existência de cepas tóxicas e não tóxicas em uma mesma espécie de cianobactéria, as florações em um corpo d'água podem ser tóxicas apenas em um período do ano, mês ou semana, podendo variar a toxicidade ou deixarem de ser tóxicas. Ainda não foi determinada qual é a influência dos fatores ambientais sobre o controle da produção das cianotoxinas.

Apesar do Reservatório de Funil apresentar florações de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas durante todo ano, pode-se dizer que a toxicidade neste reservatório não é causada apenas por estas toxinas, podendo haver outros compostos tóxicos, e que mesmo em épocas de intensa floração pode haver dominância de cepas não tóxicas. Isso pode ser verificado pela rápida perda de toxicidade da amostra, visto que as cianotoxinas comumente encontradas neste reservatório necessitam de longo tempo para serem degradadas.

A partir dos resultados obtidos na fase I, supõe-se que a toxicidade da água é devida a compostos orgânicos ácidos e básicos, que sofreram degradação, oxidação ou volatilização durante os tratamentos e o tempo de armazenamento. Esta característica justifica a rápida perda de toxicidade da amostra, também verificada nas amostras da segunda e terceira coletas, corroborando os dados obtidos na primeira campanha, além de esclarecer a diferença de toxicidade nos dois pontos de monitoramento, com presença em P2 e não em P1, ponto onde a água percorre maior caminho para alcançar, perdendo portanto a toxicidade.

#### **5.4.2 Amostra de água intersticial do sedimento**

A AIT do sedimento foi realizada somente na 1ª campanha, com a amostra de água intersticial de P1, ponto situado próximo à barragem, que apresentou toxicidade aguda no ensaio inicial. Estes resultados concordam com dados da literatura, como o trabalho de Espíndola *et al.* (1998, *apud* BOTTA, 2002), onde o sedimento mais próximo da barragem do reservatório de Salto Grande, SP, apresentou maior toxicidade, além de outros que indicam que as partículas mais finas do sedimento, com maior grau de adsorção de contaminantes se depositam próximo à barragem (CALHEIROS, 1993; BORGLIN *et al.*, 1996). Foram

considerados os resultados obtidos com 24 horas de tempo de exposição, de acordo com o resultado do ensaio inicial.

As amostras da 2ª e 3ª campanhas não apresentaram efeito agudo, no entanto, a da 2ª apresentou efeito crônico. Porém, não foi possível a realização da AIT crônica, pois é necessária grande quantidade de amostra para condução das etapas da Fase I, o que impossibilitou sua realização.

Imediatamente após a extração da água intersticial em centrífuga refrigerada, realizou-se as etapas de graduação de pH e filtração em pH inicial. Verificou-se que a amostra pura (teste base) gerou mortalidade a todos os organismos expostos, sendo que a diluição da amostra sem nenhum tratamento foi capaz de eliminar a toxicidade, obtendo-se uma CE50 de 64,26 (56,58 – 72,98) %. A Figura 12 apresenta os resultados das amostras em 100%.

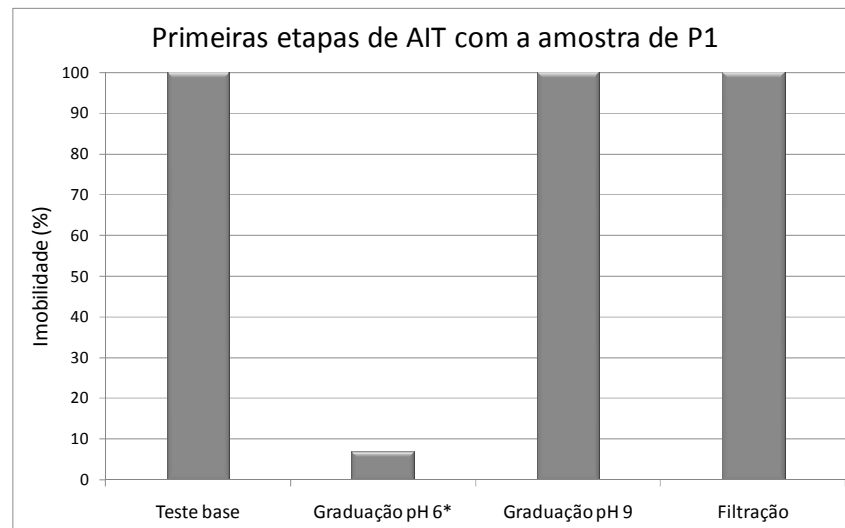


Figura 12 - Imobilidade de *D. similis* expostas aos primeiros tratamentos de AIT. Ensaio de toxicidade aguda em 24 horas para a amostra de água intersticial do ponto P1 do reservatório de Funil. \*: etapas com redução de toxicidade, segundo o teste de Fisher ( $p = 0,05$ ).

