

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

DANILO SANDRO BARBOSA

**Avaliação e Identificação de Toxicidade (Fase I) em nascentes da bacia do rio Mogi-Guaçu,
município de Bom Repouso/MG**

SÃO CARLOS – SP
2010

DANILO SANDRO BARBOSA

Avaliação e Identificação de Toxicidade (Fase I) em uma nascente da bacia do rio Mogi-Guaçu, município de Bom Repouso/MG

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo (USP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - Programa de Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Clarice Maria Rispoli Botta

SÃO CARLOS – SP
2010

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

B238a Barbosa, Danilo Sandro
 Avaliação e identificação de toxicidade (Fase I) em
nascentes da bacia do rio Mogi-Guacu município de Bom
Repouso/MG / Danilo Sandro Barbosa ; orientador :
Clarice Maria Rispoli Botta. -- São Carlos, 2010.

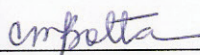
Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. TIE. 2. Ecotoxicologia. 3. Rio Mogi-Guaçu.
4. Nascente. 5. Ceriodaphnia dubia I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

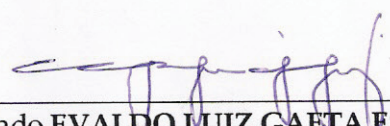
Candidato(a): Licenciado **DANILO SANDRO BARBOSA**.

Dissertação defendida e julgada em 02/09/2010 perante a Comissão Julgadora:



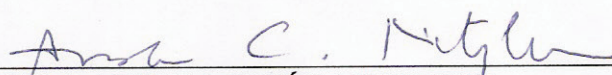
Dr^a. CLARICE MARIA RISPOLI BOTTA – (Orientadora)
(Pesquisadora FIPAI)

Aprovado



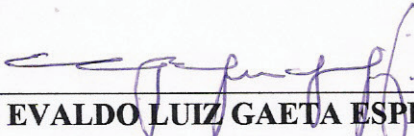
Prof. Associado EVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO

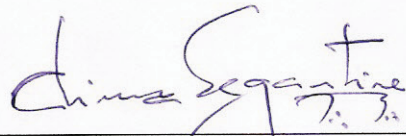


Prof^a. Dr^a. ARNOLA CECÍLIA RIETZLER
(Universidade Federal de Minas Gerais/UFGM)

APROVADO



Prof. Associado EVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental



Prof. Titular Geraldo Roberto Martins da Costa
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof. Associado Paulo César Lima Segantine
Vice-Presidente da CPG

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos, e àqueles que me protegem.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de São Carlos, ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, o Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticas e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, pela estrutura e recursos oferecidos, fatores imprescindíveis no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Instituto de Química de São Carlos, na pessoa da Profa. Dra. Eny Maria Vieira, pela estrutura e equipamentos utilizados durante a pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

À minha orientadora Dra. Clarice Maria R. Botta, pela oportunidade, pelos ensinamentos no campo da Ecotoxicologia e especialmente pela paciência.

Ao Prof. Assoc. Dr. Evaldo L. G. Espíndola, por todas as oportunidades dadas, pela estrutura fornecida e por toda ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Um agradecimento especial ao Amândio M. Nogueira e Marcelo M. Nogueira, técnicos do NEEA, e à Juliana Resende, aluna de graduação da Engenharia Ambiental, e todos os funcionários do CRHEA/USP que contribuíram de diversas maneiras no desenvolvimento do trabalho.

Por todos os ensinamentos, pelo apoio e amizade, agradeço ao Dr. Ricardo W. Reis Filho e à MSc. Maria Edna T. Nunes.

À todos amigos e colegas que me acompanharam durante este período. Por serem muitos (felizmente), não poderei citá-los aqui, ainda que mereçam.

Ao senhor Xü e sua família, muito obrigado por todo o conhecimento e principalmente pela amizade.

Agradeço, especialmente, aos meus orientadores profissionais e morais, mãe e irmão, Esp. Maria Helena Barbosa e Dr. Domingos Sávio Barbosa que sempre me acompanharam e apoiaram durante todo este tempo.

*“Vida verdadeira é como a água:
Em silêncio se adapta ao nível inferior,
Que os homens desprezam.
Não se opõe a nada,
Serve a tudo.
Porque sua origem é da Fonte Imortal.
(...)”*

Lao-Tzu

RESUMO

BARBOSA, D. S. **Avaliação e Identificação de Toxicidade (Fase I) em uma nascente da bacia do rio Mogi-Guaçu, município de Bom Repouso/MG.** (2010) 105f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP.

Localizado na Bacia Hidrográfica de montante do Rio Mogi-Guaçu, o município de Bom Repouso/MG é considerado estratégico quanto à questão hídrica e econômica, pois apresenta uma elevada quantidade de nascentes (368 nascentes catalogadas) que dão origem aos principais rios da bacia, além de ser um dos principais produtores de batata e morango do país. Estudos anteriores demonstram que esta região tem sofrido perdas qualitativas em seus recursos naturais, especialmente por causa da remoção de cobertura nativa para a expansão de atividades agrícolas e o uso extensivo de defensivos agrícolas, como agrotóxicos e fertilizantes. No presente estudo, a fase I da AIT foi aplicada com o objetivo de evidenciar as características das principais classes de compostos responsáveis pela toxicidade em uma nascente da região de Bom Repouso/MG, Brasil. A toxicidade crônica da amostra bruta, submetida a manipulações como filtração, aeração, ajuste de pH, extração em coluna de octadecil (C18), graduação de pH, adição de EDTA e Tiosulfato de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) foi avaliada por meio de ensaios com *Ceriodaphnia dubia*. Testes com uma amostra de referência mostraram que o efeito sobre os organismos não era apenas causado por estresse, mas por uma combinação de fatores, como os baixos valores de pH, a baixa dureza da amostra e a presença de substâncias como o ferro, cromo e selenatos, que mesmo em baixas concentrações poderiam ter seu efeito maximizados. No sedimento elutriado um panorama diferente foi visto pois houveram reduções nas graduações de pH e extração em fase sólida, o que também caracteriza combinação de fatores como estresse dos organismos e presença de substâncias orgânicas.

Palavras-Chave: TIE, Ecotoxicologia, Mogi-Guaçu, Nascentes, *Ceriodaphnia dubia*

ABSTRACT

BARBOSA, D. S. **Toxicity Identification Evaluation (Phase I) in a spring of Mogi-Guaçu river basin, Bom Repouso City/MG, Brazil.** (2010) 105f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2010.

Located in the amount of the Mogi-Guaçu River Basin, Bom Repouso City/MG is considered strategic in water resources and economy, because it has high number of springs (368 springs cataloged) and giving rise to the major rivers of the basin, and is among the largest potatoes and strawberry producers. Previous studies have shown that this region has suffered losses in their qualitative and quantitative natural resources, especially because the removal of native forest for the expansion of agricultural activities and the extensive use of agrochemicals such as pesticides and fertilizers. In this study, phase I of TIE was implemented with the aim of highlighting characteristics of major classes of compounds responsible for toxicity in a spring of Bom Repouso City/MG, Brazil. The chronic toxicity of the whole sample and subjected to gross manipulation as filtration, aeration, pH adjustment, solid phase extraction (C18), pH graduated, addition of EDTA and sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) was assessed by tests with the organism *Ceriodaphnia dubia*. Tests with a reference sample showed that the effect on the organisms wasn't just caused by stress, but a combination of factors such as low pH and low hardness of the sample and the presence of substances such as iron, chromium and selenate, that even at low concentrations could have maximized effects. Sediment elutriate tests shown a different scenery because there were reductions in the graduated pH and SPE tests, which also reveals a combination of stress factors and presence of organic substances.

Key-words: TIE, Ecotoxicology, Mogi-Guaçu River, Springs, *Ceriodaphnia dubia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Mapa da Bacia Hidrográfica do Mogi-Guaçu (abaixo) e mapa da região de Bom Repouso.....</i>	23
Figura 2 -	<i>Etapas da Fase I da AIT.....</i>	28
Figura 3 -	<i>Trabalhos científicos sobre AIT publicados em revistas periódicas no período entre 1983-2010.....</i>	33
Figura 4 -	<i>Participação dos países na produção de trabalhos científicos sobre AIT publicados em revistas periódicas no período entre 1983-2010.....</i>	34
Figura 5 -	<i>Mapa da região administrativa do município de Bom Repouso/MG. Em destaque, os bairros e os respectivos pontos de amostragem.....</i>	48
Figura 6 -	<i>Procedimentos utilizados para caracterização de compostos tóxicos (Dia 1).....</i>	54
Figura 7 -	<i>Procedimentos utilizados para caracterização de compostos tóxicos (Dia 2).....</i>	55
Figura 8 -	<i>Procedimento estatístico utilizado na avaliação dos resultados de testes de toxicidade crônica com C. dubia.....</i>	56
Figura 9 -	<i>Carta-controle da sensibilidade dos organismos de C. dubia à substância Cloreto de sódio (NaCl).....</i>	58
Figura 10 -	<i>Média de neonatas de C. dubia por fêmea adulta nos bioensaios de toxicidade crônica com água no mês de julho e novembro de 2008.....</i>	60
Figura 11 -	<i>Precipitação diária nos meses de outubro e novembro de 2008. A seta indica a data da coleta (1º de novembro).....</i>	63
Figura 12 -	<i>Médias de reprodução em cada tratamento da Fase I na amostra de água do ponto 22.....</i>	65
Figura 13 -	<i>Redução da toxicidade de metais para C. dubia quando tratados com EDTA e tiosulfato de sódio.....</i>	67
Figura 14 -	<i>Médias de reprodução em cada tratamento da Fase I na amostra de sedimento do ponto 22.....</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	<i>Dimensionamento dos problemas relacionados à água doce: consumo.....</i>	18
Tabela 2 -	<i>Dimensionamento dos problemas relacionados à água doce: fluxos dos macro e micropoluentes.....</i>	19
Tabela 3 -	<i>Classes de compostos identificáveis nas manipulações da Fase I.....</i>	30
Tabela 4 -	<i>Resumo dos tipos de amostras e respectivos toxicantes identificados em estudos de AIT.....</i>	41
Tabela 5 -	<i>Resumo dos tipos de amostras e respectivos toxicantes identificados em estudos de AIT na América do Sul.....</i>	45
Tabela 6 -	<i>Descrição dos pontos de amostragem, baseadas em observações realizadas por Resende (2009) e Cunha (2009).....</i>	47
Tabela 7 -	<i>Resumo das condições de cultivo e dos testes com Ceriodaphnia dubia.....</i>	50
Tabela 8 -	<i>Resumo dos requisitos para os ensaios de toxicidade crônica.....</i>	52
Tabela 9 -	<i>Parâmetros físico-químicos mensurados antes do teste com amostras da campanhas de julho e novembro de 2008.....</i>	59
Tabela 10 -	<i>Concentração de metais dissolvidos (Fe, Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Cd, Mn, Na, Al e Co) quantificados na água por Resende (2009) na campanha de julho de 2008.....</i>	62
Tabela 11 -	<i>Concentração de metais (Fe, Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Cd, Mn, Na, Al e Co) quantificados no sedimento por Resende (2009) na campanha de julho de 2008.....</i>	62
Tabela 12 -	<i>Resultado do teste de toxicidade crônica com a fase líquida do sedimento da campanha de novembro de 2008.....</i>	63
Tabela 13 -	<i>Toxicidade crônica do EDTA para a espécie Ceriodaphnia dubia (7 dias) em relação à dureza do meio.....</i>	68
Tabela 14 -	<i>Toxicidade crônica do Tiosulfato de sódio para a espécie Ceriodaphnia dubia (7 dias).....</i>	69