A filtração da amostra em pH inicial não alterou a toxicidade, o que não determina a ausência de compostos insolúveis ou associados ao material particulado, pois alguns compostos podem ser removidos após a etapa de filtração com ajuste de pH. Este resultado indica que a amostra previamente filtrada pode ser usada na etapa de extração em coluna de C18, pois, se houver redução de toxicidade após a coluna, esta foi causada com certeza pelo efeito de retenção na coluna e não pelos possíveis efeitos do filtro.

Com o resultado da etapa de graduação de pH pode-se excluir a presença de sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), pois não houve toxicidade na amostra em pH 6, onde este composto é mais tóxico. Pelo contrário, a amostra em pH 6 reduziu totalmente a toxicidade para apenas 7% de

organismo imóveis (dentro do aceitável para o controle), e em pH 9 se manteve tóxica, indicando a presença de amônia, e/ou de alguns metais que tem a toxicidade influenciada pela acidificação do meio (USEPA, 2007). Altamente dependente do pH, a amônia é um composto proveniente da degradação biológica de compostos orgânicos nitrogenados, sendo um contaminante comum de sedimentos com cargas elevadas de matéria orgânica e o mais freqüentemente encontrado em amostras de sedimento (BOTTA, 2002).

Outra evidência da presença de amônia em concentração tóxica é o resultado da etapa de ajuste de pH, realizado no segundo dia de manipulação da amostra e apresentado na Figura 13. O ajuste em pH 11 reduziu significativamente a toxicidade da amostra, enquanto o pH 3 reduziu parcialmente, indicando a presença de compostos pH dependentes. Visto que a amônia é um gás muito volátil, principalmente em condições básicas, onde está presente em maior porcentagem do que o íon amônio (VON SPERLING, 2005), no ajuste em pH 11, a agitação da amostra durante o procedimento e a permanência neste pH durante algumas horas pode ter levado à sua volatilização, reduzindo a toxicidade. Já em pH 3, a redução parcial mostrou a necessidade da condução das demais etapas (filtração, coluna e aeração) com o ajuste em pH 3.

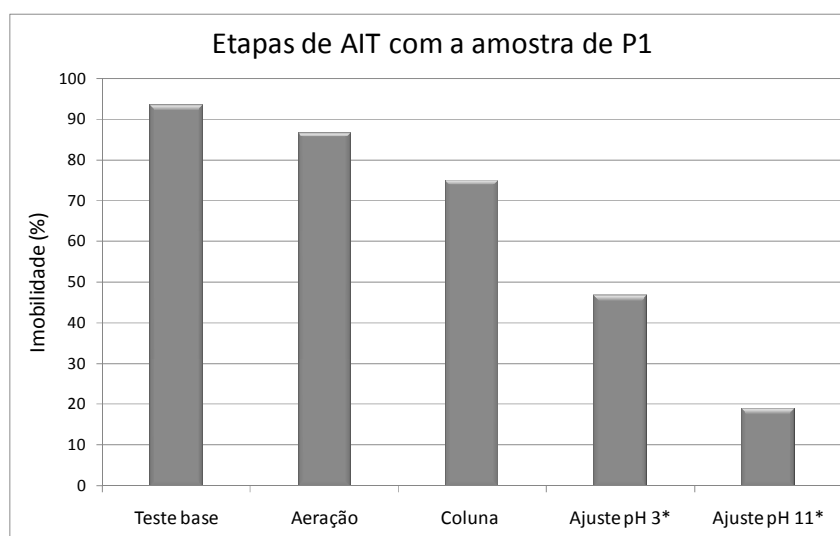


Figura 13 - Imobilidade de *D. similis* no segundo dia de tratamento de AIT. Ensaios de toxicidade aguda em 24 horas para a amostra de água intersticial do ponto P1 do reservatório de Funil.

\*: etapas com redução de toxicidade, segundo o teste de Fisher ( $p = 0,05$ ).

No segundo dia de tratamento da amostra, verificou-se pelo teste base (Figura 13) a manutenção da toxicidade. As etapas de aeração e extração em coluna foram realizadas apenas em pH inicial, conforme sugerido em USEPA (2007), sendo realizados os ensaios de recuperação de toxicidade ao mesmo tempo, para agilizar a obtenção dos resultados.



Verificou-se, porém, que a aeração apresentou toxicidade no branco, indicando contaminação no procedimento. Portanto, esta etapa não pode ser considerada.

Após a passagem da amostra pela coluna de C18 não houve redução significativa de toxicidade, descartando a hipótese de compostos orgânicos e metálicos apolares neutros. Uma pequena toxicidade foi verificada no branco desta etapa, que pode ser devida à toxicidade residual da coluna ou erro de manipulação. O ensaio de recuperação da toxicidade com o metanol eluído da coluna apresentou-se tóxico, porém, como esta etapa não reduziu a toxicidade, isto pode ser devido à própria toxicidade do metanol em decorrência a um possível erro na montagem da solução teste.

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos pelas etapas realizadas com o ajuste em pH 3. A aeração não removeu a toxicidade e mais uma vez apresentou toxicidade no branco, confirmando a contaminação durante o procedimento e descartando o uso deste tratamento.

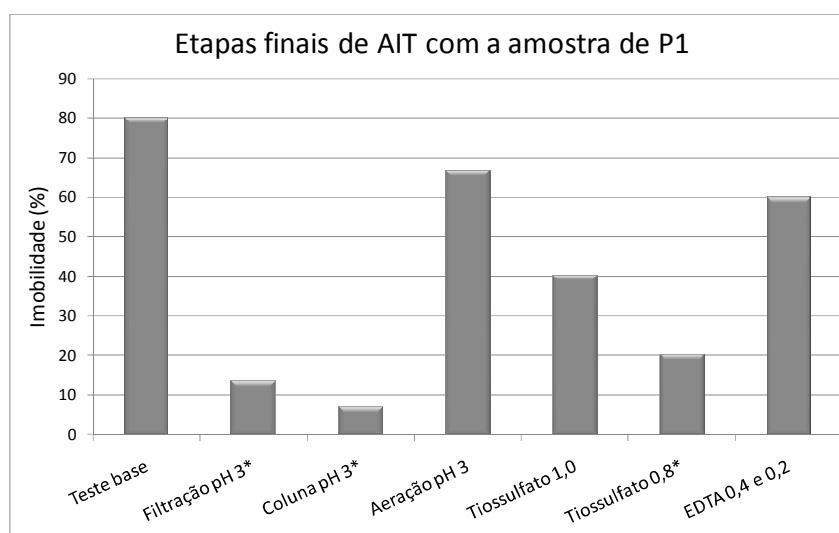


Figura 14 - Imobilidade de *D. similis* expostas a tratamentos de AIT com ajuste de pH, Tioissulfato de sódio e EDTA. Ensaio de toxicidade aguda em 24 horas para a amostra de água intersticial de P1.

\*: etapas com redução de toxicidade, segundo o teste de Fisher ( $p = 0,05$ ).

A filtração da amostra em pH 3 reduziu significativamente a toxicidade, porém ela não foi recuperada após o ensaio com água de diluição usada na sonificação do filtro, indicando que pode ter ocorrido volatilização dos compostos presentes. Após a passagem pela coluna a amostra se apresentou não tóxica, porém não houve recuperação no ensaio com o metanol eluído da coluna. Como esta etapa foi realizada com a amostra previamente filtrada, o efeito de redução de toxicidade pode ser devido à filtração e não pela retenção da coluna, assim como ocorrido para a amostra de água.

A USEPA (2007) sugere que não é necessária a realização da filtração como uma etapa da Fase I, podendo ser usada apenas como um pré-tratamento para a passagem pela coluna, pois mesmo que haja redução de toxicidade, ela não é específica e não ajuda muito no diagnóstico. De qualquer forma, este resultado da filtração com ajuste em pH 3 está relacionado com os efeitos gerados pela mudança de pH sobre a solubilidade dos compostos. Nestes casos pode ocorrer a formação de compostos metálicos insolúveis, a transformação de ácidos e bases orgânicos iônicos para não iônicos, a alteração da polaridade dos compostos aumentando a força de associação com os particulados, dentre outros (BOTTA *et al.*, 2006).

O ensaio de graduação de pH pode ser usado para indicar os metais presentes em concentrações tóxicas na água intersticial, visto que para *Ceriodaphnia dubia* alguns metais, como zinco e níquel são mais tóxicos em pH básicos, ocorrendo o contrário com chumbo e cobre (USEPA, 2007). Para diferenciar a toxicidade causada pela amônia e por metais utiliza-se a etapa de tratamento com EDTA.

Só podem ser considerados os resultados das duas menores concentrações (0,4 e 0,2x CE50) do tratamento com EDTA, pois não ocorreu mortalidade nos respectivos brancos. Nas demais concentrações, além de mortalidade na amostra houve também nos brancos. Porém, obteve-se pequena redução de toxicidade nessas concentrações, o que não foi estatisticamente significativo, o que pode ser devido à presença de metais com baixa especificidade para o EDTA.