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	Pressões antrópicas sobre os Recursos Hídricos.....	17
1.2.	Ecotoxicologia	19
1.3.	Área de Estudo	21
1.3.1.	A Bacia Hidrográfica do Rio Mogi-Guaçu	21
1.4.	Estudos anteriores.....	24
2.	OBJETIVOS DA PESQUISA	27
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE TOXICIDADE	27
3.1.	Aspectos Metodológicos	27
3.2.	Produção Científica Relacionada à AIT.....	32
3.3.	Principais Aplicações da Avaliação e Identificação de Toxicidade	34
3.3.1.	Identificação de Substâncias Tóxicas em Efluentes Industriais e Municipais	34
3.3.2.	Identificação de substâncias tóxicas na água e no sedimento	36
3.3.3.	A AIT na América Latina	41
3.4.	Considerações Finais	45
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1.	Amostragem	46
4.2.	Cultivo dos Organismos.....	50
4.3.	Controle de Qualidade - Testes de Sensibilidade.....	51
4.4.	Testes de Toxicidade Crônica	51
4.5.	Avaliação e Identificação de Toxicidade	52
4.5.1.	Ajuste de pH	52
4.5.2.	Filtração.....	53
4.5.3.	Aeração	53
4.5.4.	Extração em Fase Sólida.....	53
4.5.5.	Graduação de pH.....	54
4.5.6.	Tratamento com Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) e Tiosulfato de Sódio..	55
4.6.	Análise Estatística	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1.	Controle de qualidade - Sensibilidade dos organismos-teste	57
5.2.	Testes de Toxicidade – Água e Sedimento	58

5.3.	Avaliação e Identificação de Toxicidade.....	63
5.3.1.	AIT - Água.....	64
5.3.2.	AIT - Sedimento	67
6.	CONCLUSÕES	72
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
	ANEXOS.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pressões antrópicas sobre os Recursos Hídricos

A água é essencial para a manutenção de todas as formas de vida no planeta Terra, e apesar das diferenças de proporções entre a composição de água nos organismos, todos sem exceção, necessitam de água para o funcionamento adequado e cumprimento de suas funções vitais.

Desde sempre a população humana, assim como a de todas as outras espécies, são dependentes da disponibilidade hídrica. No caso dos humanos, a sobrevivência do indivíduo e da sociedade dependem primordialmente destes recursos. A falta de água potável, adequada para o consumo humano e para a manutenção de suas atividades como produção de alimentos, por exemplo, é um fator considerado muito importante que pode ser a causa de tensões e conflitos sociais.

Diversos estudos indicam o risco futuro de escassez das reservas de água potável. O relatório elaborado pela Organização das Nações Unidas – ONU – denuncia tal escassez para este milênio, o que afetará já nos próximos 15 anos metade da população mundial, ou seja, cerca de 4 bilhões de pessoas (ONU, 2002).

Fatores como contaminação, uso intensivo e pressões sobre outros recursos naturais são apontados como os principais responsáveis pela diminuição dos estoques de água apropriada ao consumo humano. A remoção extensiva de vegetação nativa, uso inadequado do solo e alterações climáticas globais, por exemplo, afetam o ciclo hidrológico e a gênese dos corpos d'água. O consumo excessivo e a crescente necessidade por água e outros recursos naturais é um fator preocupante que vêm se agravando, pois a população humana cresce muito com o passar do tempo – projeção para 8 bilhões em 2025 e 9,3 bilhões em 2050 (ONU, 2002) – e a necessidade por alimentos e bens de consumo aumenta concomitantemente.

Diversos estudos indicam que a agricultura é a atividade humana que mais consome água (ONU, 2002; Tundisi, 2003; Schwarzenbach et al., 2006). O desenvolvimento dos meios de produção nas indústrias contribuiu drasticamente para a redução do consumo de água,

entretanto, as técnicas agrícolas utilizadas atualmente não avançaram com a mesma velocidade e ainda exercem grande pressão sobre os recursos naturais (Tundisi, 2003). A tabela 1 mostra as dimensões de consumo de água entre as atividades humanas.

Tabela 1 – Dimensionamento dos problemas relacionados à água doce: consumo (adaptado de Schwarzenbach et al., 2006)

Apropriação humana do suprimento de água doce (km³/ano)	
Vazão global total	40.700
Vazão global acessível	12.500
Captação de água (total)	4.430
Agricultura	2.880
Indústria	975
Municipalidades	300
Perdas em reservatórios	275

As perdas qualitativas também intensificaram - se nos últimos anos. A busca e a manutenção de um padrão de vida moldado em conforto e consumo, na verdade é o principal fomentador ou causador das perdas qualitativas dos recursos hídricos. Esta é uma trágica contradição, pois é sabido que a qualidade sócio-econômica está intimamente reacionada à qualidade ambiental.

O desenvolvimento das técnicas de produção colaborou para o surgimento de novos produtos e a intensificação do consumo, o que promoveu conseqüentemente o aumento da quantidade de resíduos e que, em muitos casos, ocasionam sérias degradações nos ecossistemas (Pimentel et al., 2006).

Os resíduos pontuais gerados pela indústria e pela população, e especialmente a contribuição difusa da agricultura, introduzem aos compartimentos ecológicos milhares de macro e micropoluentes (Tabela 2), sintéticos e naturais, promovendo desequilíbrios e efeitos negativos sobre a biota (Schwarzenbach et al., 2006). De acordo com o *Chemical Abstracts Service* (CAS, 2009), 50 milhões de substâncias químicas diferentes, orgânicas e inorgânicas, foram registradas até 2009, sendo que em 1990 haviam sido registradas apenas 10 milhões.

Tabela 2 – Dimensionamento dos problemas relacionados à água doce: fluxos dos macro e micropoluentes (adaptado de Schwarzenbach et al., 2006)

Fluxos de macro-poluentes nos rios do mundo (10⁶ toneladas/ano)	
Nitrogênio inorgânico total (~ 75% antropogênico)	21
Fósforo total (60% antropogênico)	5.6
Fontes antropogênicas de metais para os sistemas aquáticos (10⁶ toneladas/ano)	
Zn, Cr, Ni, Cu, Cd, Hg	0.3 – 1
Fluxos antropogênicos que afetam a qualidade das águas (10⁶ toneladas/ano)	
Produção global de fertilizantes (2000)	140
Produção global de pesticidas	5
Produção de produtos químicos orgânicos sintéticos	300
Derramamentos de óleo (média 1980 – 2000)	0.4

A produção de alimentos para o consumo humano é uma atividade prioritária, mas também é uma das mais impactantes quando não são adotados procedimentos sustentáveis. Como exposto anteriormente, tal atividade é a que mais consome água e uma das que mais contribuem para a degradação qualitativa dos corpos d'água principalmente por causa do uso extensivo de fertilizantes e pesticidas, que alcançam os ecossistemas aquáticos por lixiviação, escoamento superficial, volatilização e precipitação, por exemplo (Thomas et al., 2001).

1.2. Ecotoxicologia

É evidente o aumento exponencial das atividades humanas como a agropecuária, industrialização, silvicultura, mineração, entre outras, promovidas principalmente pelo aumento do consumo nestas últimas décadas; e mais evidente ainda são os impactos, majoritariamente negativos, ocasionados principalmente pela introdução de substâncias tóxicas que refletem não só sobre os recursos naturais bem como na qualidade de vida de todos os organismos vivos em todos os compartimentos ecológicos, o que inclui o ser humano.

Devido a tais fatos, torna-se imprescindível a adoção de técnicas que permitam avaliar a extensão destas pressões antrópicas nos diversos ambientes, especialmente sobre as comunidades biológicas. Assim, para que se possa estabelecer medidas mitigadoras e orientar decisões, a ecotoxicologia é uma ferramenta importante que avalia prospectiva e retrospectivamente as atividades humanas por meio de bioensaios que utilizam organismos de diversos hábitos e níveis tróficos. Tal ferramenta é capaz de avaliar o impacto dos poluentes de acordo com as características do ecossistema estudado e também as interferências do ecossistema sobre as substâncias, característica muito importante na elaboração de cenários e predição de efeitos (Newman & Unger, 2003).

O termo Ecotoxicologia foi proposto inicialmente por Truhaut em 1969 (Truhaut, 1977), que considerava esta ciência como uma subdivisão da Toxicologia Tradicional que “estuda os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, a constituintes dos ecossistemas – animais (incluindo humanos), vegetais e microorganismos – em um contexto integrado” (Newman & Unger, 2003).

Para estes estudos, organismos – teste de diferentes níveis tróficos são utilizados em bioensaios, que são os principais instrumentos para que se possa avaliar os efeitos das substâncias nocivas e estabelecer as possíveis medidas mitigadoras (Azevedo & Chasin, 2003). Segundo Keddy et al. (1995), são exemplos de organismos – teste bactérias (i.e. *Vibrio fisheri*), algas (*Pseudokirchneriella subcaptata*), Moluscos (*Perna perna*), Crustáceos (*Daphnia sp.*, *Ceriodaphnia sp.*, *Hyallela azteca*, entre outros), Insetos (*Chironomus sp.*, *Hexagenia sp.*), peixes (*Danio rerio*, *Pimephales promelas*), organismos terrestres (*Eisenia sp.*, *Folsomia sp.*), além de muitas outras espécies de diferentes hábitos e nichos ecológicos.