O documento proposto pela USEPA (2007) para AIT de sedimento retira o tratamento com tiosulfato de sódio da Fase I, justificando que os compostos oxidáveis comumente encontrados em efluentes não são prováveis de estarem presentes no sedimento. Este documento propõe sua utilização na Fase II, para identificação de metais. Segundo este documento, em experimentos com *C. dubia*, o tiosulfato de sódio foi capaz de reduzir a toxicidade de cobre e cádmio, e um pouco da toxicidade de zinco, chumbo e níquel. Conforme apresentado na Figura 18, a adição de tiosulfato de sódio, realizada no terceiro dia de tratamento da amostra, reduziu significativamente a toxicidade na concentração de 0,8 x CE50.

Conforme apresentado no item 5.2, os metais Al, Fe, Mn, Zn, Pb, Cu e Ni estão presentes no sedimento de P1. Verificou-se que apenas o cobre (Cu) apresentou concentração acima do nível 1 estabelecido pela Resolução Conama 344/04 (BRASIL, 2004), o que pode representar a existência de provável efeito tóxico sobre a biota. Porém, é importante considerar que as concentrações encontradas de cada elemento apenas confirmam a presença e indicam as concentrações, mas não evidenciam a biodisponibilidade desses metais.

De acordo com a presença dos metais identificados na amostra de sedimento, com os resultados da AIT (graduação, EDTA e tiosulfato de sódio), e com os dados citados de USEPA (2007), torna-se evidente que os metais possam ser responsáveis por parte da toxicidade da amostra. É evidente que não se pode descartar o fator biodisponibilidade, visto que não foi feita a análise da concentração de sulfetos volatilizáveis por acidificação, o qual determina a biodisponibilidade de metais por formar sulfetos metálicos insolúveis (DI TORO *et al.*, 1992 *apud* BOTTA, 2002).

De forma geral, para a amostra de água intersticial do sedimento, houve redução da toxicidade nos procedimentos de graduação no pH 6 (metais, amônia); ajuste em pH 3 e pH 11 (compostos orgânicos pH dependentes - amônia, metais); filtração com ajuste em pH 3 (compostos orgânicos ácidos) e Tiosulfato de sódio (metais catiônicos). Com base na granulometria e no teor de matéria orgânica, o sedimento do ponto P1 tem grande capacidade de agregar metais e acumular nutrientes. Portanto, a toxicidade do sedimento pode ser causada pela presença de metais e compostos orgânicos pH dependentes - amônia.

As indicações fornecidas pelos resultados da Fase I concordam com os resultados de diversos estudos de AIT em sedimentos de ambientes de água doce. Segundo HO *et al.* (2002), a toxicidade destes sedimentos é geralmente causada por metais, amônia e compostos orgânicos. Ao realizarem uma revisão nos estudos de AIT com água intersticial de sedimentos marinhos e de água doce, HO *et al.* (2002), concluíram que não há um composto tóxico predominante, sendo que os metais, os compostos orgânicos e amônia desempenham quase a mesma proporção de toxicidade nos sedimentos. Os autores enfatizaram ainda, que a amônia tem um papel importante na toxicidade da água intersticial, o que só foi demonstrado a partir dos estudos de AIT.

## 6 CONCLUSÃO

A toxicidade aguda observada neste estudo corrobora os dados encontrados na literatura para amostras de água superficial do Reservatório de Funil.

Com os resultados obtidos pelos procedimentos da Fase I do estudo de AIT realizado com a amostra de abril, para a água supõe-se que a toxicidade é devida a compostos orgânicos ácidos e básicos.

Para a amostra de sedimento, a AIT realizada com a amostra de abril indicou que a toxicidade pode ser causada pela presença de metais, amônia e compostos orgânicos pH dependentes.

O objetivo de aprendizado dos procedimentos do estudo de AIT foi alcançado, bem como a implantação desta técnica no Laboratório de Ecotoxicologia da UNIFEI.

## 7 RECOMENDAÇÕES

Novas coletas devem ser realizadas, tanto de água como de sedimento, em diferentes épocas do ano, buscando representar os períodos seco e chuvoso, e em diferentes pontos de amostragem.

Para a água, as amostras coletadas devem ter sua análise química e toxicológica iniciada no mesmo dia da coleta, utilizando-se a extração em coluna de C18 seguida de eluição com metanol em diferentes diluições e com outro solvente, como o diclorometano. Após a confirmação de toxicidade pelos ensaios toxicológicos, os extratos obtidos devem ser imediatamente analisados para identificação de compostos orgânicos por cromatografia gasosa com detector de massas. Visto que o reservatório possui constantes florações de cianobactérias, a determinação da presença e do tipo de suas toxinas também deve ser realizada. A realização das análises em menor tempo possível diminui o risco de perda de toxicidade da amostra, tornando possível a sua caracterização completa e a identificação de compostos específicos responsáveis pela toxicidade, caso esta não seja causada apenas por toxinas de cianobactérias, o que os resultados deste trabalho indicaram.

Para o sedimento, é importante determinar o real efeito do congelamento e do tempo de armazenamento nas amostras deste reservatório, através da condução de ensaios toxicológicos com frações de amostras de uma mesma coleta, congelada e armazenada resfriada a 4 °C, com diferentes tempos de armazenamento. Deve-se realizar as análises de amônia e de sulfetos volatilizáveis por acidificação, a fim de determinar a biodisponibilidade dos metais encontrados no sedimento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, RJ. 23p. 2009.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, RJ. 15p. 2005.

ALERJ - ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Ictiofauna do Rio Paraíba do Sul. Danos ambientais e sociais causados por barragens, hidrelétricas e poluição no trecho fluminense. Comissão Permanente de Defesa do Meio Ambiente. Rio de Janeiro, RJ. 59 p. 2005.

ALERJ - ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Rio Paraíba do Sul – Reservatório do Funil: poluição e degradação ambiental. Comissão Permanente de Defesa do Meio Ambiente. Rio de Janeiro, RJ. 52 p. 2006.

ANKLEY, G. T.; PETERSON, G. S.; LUKASEWYCZ, M. T.; JENSEN, D. A. Characteristics of surfactants in toxicity identification evaluations. **Chemosphere**. v. 21, n. 1 – 2, p. 3 – 12, 1990.

ANKLEY, G. T.; SCHUBAUER-BERINGAN, M. K. Background and overview of current sediment toxicity identification procedures. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**. v. 4, p. 133 – 419. 1995.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. New York. 1268 p. 1992.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. Editora RiMa. São Carlos, SP. 478 p. 2006.

ARAÚJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; BOHRER, M. B. C.; JARDIM, W. Avaliação da qualidade de sedimentos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. Editora RiMa. São Carlos, SP. 478 p. 2006a.

ARAÚJO, R. P. A.; BOTTA-PASCHOAL, C. M. R.; SILVÉRIO, P. F.; ALMEIDA, F. V.; RODRIGUES, P. F.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F.; MOZETO, A. A. Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 25, n. 2, p. 581–588. 2006b.

AZCUE, J. M.; PFEIFFER, W. C.; FISZMAN, M.; MALM, O. Heavy metals in drinking waters from the Paraíba do Sul-Guandu River System, Rio de Janeiro state, Brazil. **Wat. Sci. Tech**. v. 19, p. 1181 – 1183. 1987.

BARBOSA, D. S. **Avaliação e identificação de toxicidade (Fase I) em nascentes da bacia do rio Mogi-Guaçu, município de Bom Repouso/MG**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 2010.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Aplicação dos Ensaio Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. Editora RiMa. São Carlos, SP. 478 p. 2006.

BORGLIN, S; WILKE, A.; JEPSEM, R.; LICK, W. Parameters affecting the desorption of hydrophobic organic chemicals from suspended sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n. 10, p. 2254 - 2262. 1996.

BOTTA, C. M. R. **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos em reservatórios da bacia do rio Tietê, SP, com ênfase na aplicação do estudo de AIT – Avaliação e Identificação da Toxicidade**. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 2002.

BOTTA, C. M. R.; ARAÚJO, R. P. A.; SILVÉRIO, P. F.; ALMEIDA, F. V.; MOZETO, A. A. Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) de amostras de sedimento de água doce. In: MOZETO, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; JARDIM, W. F. (Org.). **Métodos de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce**. Editora Cubo. São Carlos, SP. 224 p. 2006.

BRANCO, C. W. C.; ROCHA, M. I. A.; PINTO, G. F. S.; GÔMARA, G. A.; DE FILIPPO, R. Limnological features of Funil reservoir (RJ, Brazil) and indicator properties of rotifers and cladocerans of the zooplankton community. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**. v. 7, p. 87 – 92. 2002.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Resolução n° 344, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, março 2004.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução n° 357, 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, março 2005.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Análise Estatística. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. Editora RiMa. São Carlos, SP. 478 p. 2006.

BURATINI, S. V.; ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A.; PRÓSPERI, V. A.; WERNER, L. I. Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, n. 3, p. 257 – 262, 2007.

CALHEIROS, D. F. **Ecotoxicologia de compostos organoclorados persistentes em um sistema eutrófico: represa de Barra Bonita (Médio Tietê, SP)**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 1993.