Mas, em diversos casos - como em ações de controle e recuperação de ambientes degradados - há ainda a necessidade de integração dos diversos métodos de diagnóstico objetivando a identificação dos possíveis compostos responsáveis pela toxicidade. Assim a Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) ou TIE (Toxicity Identification Evaluations), vem sendo utilizada em diversas matrizes, especialmente águas superficiais e sedimentos de ambientes marinhos e continentais. Tal método integra ferramentas como análises químicas, fracionamentos e manipulações das amostras e testes de toxicidade (USEPA, 1991; Ankley & Burkhard, 1992; Botta-Paschoal, 2002).

A proposta original, de combinar os fracionamentos químicos com os testes de toxicidade, foi proposta por Walsh & Garnas (1983), mas a metodologia atual dividida em três fases distintas (caracterização, identificação e confirmação) foi formulada pela Agencia de Proteção Ambiental Norte – Americana (USEPA) no final da década de 80, como parte integrante dos protocolos de Avaliação da Redução de Toxicidade (*TRE – Toxicity Reduction Evaluation*) para o controle de substâncias tóxicas em estações de tratamento de efluentes municipais (USEPA, 1991, 1999) e efluentes industriais (USEPA, 1989). A partir de então, a metodologia vem sendo utilizada para identificar os compostos que causam toxicidade em outros tipos de matrizes, como amostras de água e sedimento dos ambientes marinhos e continentais, e em menor escala, solos e alguns tipos de resíduos sólidos, obtendo êxito na identificação de substâncias responsáveis pela toxicidade em mais de 90% das amostras ambientais e efluentes - municipais e industriais (Botta, 2006).

1.3. Área de Estudo

1.3.1. A Bacia Hidrográfica do Rio Mogi-Guaçu

Com área total de 17.460 km² a bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu (Figura 1) está localizada a nordeste do estado de São Paulo (14.653 km²) e sudoeste de Minas Gerais (2.650 km²), e envolve 53 municípios destes estados, direta e indiretamente (Gandolfi, 1971). Segundo Gandolfi (op. Cit.), os 15% da área total localizados no estado de Minas Gerais é denominada Bacia Hidrográfica de montante do Rio Mogi-Guaçu, e conseqüentemente formada por 3 microbacias: do Rio Mogi-Guaçu, do Rio Espiraiado e do Rio do Peixe. Tal bacia abrange 12 municípios, direta e indiretamente, entre eles: Monte Sião, Senador Amaral, Tocos do Moji e Bom Repouso (Brigante & Espíndola, 2003; Cunha *et al.*, 2007). Este último, Bom Repouso, destaca-se entre os demais pelo fato de abrigar, além das aproximadamente 700 nascentes em 231 Km² de seu território, as nascentes dos rios Mogi-Guaçu, Espiraiado e Peixe (Cunha, 2009).

A principal atividade econômica na bacia de montante do Mogi-Guaçu é a agricultura, com ênfase na produção de batata inglesa e morango, o que coloca o estado de

Minas Gerais como o maior produtor destes dois bens agrícolas a nível nacional (Rodrigues, 2007).

Por fazer parte da Serra da Mantiqueira e por apresentar Mata Atlântica intercalada com agrupamentos de araucárias como cobertura vegetal nativa (Brigante & Espíndola, 2003), além das nascentes dos principais rios da bacia se encontrarem neste local, a região é considerada Área Prioritária para a Conservação, indicada pelo Grupo de Fatores Abióticos de Minas Gerais (Costa, 1998). Entretanto, devido à expansão da agricultura e pecuária em terrenos de declividade elevada e conseqüente remoção da cobertura nativa e o uso extensivo de defensivos agrícolas, como agrotóxicos e fertilizantes, a região tem sofrido perdas quali-quantitativas em seus recursos naturais (Brigante & Espíndola, 2003; Rodrigues, 2007; Resende, 2009).

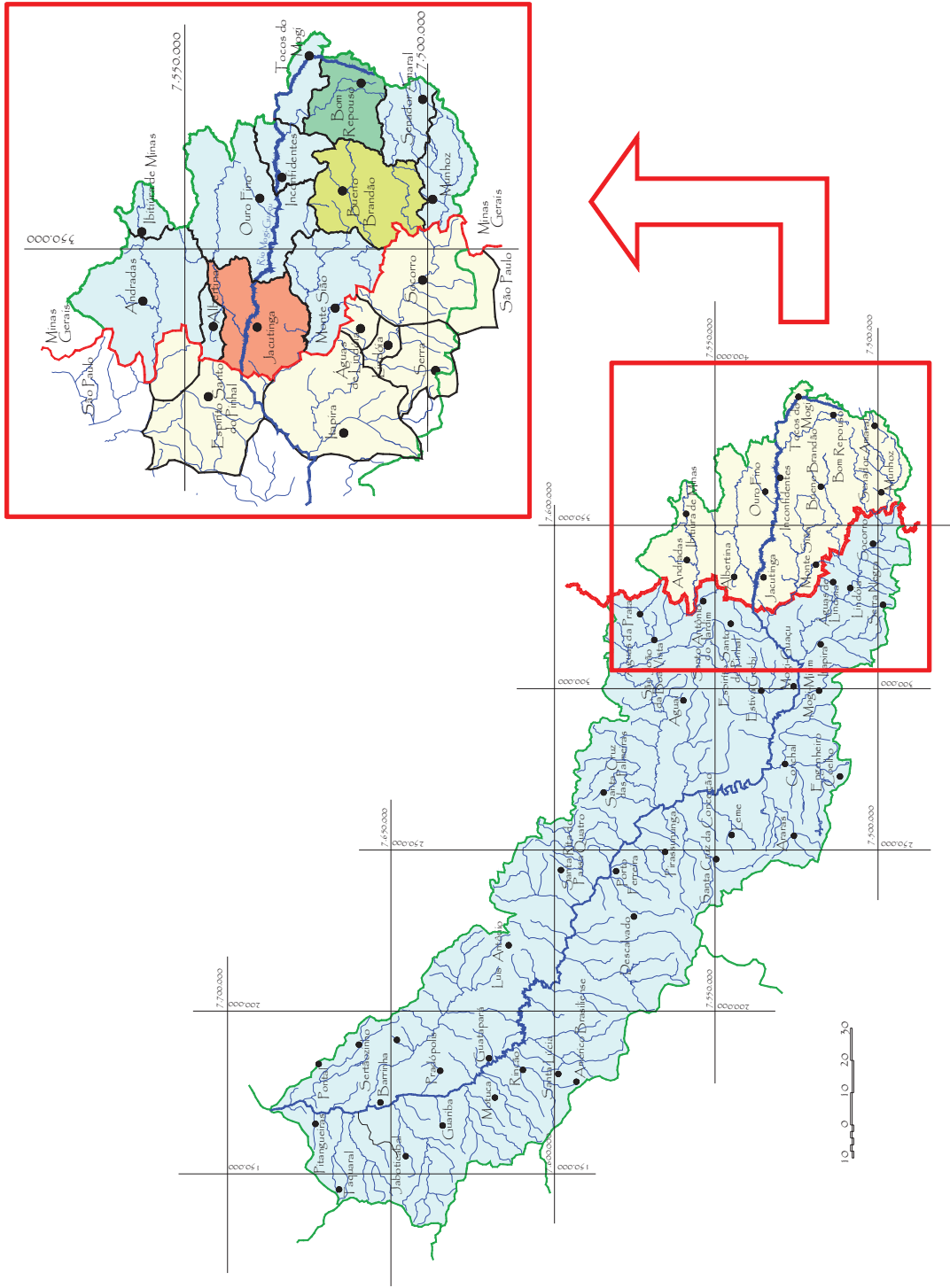


Figura 1. Mapa da Bacia Hidrográfica do Magi-Guaçu (abaixo) e mapa da região de Bom Repouso (em destaque, acima)

1.4. Estudos anteriores

Dentre os estudos mais recentes abordando a bacia do Rio Mogi-Guaçu, destacam-se os conduzidos por Brigante & Espíndola (2003), onde equipes multidisciplinares realizaram levantamentos e ações buscando a redução dos impactos ambientais e a melhoria da qualidade de vida da população inserida nesta bacia. Estes estudos fizeram parte do Projeto Mogi-Guaçu, iniciado em 2004.

Os autores identificaram diversas fontes de poluição pontuais e difusas ao longo da bacia. As fontes pontuais caracterizadas são, sobretudo despejos de esgotos sanitários dos municípios de entorno, além de efluentes industriais, ambos muitas vezes sem tratamento.

As possíveis fontes difusas são oriundas da atividade agrícola da região, especialmente na bacia hidrográfica de montante. Esta região, como foi citado anteriormente, é responsável pela maior parte da produção de batata inglesa e morango, culturas que exigem muito o uso de defensivos para o controle das pragas. São muitos os pesticidas usados neste tipo de cultura, em geral acaricidas, fungicidas, inseticidas e herbicidas. Segundo Nunes (com. pessoal, 2009), em entrevistas com os produtores da região de Bom Reposo, os pesticidas mais citados são classificados como medianamente a extremamente tóxicos, altamente persistentes e perigosos/muito perigosos (classe II e III) de acordo com a classificação ambiental do sistema AGROFIT (MAPA, 2010).

Em suma, o projeto apontou a poluição orgânica causada pelo lançamento crescente de esgotos sanitários sem tratamento, e chorume dos lixões, agravado pelo aumento populacional nas cidades integradas à bacia; por efluentes de indústrias; pela contaminação por metais nas diversas regiões da bacia (especialmente os altos valores de cádmio, cobalto, cromo, zinco e cobre em algumas estações de amostragem e em períodos variados), originários por atividades agrícolas e industriais; pela expansão agrícola em locais de alta declividade na bacia de montante, causando a remoção da cobertura vegetal nativa – o que agrava o processo erosivo - e pelo uso indiscriminado de agroquímicos nestas atividades (Brigante *et al.*, 2003).

Nos estudos ecotoxicológicos, realizados com microcrustáceos planctônicos (*Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*), organismos bentônicos (*Chironomus xanthus*) e ensaios

histopatológicos com peixes (*Serrapinnus notomelas* e *Danio rerio* não foi detectada toxicidade aguda na água. No entanto, nos testes com sedimento, os efeitos nos organismos foram mais pronunciados, como a imobilidade para *D. similis*, *C. dubia* e letalidade para *C. xanthus* (Espíndola *et al.*, 2003), e alterações no tecido branquial, renal e hepático para as espécies de peixes utilizadas no estudo (Meletti *et al.*, 2003).

Posteriormente, Rodrigues (2007) desenvolveu uma pesquisa com o enfoque na avaliação dos impactos causados por agrotóxicos em ensaios laboratoriais com o peixe *Danio rerio*. Foram realizados ensaios de toxicidade crônica (7dias) com os percolados de amostras de solo do município de Bom Repouso/MG, onde avaliou-se a sobrevivência, biometria e alterações histopatológicas nos organismos.