CEIVAP - COMITÊ PARA INTEGRAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PARAÍBA DO SUL. 2010. Bacia do Rio Paraíba do Sul. Dados Gerais. Disponível em <[www.ceivap.org.br](http://www.ceivap.org.br)>. Acesso em: 20 ago. 2010.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. IET - Índice do Estado Trófico. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/108-indices-de-qualidade-das-aguas>>. Acesso em: 09 maio 2011.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CHRISTOFFERSEN, K. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia*. v. 35, p. 42 – 50. 1996.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. 2. ed. 212 p. Rio de Janeiro, RJ. 1997.

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro. Ed. Interciência. 575 p. 1988.

FERRÃO-FILHO, A. S.; COSTA, S. M.; RIBEIRO, M. G. L.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. **Environmental Toxicology**. v. 23, p. 161-168. 2008.

FERRÃO-FILHO, A. S.; SOARES, M. C. S.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.72, p. 479 – 489, 2009a.

FERRÃO-FILHO, A. S.; SOARES, M. C.; ROCHA, M. I. A.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Florações de cianobactérias tóxicas no reservatório do Funil: dinâmica sazonal e consequências para o zooplâncton. **Oecologia Brasiliensis**. v. 13, n. 2, p. 346 – 365. 2009b.

FIGUEREDO, C. C. Monitoramento da qualidade da água de sete reservatórios pertencentes a Furnas Centrais Elétricas S.A. 3º Simpósio de Especialistas em Operação de Centrais Elétricas. 2002.

FURNAS. Sistema Eletrobrás Furnas. Reservatório de Funil. Disponível em: <[www.furnas.com.br](http://www.furnas.com.br)>. Acesso em: 20 ago. 2010.

GEFFARD, O.; HISB, E.; BUDZINSKI, H.; CHIFFOLEAU, J. F.; COYNEL, A.; ETCHEBER, H. Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. **Environmental Pollution**. 129. p. 457 – 465. 2004.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**. v.11, n. 7, p. 714 – 719. 1977.



HJORTH, T. Effects of freeze-drying on partitioning patterns of major elements and trace metals in lake sediments. **Analytica Chimica Acta**. 526. p. 95 – 102. 2004.

HO, K. T.; BURGESS, R. M.; PELLETIER, M. C.; SERBST, J. R.; RYBA, S. A.; CANTWELL, M. G.; KUHN, A.; RACZELOWSKI, P. An overview of toxicant identification in sediments and dredged materials. **Marine Pollution Bulletin**. v. 44, p. 286 – 293. 2002.

INEA - INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE. Reservatórios. Disponível em: <[www.inea.rj.gov.br](http://www.inea.rj.gov.br)>. Acesso em: 23 ago. 2010.

JUNG, R. F.; BATLEY, G. E. Freezing of sediments inappropriate for pore water selenium analysis. **Marine Pollution Bulletin**. 49. p. 295 – 298. 2004.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 12, n. 3, p. 355 – 381. 2008.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**. v. 13, n. 2, p. 229 – 246. 2009.

NILIN, J. **Avaliação da qualidade do sedimento do estuário do rio Ceará**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE. 95 p. 2008.

NORBERG-KING, T. J.; ANKLEY, G. T.; ROBERT, E. Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa basin drain. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 10, p. 891 – 901. 1991.

NOVO, E. M. L. M.; STECH, J. L.; LONDE, L. R.; ASSIREU, A.; BARBOSA, C. C.; ALCÂNTARA, E. H.; SOUZA, A. F. Integração de dados do sistema automático de monitoramento de variáveis ambientais (SIMA) e de imagens orbitais na avaliação do estado trófico do Reservatório da UHE Funil. Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Natal, Brasil. INPE. p. 4797 – 4804. 25 – 30 abril 2009.

PHILLIPS, B. M.; ANDERSON, B. S.; HUNT, J. W.; CLARK, S. L.; VOORHEES, J. P.; TJEERDEMA, R. S.; CASTELINE, J.; STEWART, M. Evaluation of phase II toxicity identification evaluation methods for freshwater whole sediment and interstitial water. **Chemosphere**. v. 74 p. 648 – 653. 2009.

PIRES, L. E. B. **Avaliação e Identificação da Toxicidade (Toxicity Identification Evaluation - TIE) do efluente líquido do pólo industrial de Belford Roxo, RJ, e sua contribuição na qualidade das águas do curso inferior do rio Sarapuí, sub-bacia do rio Iguaçu, bacia da Baía de Guanabara, RJ, Brasil**. Tese (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN. São Paulo. 2006.