Os resultados mostraram que apesar de não haver efeito sobre a sobrevivência, foram encontradas diversas alterações histopatológicas nas brânquias dos organismos nos testes com percolados de solos com cultivo de batata inglesa, morango e até em solos dos locais com mata, evidenciando uma contaminação indireta – escoamento superficial, volatilização, entre outros processos – causada pelas atividades do entorno.

No período entre 2005 e 2007, Cunha (2009) realizou um estudo no município de Bom Repouso que buscou a caracterização socio-econômica, por meio de coleta de informações dos habitantes da região, quanto ao local das propriedades, profissão, grau de escolaridade, renda, número de familiares, entre outros; a caracterização sanitária, onde foram levantados dados sobre as condições do abastecimento de água para a população; e a caracterização ambiental dos corpos d'água e áreas de entorno, observando a presença de processos erosivos, caracterização dos impactos, condições das matas, o uso e o manejo dos recursos hídricos nas propriedades próximas.

Os dados levantados demonstraram que as 3 microbacias avaliadas apresentaram como principais impactos ambientais a disposição inadequada de esgotos sanitários e resíduos sólidos, a degradação de matas ciliares, a falta de práticas de manejos sustentáveis na agricultura, refletida no uso intensivo dos agroquímicos, além da falta de manejo do solo e recursos naturais. A autora destaca a microbacia do rio Espraiado “como prioritária para adoção de medidas corretivas e preventivas”, devido ao elevado número de doenças de veiculação hídrica entre os moradores da região; alto índice de coliformes fecais, em

desacordo com a portaria 518/04 do Ministério da Saúde; parâmetros da água (pH, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) também em desconformidade com os padrões estabelecidos pela legislação ambiental (Brasil, 2005) em muitas das nascentes estudadas na microbacia (Resende, 2009); e ocupações para fins agrícolas, residenciais e comerciais em Áreas de Proteção Permanente (APPs) como entorno de nascentes (50m) e margens de córregos (30m), reduzindo a vegetação para 10-50% em relação às exigências legais, enquadrando a área no status degradada a perturbada (Cunha, 2009).

Em complemento à pesquisa realizada por Cunha (2009), foram realizadas caracterizações de parâmetros físicos, químicos, biológicos na água e sedimento, e testes de toxicidade na água de diversas nascentes situadas no município. A pesquisa realizada por Resende (2009) amostrou 34 pontos distribuídos no município de Bom Repouso em dois períodos: em Janeiro e em Julho de 2008.

Os dados coletados mostraram que a maioria das nascentes estudadas encontrava-se em desacordo com algum critério de qualidade estabelecido pela legislação vigente. Para tal comparação, foram consideradas a portaria 518/04 do Ministério da Saúde, e as resoluções CONAMA 357/05 (Brasil, 2005) e CONAMA 396/08 (Brasil, 2008). Em geral, as nascentes apresentaram valores de oxigênio dissolvido (OD), pH e coliformes (totais e fecais) fora dos padrões estabelecidos, além de efeito tóxico crônico em diversos pontos, critério em desconformidade com a resolução CONAMA 357/05. Entre as nascentes que apresentaram efeito tóxico crônico, encontram-se majoritariamente nascentes da microbacia do rio Espreado, já antes citada como área prioritária para conservação devido às pressões antrópicas na região. Apesar de não haver ocorrência de metais e pesticidas em concentrações superiores aos limites estabelecidos pela legislação, há possibilidade destas substâncias induzirem efeitos deletérios às comunidades biológicas a longo prazo, o que torna imprescindível a adoção de medidas para a redução desses impactos e a recuperação das áreas degradadas (Resende, 2009).

Diante do exposto e considerando a importância das regiões de cabeceira para a manutenção do equilíbrio de toda a bacia hidrográfica e os resultados da avaliação ecotoxicológica de amostras de água de superfície do município de Bom Repouso – MG utilizadas para abastecimento e/ou irrigação, esse projeto pretendeu utilizar os

procedimentos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (TIE) para caracterizar os principais compostos ou grupos de compostos responsáveis pela toxicidade da água ou sedimento, contribuindo para a recuperação da qualidade da água, proteção da biota e minimização dos riscos ecológicos.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo da pesquisa foi caracterizar os principais grupos de substâncias relacionadas à toxicidade crônica da água e do sedimento de nascentes na região de Bom Repouso/MG por meio da Avaliação e Identificação de Toxicidade. Adicionalmente, procurou-se avaliar a eficiência desta técnica em amostras que apresentam baixos níveis de toxicidade para o organismo *Ceriodaphnia dubia*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA – AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE TOXICIDADE

3.1. Aspectos Metodológicos

3.1.1. Fase I

Consiste em uma série de manipulações que evidenciam as características físico – químicas das substâncias tóxicas e envolve as seguintes etapas: filtração, aeração, ajuste de pH, extração em coluna de octadecil (C18), graduação de pH, adição de EDTA e Tiosulfato de Sódio (Figura 2.). Segundo Botta et. al. (2006) é possível nestas etapas a identificação das classes de substâncias responsáveis pela toxicidade, como metais catiônicos, compostos voláteis, orgânicos apolares e substâncias pH – dependentes (Tabela 3).

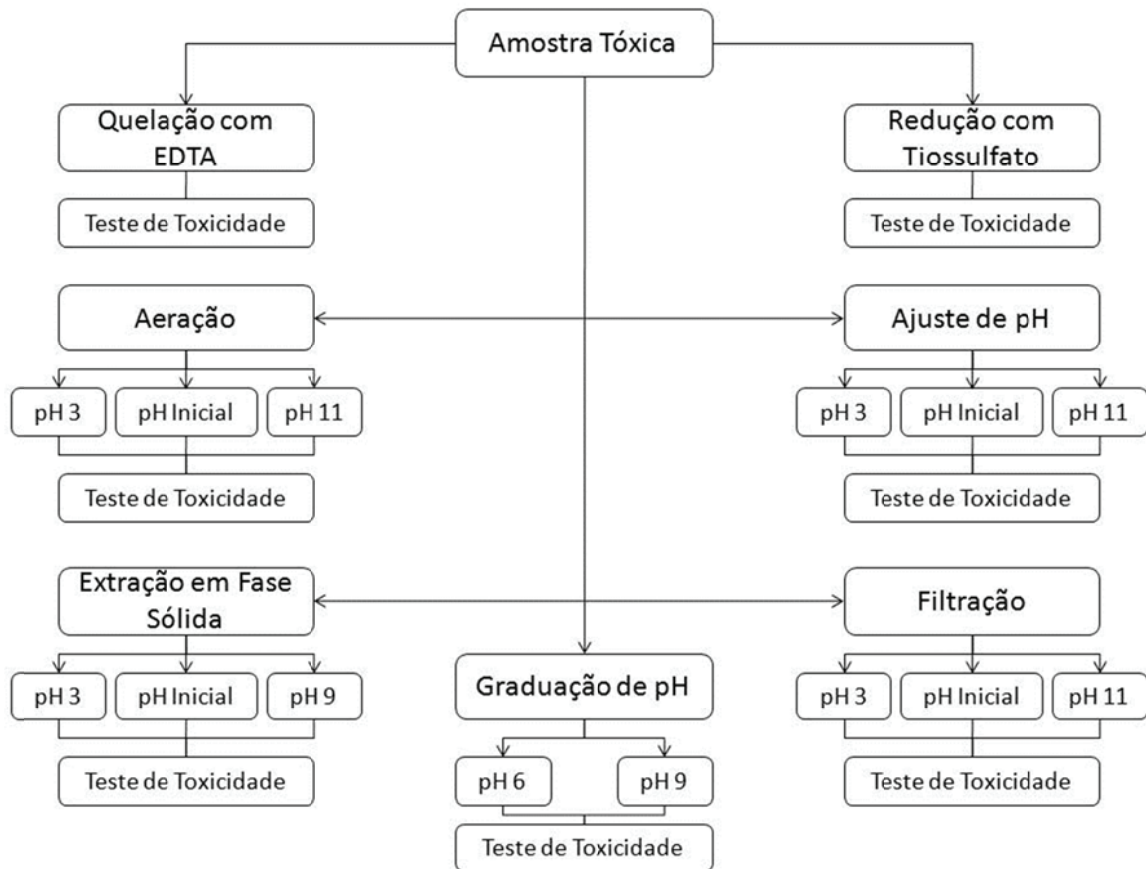


Figura 2. Etapas da Fase I da AIT (Adaptado de USEPA, 1991)

O tratamento com o Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) fornece evidências sobre a toxicidade de metais divalentes, devido sua capacidade de formar complexos não-tóxicos com os metais alumínio, manganês, zinco, cobalto, chumbo, ferro, cobre, bário, níquel e cádmio. O EDTA não tem afinidade com metais aniônicos e alguns metais catiônicos como prata, cromo e tálio (USEPA, 1991; Stumm & Morgan, 1981).

Para determinar a toxicidade causada por substâncias oxidantes é utilizada a adição de Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), que pode interagir com as formas de cloro, bromo, iodo, selênio e íons de manganês, e também interferir na biodisponibilidade de metais catiônicos como cádmio, cobre, mercúrio e prata (Hockett & Mount, 1996).

Na etapa de ajuste de pH são detectados compostos tóxicos catiônicos e aniônicos cujo comportamento é fortemente influenciado pelo pH. Substâncias que têm sua solubilidade, volatilidade, especiação e estabilidade modificadas ou são degradados frente

às mudanças de pH da amostra (pH 3 e 11) apresentam alterações na sua biodisponibilidade e consequente modificação na toxicidade (USEPA, 1991).

A etapa de graduação de pH, onde a amostra é ajustada para valores de pH dentro da faixa fisiologicamente tolerada pelo organismo-teste (pH 6-9), pode alterar a solubilidade e especiação de alguns metais, assim como o equilíbrio iônico de substâncias como amônia, sulfetos, cianetos e compostos orgânicos ionizáveis (USEPA, 1991). Segundo Ankley & Schubauer-Berigan (1995), a proporção de formas ionizadas e não ionizadas da substância pode mudar significativamente de acordo com a mudança do pH, modificando também sua toxicidade e propriedades físico-químicas.

A filtração fornece informações sobre poluentes associados ao material em suspensão ou aqueles que têm solubilidade dependente do pH (filtração com ajuste de pH). Tais compostos retidos no filtro podem ser recuperados posteriormente com a ultrasonificação dos filtros. A eluição pode ser feita com solventes, para a recuperação de compostos orgânicos, ou com o meio de cultivo ajustado em pH 3 quando os metais catiônicos são os possíveis responsáveis pela toxicidade (USEPA, 1991; Schubauer Berigan & Ankley, 1991).