PRIMO, A. R. R. **Avaliação da influência do Reservatório do Funil na qualidade da água do rio Paraíba do Sul**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, SP. 2006.

ROCHA, M. I. A.; BRANCO, C. W. C.; SAMPAIO, G. F.; GÔMARA, G. A.; DE FILIPPO, R. Spatial and temporal variation of limnological features, *Mycrocystis aeruginosa* and

zooplankton in an eutrophic reservoir (Funil Reservoir, Rio de Janeiro). **Acta Limnol. Bras.** v. 14, n. 3, p. 73 – 86, 2002.

ROSA, P. G. **Comunidade Zooplancônica de Cinco Reservatórios Tropicais do Sistema Furnas S.A. (Brasil): Abundância e Biomassa em Carbono.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora. 2008.

SCHUBAUER-BERIGAN, M. K.; ANKLEY, G. T. The contribution of ammonia, metals and nonpolar organic compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an Illinois river tributary. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 10, p. 925 – 939. 1991.

SCHUYTEMA, G.S.; NEBEKER, A.V.; GRIFFS, W. L.; MILLER, C. E. Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 8. p. 883 – 891. 1989.

SOTERO-SANTOS, R. B.; SILVA, C. R. S. E.; FENERICH-VERANI, N.; NONAKA, K.; ROCHA, O. Toxicity of a cyanobacteria Bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 64, n. 2, p. 163-170. 2006.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. (1991a). Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I. Toxicity characterization procedures. Second edition. Final Report. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/6-91/003.

\_\_\_\_\_. (1991b). Sediment toxicity identification evaluation: phase I (characterization), phase II (identification) and phase III (confirmation) modifications of effluent procedures. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/6-91/007.

\_\_\_\_\_. (1993a). Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/R-92/080.

\_\_\_\_\_. (1993b). Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase III Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/R-92/081.

\_\_\_\_\_. (1996) Method 3050 B: Acid digestion of sediments, sludges, and soils. Washington DC - EUA.

\_\_\_\_\_. (2001a). Clarifications Regarding Toxicity Reduction and Identification Evaluations in the National Pollutant Discharge Elimination System Program. Office of Wastewater Management. Office of Regulatory Enforcement. Washington, DC 20460.

\_\_\_\_\_. (2001b). Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. 4 ed. EPA/821/R-02/13.

\_\_\_\_\_. (2007). Sediment toxicity identification evaluation: Phases I, II and III Guidance Document. Duluth, MN: Environmental Research Laboratory. EPA/600/R-07/080.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.

ZAGATTO, P. A. O Uso de Substâncias de Referência no Controle de Qualidade de Ensaio Ecotoxicológicos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. Editora RiMa. São Carlos, SP. 478 p. 2006.

## APÊNDICE A – Cartas controle

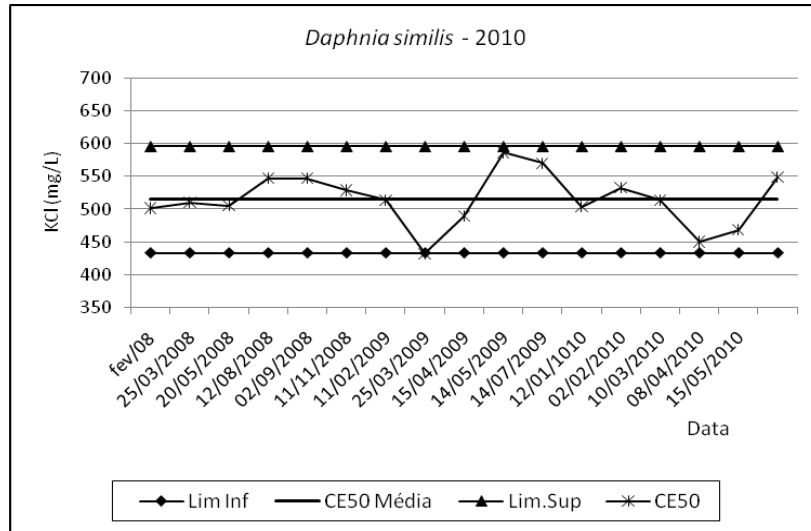


Figura 15 - Carta controle de sensibilidade de *D. similis* à KCl (CRHEA/USP).