Compostos voláteis, oxidáveis ou subláteis podem ser caracterizados nos testes de aeração (USEPA, 1991; Ankley & Burkhard, 1992). Testes complementares são feitos na diferenciação das tres classes de compostos. A diferenciação entre os compostos voláteis dos oxidáveis é feita aerando a amostra com nitrogênio: se ocorrer redução ou remoção da toxicidade também com nitrogênio, os compostos presentes são voláteis; caso contrário, os compostos presentes são oxidáveis (USEPA, 1991). A toxicidade dos subláteis pode ser recuperada após a lavagem das paredes dos recipientes de aeração (Ankley & Burkhard, 1992). Substâncias como surfactantes e resinas ácidas podem ser caracterizadas nesse processo (Ankley & Burkhard, 1992; Ankley & Schubauer-Berigan, 1995).

Para a caracterização de compostos orgânicos apolares, é utilizada a etapa de extração em fase sólida (SPE – Solid Phase Extraction). Em diferentes pHs da amostra (pH 3, pH 9 e pH inicial), a coluna de Octadecil-sílica (C18) pode remover compostos orgânicos apolares ou moderadamente apolares ácidos, básicos ou neutros (Botta-Paschoal, 2002). Os compostos retidos são eluídos com solventes específicos e a recuperação da toxicidade nos

extratos eluidos confirma a evidência da presença de compostos orgânicos apolares (Durhan *et al.*, 1993).

Tabela 3. Classes de compostos identificáveis nas manipulações da Fase I (Adaptado de Buratini et al., 2007).

Tratamento	Compostos Identificados
Quelação com EDTA	Metais catiônicos (Cr, Al, Cd, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Zn, entre outros)
Redução com Tiosulfato de Sódio	Oxidantes (cloro, peróxidos) e metais (Cu, Cd e Hg)
Extração em Fase Sólida	Compostos orgânicos não polares (solventes, pesticidas, fenóis)
Filtração	Sólidos Orgânicos filtráveis ou com solubilidade dependente do pH
Aeração	Voláteis (solventes orgânicos), oxidáveis (cloro) e sublúteis (surfactantes)
Ajuste de pH	sulfetos, cianetos, amônia, metais, compostos orgânicos
Graduação de pH	Amônia, sulfetos, metais, cianetos, substâncias orgânicas ionizáveis.

3.1.2. Fase II

As informações obtidas na fase I fornecem evidências que auxiliam na identificação das substâncias na fase II. Reduções na toxicidade após o tratamento com EDTA, por exemplo, orientam as metodologias de análises apropriadas para a identificação/quantificação de metais (Espectrofotometria de Absorção Atômica, Plasma Indutivamente Acoplado) ou testes complementares podem ser feitos com resinas de troca iônica, fornecendo evidências mais fortes para as análises quali-quantitativas (USEPA, 1993a). Diversas técnicas de fracionamento, concentração e detecção para substâncias orgânicas apolares podem ser empregadas, como Cromatografia Gasosa, Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência, Espectroscopia de Massa acoplada à cromatografia, etc (Lukasewycz & Durhan, 1992; Durhan et al., 1993; USEPA, 1993a; Muñoz et al., 1994; Thomas et al., 2001).

3.1.3. Fase III

O objetivo da fase III da AIT é confirmar as substâncias caracterizadas na fase I e identificadas na fase II. Segundo Botta (2006) esta é a etapa mais crítica da AIT, pois artefatos ou erros nos procedimentos nas fases anteriores podem levar a falsos resultados sobre os compostos tóxicos.

Outras técnicas de separação, seguidas de testes de toxicidade também podem ser empregadas para a identificação de substâncias como o uso de resinas específicas como a Zeólita para a identificação de amônia (Besser et al, 1998; USEPA, 1993a), Chelex-100 e Amberlite para substâncias cationicas ou aniônicas (Andersen, 2004; Onikura, 2007; USEPA, 1993a).

A correlação é uma ferramenta estatística muito utilizada nesta fase. São feitas relações entre a toxicidade observada e a concentração das substâncias na amostra. Por meio de testes de sensibilidade com estas substâncias em meio de cultivo ou amostra real contaminada (*Spiked*) pode-se encontrar um padrão de toxicidade da substância que se assemelha com a amostra. Sensibilidade de duas ou mais espécies, de diferentes hábitos também são utilizados neste estudo e fornecem informações sobre o comportamento da toxicidade (USEPA, 1993b; Ankley & Schubauer-Berigan, 1995). Procedimentos utilizados na fase I da AIT – como SPE, aeração, filtração, tratamento com resinas - em amostras contaminadas (*Spiked*) com o toxicante também fornecem evidências confirmatórias, pois revelam o comportamento geralmente inerente de certas substâncias frente a um tratamento específico. Além disso, outra ferramenta utilizada na fase III é o estudo comportamental das espécies na amostra tóxica, pois revela padrões que podem ser comparados entre a amostra real e a amostra contaminada com o toxicante suspeito.

Segundo Ankley & Schubauer-berigan (1995), o balanço de massa também pode ser utilizado na confirmação quando a toxicidade é removida ou reduzida na amostra e recuperada subsequentemente, como na SPE, filtração ou fracionamento por HPLC. Cada

fração destes testes é testada separadamente e os resultados de perda de toxicidade comparados à toxicidade total, estimando-se a contribuição de cada substância identificada na toxicidade total da amostra (USEPA, 1993; Jin et al., 1999; Yang et al., 1999).

A Zeólita é uma resina natural ou sintética composta principalmente por silicatos e alumina que formam uma estrutura com carga negativa (Burgess et al, 2004), utilizada largamente em estudos de AIT em casos de suspeita de toxicidade por Amônia e alguns metais (Badaró-Pedroso, 1999). Burkhard & Jenson (1993) utilizaram a zeólita em efluentes municipais tanto na fase II, como forma de identificar a amônia por meio de testes de toxicidade, e na fase III, combinando-a com os testes de comparação entre sensibilidades e contaminação da amostra (Spiked test) com a substância em questão. Ankley e colaboradores (1990) utilizaram-na como forma de confirmar (fase III) a toxicidade da amônia em amostras de sedimento do complexo Rio Fox-Baía Green, assim como Botta-Paschoal (2002), que utilizou em amostras de sedimento dos reservatórios de Salto Grande e Rasgão no Brasil; Badaró-Pedroso (1999) fez uso da zeólita na fase III com efluentes de uma indústria petroquímica.

3.2. Produção Científica Relacionada à AIT

A identificação dos principais compostos causadores da toxicidade é um fator importante para a tomada de medidas e adoção de procedimentos específicos. Dessa forma, os procedimentos de AIT têm sido utilizados com sucesso na gestão e gerenciamento de efluentes industriais, municipais, amostras ambientais, como águas superficiais e sedimentos de ambientes marinhos ou continentais.

Em relação à produção científica, foi levantado um total de 136 trabalhos publicados em periódicos que fazem o uso desta técnica em diversas matrizes. Em relação à produção por países, as instituições e pesquisadores dos EUA foram os que mais publicaram no período entre 1983 e 2010, correspondendo à aproximadamente 56% do total. Na figura 3, é apresentado um gráfico com a quantidade de trabalhos publicados por continente. Em geral, a América do Norte, representada pelos EUA e Canadá, têm juntos 62% do total, seguida pela Europa (Alemanha, Bélgica, Croácia, Espanha, Holanda, Itália, Reino Unido e

Suécia) com 25%, Ásia e Oceania (China, Japão, Coréia do Sul e Austrália) com 10% e América do Sul (Brasil e Chile) e América Central (Trinidad e Tobago) com 3% e 1%, respectivamente.

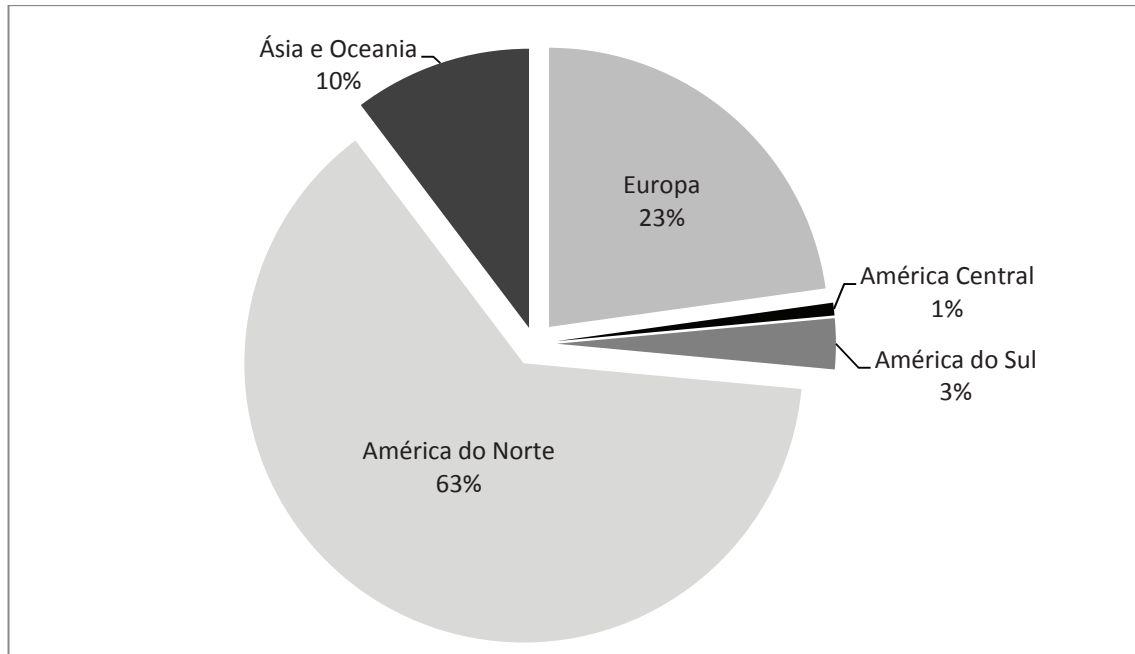


Figura 3. Trabalhos científicos sobre AIT publicados em revistas periódicas no período entre 1983-2010 (n=136).

Analisando separadamente a produção científica de cada país (Figura 4), observa-se que os EUA é o que apresenta maior volume de trabalhos científicos na área (56%), seguido pelo Reino Unido (6,4%), Canadá (5%), China (4,3), Espanha, Itália e Suécia (3,6), Japão, Holanda e Alemanha (2,9); Brasil e Coréia do Sul (2,1); Austrália, Chile e Trinidad e Tobago (0,7).

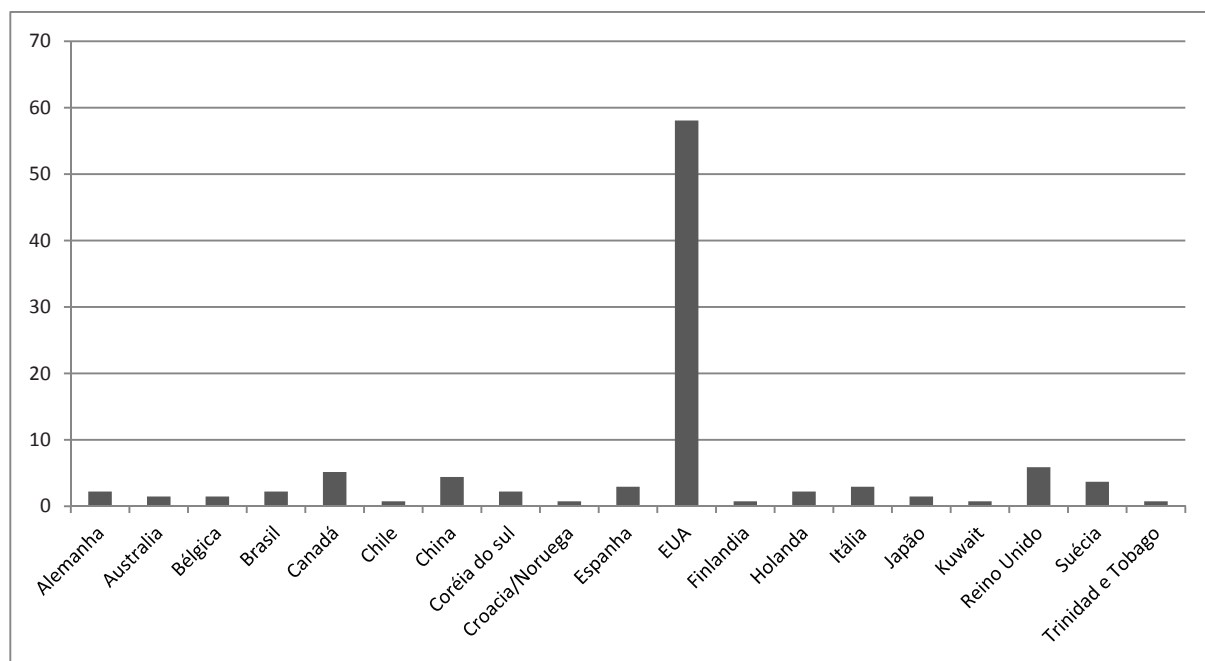


Figura 4. Participação dos países na produção de trabalhos científicos sobre AIT publicados em revistas periódicas no período entre 1983-2010 (n=140).

3.3. Principais Aplicações da Avaliação e Identificação de Toxicidade

3.3.1. Identificação de Substâncias Tóxicas em Efluentes Industriais e Municipais

Em efluentes de indústria têxtil, Wells e seus colaboradores (1994) aplicaram os fracionamentos da AIT e identificaram uma especiação aniônica do Zinco (usada em um dos processos de produção) como principal responsável pela toxicidade aguda do efluente para *Daphnia pulex*. O estudo de AIT realizado por Douglas *et al.* (1996) em efluentes de indústria petroquímica lançados em um estuário mostrou que o metal Estanho foi o responsável pela toxicidade ao crustáceo *Mysidopsis bahia*. O metal foi identificado por meio de tratamento da amostra com resinas de troca iônica e o efeito tóxico foi agravado pela deficiência de íons essenciais como Potássio e Magnésio, e excesso de Cálcio. No Japão, estudos feitos por Onikura *et al.* (2007) com um efluente de uma indústria de papel e celulose utilizaram resinas e reagentes para a quelação específica de alguns metais. Os resultados da redução de toxicidade por estas técnicas, aliados às análises quantitativas de metais, sugeriram que o Níquel foi o principal responsável pela toxicidade deste efluente. Outro exemplo de utilização da AIT na análise de risco de efluentes foi o estudo realizado por Mount & Hockett

(2000), em uma matriz complexa oriunda de uma indústria nos Estados Unidos. Os autores identificaram e confirmaram como principal agente tóxico o Cromo Hexavalente. Para isto, além das técnicas de quelação com EDTA, os autores utilizaram resinas de troca aniônica e carvão ativado.

Em efluentes de uma indústria química chinesa foram identificados em primeira instância compostos orgânicos não – polares. Após análises quali - quantitativas por Cromatografia Gasosa/Espectroscopia de Massa (GC/MS), foi revelada a presença de clorobenzeno, nitrobenzeno, naftaleno, Cloro - nitrobenzenos, 2-naftol e anilina. O teste de balanço de massa realizado na fase III confirmou essas substâncias como toxicantes primários (Yang *et al.*, 1999). Nos efluentes de outra indústria do mesmo setor que a citada acima também foram caracterizados poluentes orgânicos não polares, posteriormente identificados como benzopirenos e fenóis. A utilização de balanço de massas na fase III da AIT, mostrou que 44,6% e 32,9% da toxicidade do efluente eram devidos ao benzopirenos e fenóis, respectivamente (Jin *et al.*, 1999). Esses resultados indicaram que esta classe de substâncias químicas é um problema muito difundido e que medidas devem ser implementadas para o seu controle enquanto são descartadas (Jin *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Na Espanha, foram utilizadas técnicas de Micro Extração em Fase Sólida (SPME) para a identificação de compostos orgânicos presentes em uma estação de tratamento de efluentes domésticos e industriais (Fernández *et al.*, 2004). Os principais compostos isolados foram os pesticidas Diazinon e Quinalphos, além de outras 30 substâncias orgânicas como Fenóis, Ftalatos, Benzenos, Tolueno Diisocianato, entre outros.

São encontrados em efluentes domésticos uma grande variedade de substâncias nocivas como surfactantes, amônia, orgânicos sintéticos e desreguladores endócrinos. Os surfactantes são largamente utilizados em diversos produtos, principalmente como detergentes, cosméticos e carreadores de pesticidas, mas prejudicam a biota aquática (Ostroumov, 2006). São substâncias tensoativas e possuem em suas moléculas uma estrutura polar (que dissolve – se facilmente em água) e uma não polar, o que lhe propicia características hidrofóbicas e hidrofílicas em uma mesma molécula (Ying, 2005). Essas substâncias foram identificadas em sistemas de tratamento secundário que recebem efluentes domésticos, e em conjunto com o cloro, são responsáveis pela toxicidade destes efluentes (Ankley & Burkhard, 1992). Foi observado que o tratamento secundário em

questão conseguia reduzir significativamente a toxicidade destas duas substâncias, porém, o tratamento primário não era eficiente para a redução da toxicidade. Segundo Duarte (2006) os surfactantes podem apresentar risco às bactérias aeróbias ou anaeróbias dos sistemas de tratamento devido à sua ação sobre as reações enzimáticas, membranas e excreções celulares.

Substâncias estrógenas também são comumente encontradas nestes efluentes, principalmente hormônios naturais (17β – estradiol e Estrona) e sintéticos (17α – etinilestradiol) verificados por Desbrow *et al.* (1998), além de alquilfenóis, benzofenona, metilparabeno e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos identificados por Grung *et al.* (2007). Outros estudos com efluentes municipais revelaram também a toxicidade causada por amônia, cloro e Diazinon sendo este último um pesticida largamente usado no controle de baratas, formigas, besouros, pulgas, carrapatos e nematódeos (Burkhard & Jenson, 1993; Amato *et al.*, 1992).

3.3.2. Identificação de substâncias tóxicas na água e no sedimento

Muñoz e colaboradores (1994) realizaram procedimentos de AIT para solucionar um caso de mortandade de peixes no rio Tajo, Espanha. Para tal estudo, os autores realizaram testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e o teste de citotoxicidade in vitro RTG-2, que utiliza células de Truta Arco-íris. Foi verificada a remoção da toxicidade na filtração e subsequente recuperação quando o material particulado foi ressuspensão. Após a extração líquido-líquido e as análises no HPLC, revelou-se a presença do Ácido Dehidroabiético, uma resina ácida encontrada comumente nos efluentes oriundos das indústrias de celulose e papel (Pritchard *et al.*, 1991; Rissanen *et al.*, 2003) e outros efluentes (Muñoz *et al.*, 1994).

Riveles & Gesberg (1999) realizaram estudos para caracterizar os compostos responsáveis pela toxicidade em amostras do rio Tijuana – fronteira entre Estados Unidos e México - no período seco e chuvoso. Para tal objetivo, foi aplicada a fase I do protocolo de AIT (USEPA, 1991). Nas duas campanhas, etapas de filtração, aeração, tiosulfato de sódio e EDTA não apresentaram diferenças significativas de remoção de toxicidade em relação aos testes com amostra sem tratamento. Entretanto, os testes com C18 mostraram eficiência na

redução de toxicidade no pH inicial, 3 e 11. Gesberg e colaboradores (2004) novamente aplicaram a fase I da AIT com amostras coletadas de janeiro a abril de 2001. Os autores obtiveram resultados similares aos do estudo anterior, com redução da toxicidade na SPE e subsequente recuperação após eluição com metanol. As amostras coletadas em março também apresentaram significativa redução de toxicidade na etapa de aeração (pH inicial e pH 11) e janeiro (pH 11), indicando nos dois estudos a toxicidade de orgânicos apolares como surfactantes, hidrocarbonetos e pesticidas (RIVELES & GESBERG, 1999; GESBERG et al., 2004).