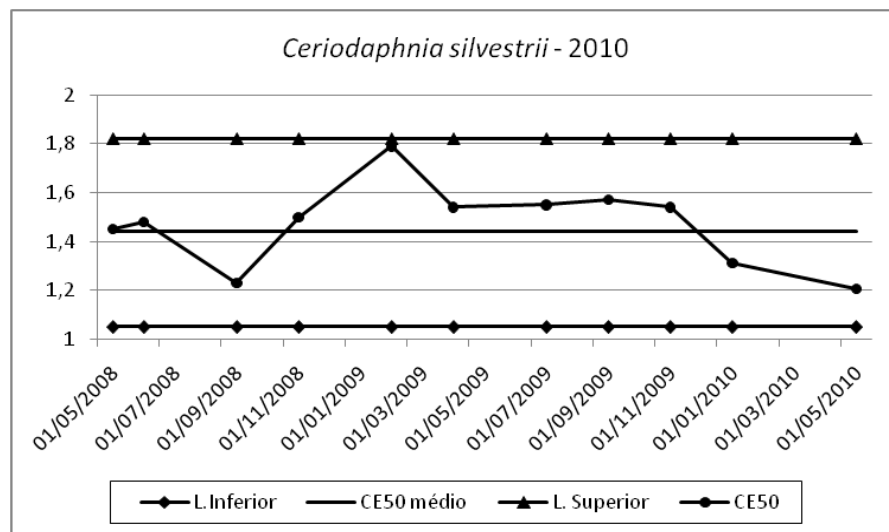
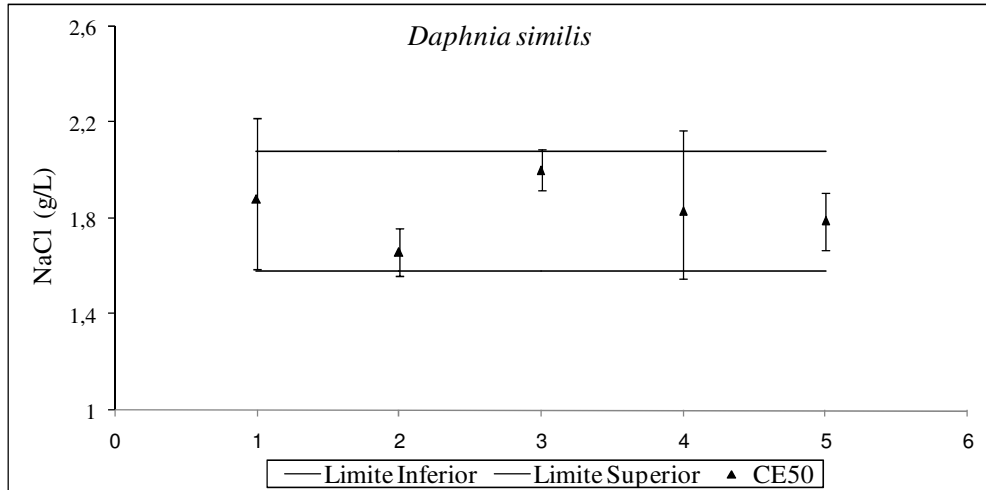
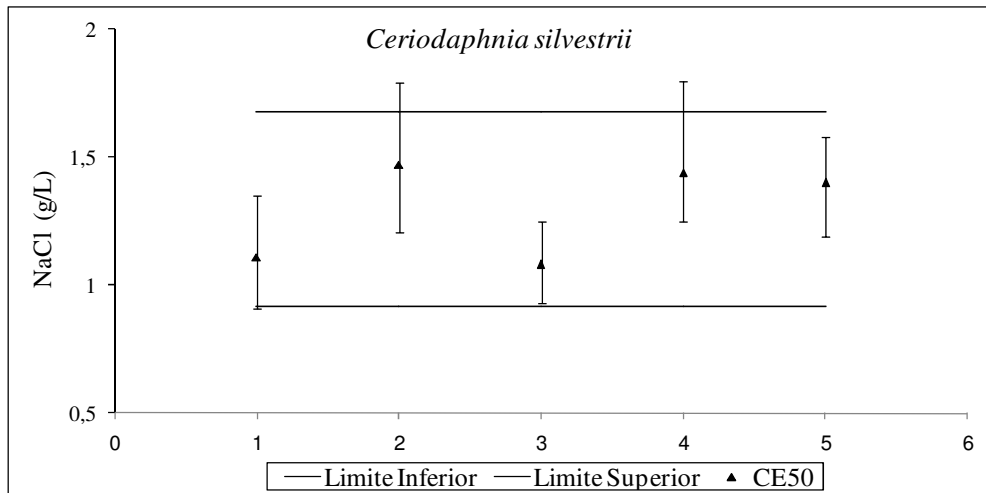


Figura 16 - Carta controle de sensibilidade de *C. silvestrii* à NaCl (CRHEA/USP).

Figura 17 - Carta controle de sensibilidade de *D. similis* à NaCl (UNIFEI).Figura 18 - Carta controle de sensibilidade de *C. silvestrii* à NaCl (UNIFEI).