Os procedimentos da AIT foram utilizados por Thomas et al. (2001) para investigar os possíveis contaminantes que prejudicavam a qualidade de um córrego na Inglaterra. As amostras, coletadas após dois picos de chuva durante a primavera, foram concentradas e fracionadas usando SPE e HPLC semi-preparativa, respectivamente, submetidas em seguida a testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Os concentrados de ambas as amostras apresentaram toxicidade aguda, especialmente o segundo, que apresentou maior toxicidade. Segundo Thomas e colaboradores (2001), o fracionamento por HPLC possibilitou a identificação das principais frações tóxicas das duas amostras, revelando uma correlação entre a toxicidade e o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) das substâncias orgânicas. Com estas informações e os dados das análises químicas, os autores chegaram à conclusão que o pesticida Diuron foi o principal responsável pela toxicidade no primeiro e no segundo período de amostragem. Os principais toxicantes da segunda coleta foram o surfactante Nonilfenol e os pesticidas Endosulfan Sulfato e Pendimethalin. O Nonilfenol é utilizado em diversas formulações, principalmente como carreador de pesticidas, proporcionando ao composto maior solubilidade em água (Thomas et al., 2001; Oustromov, 2006). Esta substância também tem a propriedade de afetar adsorção dos compostos à matéria orgânica do solo, causando a liberação de pesticidas ligados ao solo, como o Endosulfan Sulfato (Thomas et al., 2001). Essas substâncias, geralmente relacionadas à agricultura, alcançam os córregos através do carreamento e drenagem durante as chuvas (Willians et al., 1995)

Outro exemplo de aplicação da AIT pode ser observado no trabalho de Norberg-King et al. (1991) com amostras de água da Bacia de Drenagem Colusa, área influenciada pelo rio Sacramento – Califórnia/EUA. A água desse rio é utilizada para a irrigação das

culturas de arroz, situadas em um vale à montante do local de estudo. Outros estudos já indicavam na região a presença de pesticidas como o Parathion (etil e metil), Simazine, Carbofuran, entre outros (PHILLIPS, 1987 apud NORBERG-KING et al., 1991). O fracionamento consistiu apenas em filtração - através de filtros de Fibra de vidro - e Extração em Fase Sólida com coluna C18, eluídas em frações de metanol/água. As alíquotas foram testadas e revelaram redução total da toxicidade nas amostras pós-coluna e conseqüente recuperação de toxicidade nas frações de metanol/água, especialmente na fração 80% de metanol. As análises feitas por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa identificaram Carbofuran e seu metabólito (Carbofuran Fenol), Metil Paration e Molinate, corroborando com os resultados obtidos por Phillips (1987 apud NORBERG-KING et al., 1991). Para a Fase III da AIT, os autores realizaram testes de sensibilidade com cada um dos compostos identificados na fase anterior. Os resultados foram correlacionados com a concentração encontrada nas amostras e confirmaram que estes pesticidas, especialmente o Carbofuran e o Metil Parathion, foram os responsáveis pela toxicidade nas amostras.

Outro trabalho foi realizado na Califórnia por Anderson et al. (2006) no rio Santa Maria, que recebe água de escoamento superficial oriunda de áreas ocupadas por agricultura. Na fase I da AIT, a centrifugação, a extração em fase sólida com C18 e a adição de Piperonyl Butoxide foram os tratamentos mais eficientes na redução da toxicidade nas amostras do rio Santa Maria e do estreito Orcutt, o que indicou toxicidade relacionada a compostos orgânicos. Diversos pesticidas organoclorados e organofosforados, como o dieldrin, DDT, endosulfan, endrin, parathion, malathion e chlorpiryfos foram detectados nas amostras com concentrações abaixo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, mas apenas este último foi encontrado em concentrações capazes de causar toxicidade aguda para *C. dubia*. A redução da toxicidade das amostras de água intersticial para *Hyallela azteca* após o tratamento com C18, evidenciou a toxicidade causada por compostos orgânicos apolares. Entretanto, a recuperação da toxicidade pela eluição da coluna não foi eficiente, bem como as adições de PBO e da Enzima Carboxylesterase - cuja ação inibe a toxicidade de pesticidas piretróides (WHEELOCK et al., 2004) - não reduziram a toxicidade, indicando um provável efeito combinado entre o Chlorpiryphos e pesticidas piretróides.

Os primeiros estudos de AIT em sedimentos foram executados por Ankley et al (1990) no rio Fox/Green Bay, Winsconsin. A partir dos resultados de testes com os ajustes de

pH, análises químicas e tratamento com zeólita foi possível concluir que a amônia foi o principal composto responsável pela toxicidade. Schubauer-Berigan & Ankley (1991) aplicaram a metodologia de AIT em água intersticial e elutriados de sedimentos do canal Cal-Sag, que liga um lago ao rio Illinois, EUA. Os autores identificaram que a toxicidade para *C. dubia* era proveniente de substâncias como amônia, metais e compostos orgânicos apolares identificados na fase II. Em um estudo mais recente realizado com amostras de sedimentos de uma lagoa na Itália, Picone et al. (2008) também identificaram a amônia como principal toxicante, além de metais para alguns pontos amostrais. Os autores testaram duas sequências diferentes, onde a ordem dos tratamentos era modificada: a primeira seqüência consistia em Adição de Tiosulfato e EDTA, filtração, SPE e remoção de amônia com alga *Ulva rigida*, enquanto na segunda seqüência o tratamento com a alga era realizado antes dos outros tratamentos. Os autores concluíram que o segundo tratamento apresentava melhores resultados quando a toxicidade era causada majoritariamente por amônia, mas quando a toxicidade era causada por metais, as duas seqüências obtiveram resultados bem semelhantes.

No lago Orta, região norte da Itália, foi realizado outro estudo de identificação de toxicidade com amostras de água intersticial e testes com *V. fisheri*. O procedimento de AIT, modificado neste trabalho conduzido por Guzzela et al. (1996), atribuiu a toxicidade a três classes de compostos: sólidos em suspensão, metais e orgânicos apolares. Testes realizados com sedimentos do rio Passaic nos Estados Unidos também foram submetidos aos fracionamentos da AIT e testados com os organismos *Vibrio fisheri* (bactéria luminescente), além do anfípoda *Ampelisca abdita*. Os resultados indicaram toxicidade causada por compostos orgânicos neutros associados ao material particulado (KAY et al., 2007)

Um outro exemplo de estudos em sedimentos foi realizado por Weston et al. (2007) na enseada Del Puerto, Califórnia/EUA, que recebe por escoamento superficial a água de irrigação das plantações do entorno. Estudos anteriores indicaram toxicidade dos sedimentos e sua contaminação por diversos pesticidas. Desta forma, foi conduzido um estudo de Avaliação e Identificação de toxicidade específica para pesticidas piretróides que incluem manipulações de temperatura, além das adições de Piperonyl Butoxide e Esterase. Com esses procedimentos foi possível evidenciar a ação tóxica dos piretróides, e por meio de técnicas de cromatografia gasosa o pesticida Bifenthrin foi identificado como toxicante

primário, além de outros piretróides coadjuvantes como o Lambda-Cyhalothrin, Esfenvalerate e Cyfluthrin.

Phillips e seus colaboradores (2006) utilizaram além da adição de Piperonyl Butoxide outras técnicas de identificação de pesticidas, como a adição da enzima Carboxylesterase, a resina Ambersorb 563 e carvão ativado de côco (Coconut Charcoal) em testes com sedimentos do estreito Orcutt, acima da confluência com o rio Santa Maria, Califórnia/EUA, local por onde escorre a água das chuvas e carregam os resíduos provenientes da agricultura. Os tratamentos com a resina e o carvão obtiveram reduções significativas na toxicidade para *Hyalella azteca*, o que caracterizou que um ou mais compostos orgânicos foram responsáveis pela toxicidade. A adição de Piperonyl Butoxide aumentou a toxicidade enquanto a adição de Carboxylesterase reduziu-a. Esses resultados sugerem fortes evidências sobre toxicidade causada por pesticidas piretróides, com uma possível combinação com o organofosforado Chlorpyrifos.

Na tabela 4 é mostrado um sumário dos estudos de Avaliação e Identificação de Toxicidade citados anteriormente, com os tipos de amostras e as principais substâncias identificadas.

Tabela 4. Resumo dos tipos de amostras e respectivos toxicantes identificados em estudos de AIT. A=Água; SI=Sedimento (Água Intersticial); SE=Sedimento (Elutriato); ST=Sedimento Total; EM=Efluente Municipal; EI=Efluente Industrial.

Amostra	Substância(s) Identificada(s)	Referência
A	Ácido Dehidroabiético	MUÑOZ <i>et al.</i> , 1994
A	Orgânicos Apolares	RIVELES & GESBERG, 1999
A	Orgânicos Apolares	GESBERG <i>et al.</i> , 2004
A	Nonilfenol, Endosulfan Sulfato e Pendimethalin	THOMAS <i>et al.</i> , 2001
A	Carbofuran e Metil Parathion	NORBERG-KING <i>et al.</i> , 1991
A/SI	Chlorpiryphos e pesticidas piretróides	ANDERSON <i>et al.</i> , 2006
SI	Amônia	ANKLEY <i>et al.</i> , 1990
SI/SE	Amônia, Orgânicos Apolares e Metais	SCHUBAUER-BERIGAN & ANKLEY, 1991
SI	Compostos Orgânicos no Material Particulado	KAY <i>et al.</i> , 2007
SI	Amônia e metais	PICONE <i>et al.</i> , 2008
SI	Metais e Orgânicos apolares	GUZZELA <i>et al.</i> , 1996
ST	Pesticidas Piretróides	WESTON <i>et al.</i> , 2007
ST	Pesticidas Piretróides e Organofosforados	PHILLIPS <i>et al.</i> , 2006
EI	Zinco	Wells <i>et al.</i> , 1994
EI	Estanho, Potássio e Magnésio	Douglas <i>et al.</i> , 1996
EI	Níquel	Onikura <i>et al.</i> , 2007
EI	Cromo Hexavalente	Mount & Hockett, 2000
EI	Benzenos, naftaleno, 2-naftol e anilina	Yang <i>et al.</i> , 1999
EI	Benzopirenos e fenóis	Jin <i>et al.</i> , 1999
EM/EI	Pesticidas (Diazinon e Quinalphos)	Fernández <i>et al.</i> , 2004
EM	Surfactantes e cloro	Ankley & Burkhard, 1992
EM	Hormônios, alquilfenóis, benzofenona, metilparabeno e HPAs	Desbrow <i>et al.</i> , 1998
EM	Amônia, cloro e Diazinon	Burkhard & Jenson, 1993

3.3.3. A AIT na América Latina

Estudos na América do Sul, feitos por países como o Brasil e o Chile representam apenas 3% do total de trabalhos publicados em periódicos no mundo. No Brasil, a grande maioria dos trabalhos desenvolvidos é reportada em outros meios de divulgação como

dissertações, teses e capítulos de livros. A seguir são descritos os trabalhos sul-americanos sobre AIT, especialmente os desenvolvidos no Brasil e o resumo dos resultados obtidos são apresentados na tabela 5.

No Brasil, o primeiro estudo de Avaliação e Identificação de Toxicidade foi feito por Badaró-Pedroso (1999) com efluentes de uma indústria petroquímica. Foram feitos ajustes de pH (6.5, 7.5 e 8.5), filtração, extração em fase sólida com coluna C18, adição de EDTA e Tiosulfato de sódio e as amostras submetidas aos fracionamentos foram testadas com três espécies de ouriços-do-mar: *Strongylocentrus purpuratus*, *Lytechinus variegatus* e *Arbacia puctulata*. Os tratamentos indicaram que os compostos orgânicos apolares e amônia foram os principais compostos responsáveis pela toxicidade e os metais e as substâncias associadas ao material particulado contribuíram em menor proporção com a toxicidade das amostras. Os tratamentos com Zeólita e com a alga *Ulva lactuca* foram utilizados na confirmação da amônia (Fase III).

Pires (2006) realizou um estudo que abrangeu efluentes líquido do pólo industrial de Belfor Roxo/RJ e o Rio Sarapuí, também localizado na região e onde são despejados estes efluentes. No estudo, foi aplicado o procedimento completo da fase I proposta pela USEPA (1991), além do emprego de resinas de troca iônica em testes agudos com *Daphnia similis*. No efluente, o autor observou reduções de toxicidade nas etapas de Filtração (pH inicial e 11), Aeração (pH 3 e inicial) e uma acentuada redução com a amostra tratada com resina aniônica. Tais resultados sugerem a influência de ânions (como cloreto e sulfeto) na toxicidade final do efluente, além dos sólidos suspensos. Na fase II, o ion Cloreto foi identificado nas análises químicas em concentrações acima de 4000 mg L⁻¹. Para as amostras do Rio Sarapuí, a fase I indicou os Sólidos Suspensos, a Amônia e Sulfeto de Hidrogênio como principais toxicantes, especialmente de acordo com os resultados de redução de toxicidade na filtração (todos os pHs), ajustes de pH (3 e 11) e aerações (todos os pHs).

Os efluentes industriais também foram o objetivo de estudos realizados por Furley (2009), que analisou efluentes de diversas etapas do tratamento de água residuárias de 4 indústrias produtoras de Celulose e Papel. O procedimento completo de caracterização de toxicidade foi aplicado e avaliado por meio de ensaios com *Ceriodaphnia dubia* e com o

ouriço marinho *Echinometra lucunter*. O balanço geral da toxicidade dos efluentes destas 4 indústrias revela que os principais compostos responsáveis são os sólidos dissolvidos, amônia, metais e oxidantes, além dos compostos voláteis e sólidos suspensos geralmente gerados nos processos da Estação de Tratamento Biológica.

Outro estudo com efluentes foi realizado no Chile por Cooman e colaboradores (2003), que avaliaram e identificaram a toxicidade de efluentes gerados por curtumes. Os testes com *Daphnia pulex* revelaram que os seguintes tratamentos obtiveram mais de 40% de redução na toxicidade: ajuste de pH 3, graduação de pH (6,9), aeração (pH inicial, 3 e 11), filtração (pH 3) e tratamentos com resinas de troca iônica. Van Sprang & Janssen (1997) e Burgess et al. (2003) consideram que a redução da toxicidade pós tratamento com resinas catiônicas e aeração, principalmente em pHs básicos, são fortes evidências que a toxicidade tenha sido causada por amônia. Além desta substância, os autores também encontraram evidências que o cloro contribuía na toxicidade final do efluente.

Em ambientes aquáticos, Botta-Paschoal (2002) realizou um estudo completo de AIT (fase I, II e III) em elutriatos de sedimentos dos reservatórios de Barra Bonita, Rasgão e Salto Grande, estado de São Paulo. Os organismos-teste utilizados no estudo foram a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* e o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*.

No reservatório de Barra Bonita, as amostras submetidas à aeração em pH 3 e 11, às graduações de pH (pH 6 e 9) e adição de EDTA obtiveram reduções totais na toxicidade, caracterizando a presença de metais como cobre, chumbo, níquel zinco ou cádmio.

Em dois reservatórios (Salto Grande e Rasgão) a amônia foi identificada como responsável pela toxicidade causada à *C. dubia*. A perda de toxicidade nos testes após os ajustes de pH e ajuste/aeração em pH 7 e 11, as análises químicas para determinação dos teores de amônia, e a redução da toxicidade após o tratamento das amostras com zeólita (fase III) confirmaram a evidência da amônia. Além da amônia, compostos ácidos voláteis e orgânicos apolares (como o benzotiazolinone e nonilfenol, identificados nas amostras de água intersticial) foram responsáveis pela toxicidade para *V. fischeri* (Botta-Paschoal, 2002; Araújo, 2006).

Em estudos apresentados por Botta-Paschoal (2002) e Botta-Paschoal et al. (2004) no reservatório de Salto Grande, os resultados revelaram uma possível interação entre os compostos tóxicos e o pH ácido das amostras. Substâncias como alguns metais e amônia apresentam aumento da toxicidade em meio ácido, devido principalmente a biodisponibilização ou mudança para suas formas mais tóxicas como ocorre com a amônia.

Buratini e colaboradores (2007) utilizaram a metodologia de AIT (fase I e II) em amostras de água do rio Baquirivu-Guaçu, Bacia do Alto Tietê/SP. e os resultados da caracterização apontaram para compostos orgânicos apolares em duas amostras e metais catiônicos para uma amostra. A redução da toxicidade após tratamento com EDTA, mas não com tiosulfato de sódio (substância que não interfere na toxicidade do zinco) e a as concentrações detectadas nas amostras, confirmaram o zinco como o metal responsável pela toxicidade.

Recentemente, Nilin (2009) utilizou um procedimento simplificado de AIT (adição de EDTA e Tiosulfato de Sódio, filtração, aeração e adição de *Ulva sp*) em elutriatos de amostras de sedimento do estuário do Rio Ceará. Os testes realizados com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* mostraram que nos 4 pontos de amostragem, os principais compostos causadores da toxicidade foram substâncias cloradas, metais (Cu e Mn) e amônia, confirmada pelo tratamento com *Ulva sp*.

Tabela 5. Resumo dos tipos de amostras e respectivos toxicantes identificados em estudos de AIT na América do Sul. AS=Água doce superficial; SI=Sedimento (Água Intersticial); SE=Sedimento (Elutriato); SE-E=Sedimento Estuarino (Elutriato); EI=Efluente Industrial

Amostra	Substância(s) Identificada(s)	Referências
EI	Compostos orgânicos apolares e amônia	Badaró-Pedroso (1999)
EI	Sólidos dissolvidos, amônia, metais, oxidantes, compostos voláteis e sólidos suspensos	Furley (2009)
EI	Amônia e Cloro	Cooman et al. (2003)
SE	Metais, amônia, compostos ácidos voláteis e orgânicos apolares	Botta-Paschoal (2002); Botta-Paschoal et al. (2004)
SI	Amônia, compostos ácidos voláteis e orgânicos apolares	Araújo et al, 2006
AS	Compostos orgânicos apolares e metal (Zinco)	Buratini et al. (2007)
EI/AS	Sólidos suspensos e cloreto/ sólidos suspensos, amônia e H ₂ S	Pires (2006)
SE-E	Oxidáveis/voláteis (substâncias cloradas), metais (Cu e Mn) e amônia	Nilin (2009)

3.4. Considerações Finais

É possível observar que em geral a utilização das técnicas de AIT majoritariamente se restringem à solução de casos de contaminação e diagnóstico em amostras ambientais e efluentes. Tal tendência é seguida na América Latina, onde os estudos ainda são pouco distribuídos.

As substâncias identificadas são diversas, desde hormônios naturais e sintéticos em efluentes municipais, pesticidas usados em diversas atividades, metais e surfactantes. Nos estudos latino-americanos e principalmente nos EUA, a amônia é uma substância comumente identificada, tanto em efluentes industriais como em sedimentos e águas superficiais. A fonte de amônia nestes casos é variada. Em amostras ambientais, por exemplo, a origem da amônia pode ocorrer pelo despejo de efluentes domésticos. Outra fonte é a degradação dos compostos orgânicos nitrogenados por bactérias, e seu acúmulo é

facilitado pelas condições anaeróbias presentes em sedimentos com altas cargas de matéria orgânica e decomposição bacteriana (Ankley & Schubauer-Berigan, 1995).

No caso de alguns metais e compostos orgânicos, sua origem tem relação as atividades humanas. Metais como Chumbo, Mercúrio, Cádmio, Cromo e Zinco em concentrações elevadas nos ecossistemas aquáticos são resultado do despejo inadequado dos rejeitos de mineração, subprodutos do tratamento de madeira, papel e celulose, curtume, entre outros. Os compostos orgânicos podem ser introduzidos no ambiente por diversas formas, carreados pela chuva em áreas agrícolas que utilizam agroquímicos, em efluentes domésticos não tratado ou sem tratamento adequado, em efluentes industriais, como subprodutos, entre outros.




Os estudos de Avaliação e Identificação de Toxicidade podem ser utilizados com outros propósitos além dos expostos anteriormente, como redução de toxicidade em efluentes e monitoramento ambiental de áreas contaminadas, por exemplo. Sua adoção pode ser estendida para questões jurídicas, nas investigações de casos de contaminação ambiental indicando os possíveis poluidores, avaliação da extensão dos impactos, estabelecimento de termos para recuperação dos ambientes ou penas para o poluidor.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Com base nos resultados obtidos por Resende (2009), apenas os pontos amostrais caracterizados como nascente e que apresentaram indícios de toxicidade aguda e/ou toxicidade crônica foram selecionados para o presente estudo, resultando em 3 pontos amostrais: o ponto 2, localizado no bairro Campo Alegre; e os pontos 22 e 24, nos bairros Brandões de Baixo e Brandões de Cima, respectivamente (Tabela 6; Figura 5).

Tabela 6. - Descrição dos pontos de amostragem, baseadas em observações realizadas por Resende (2009) e Cunha (2009).

Ponto		Bairro	Descrição	Microbacia (Cunha, 2009)
P2		Campo Alegre	Nascente difusa situada entre terrenos com declive. Presença de mata ciliar (aprox. 40m) no entorno. Acima, aproximadamente a 150m de distância à montante, há plantação de batatas. Principais usos: consumo humano e dessedentação de animais.	Microbacia Rio do Peixe
P22		Brandões de Baixo	Nascente localizada entre duas áreas com alta declividade, com plantação de morango à esquerda e pasto à direita. Mata ciliar vestigial. Principais usos: consumo humano (3 famílias) e irrigação.	Microbacia Rio Espraiado
P24		Brandões de Cima	Nascente protegida por manilhas colocadas no solo. Com uma faixa de aproximadamente 20m de mata no entorno. Além da faixa de mata, há pasto. Principais usos: consumo humano (4 famílias), dessedentação de animais e irrigação.	Microbacia Rio Espraiado

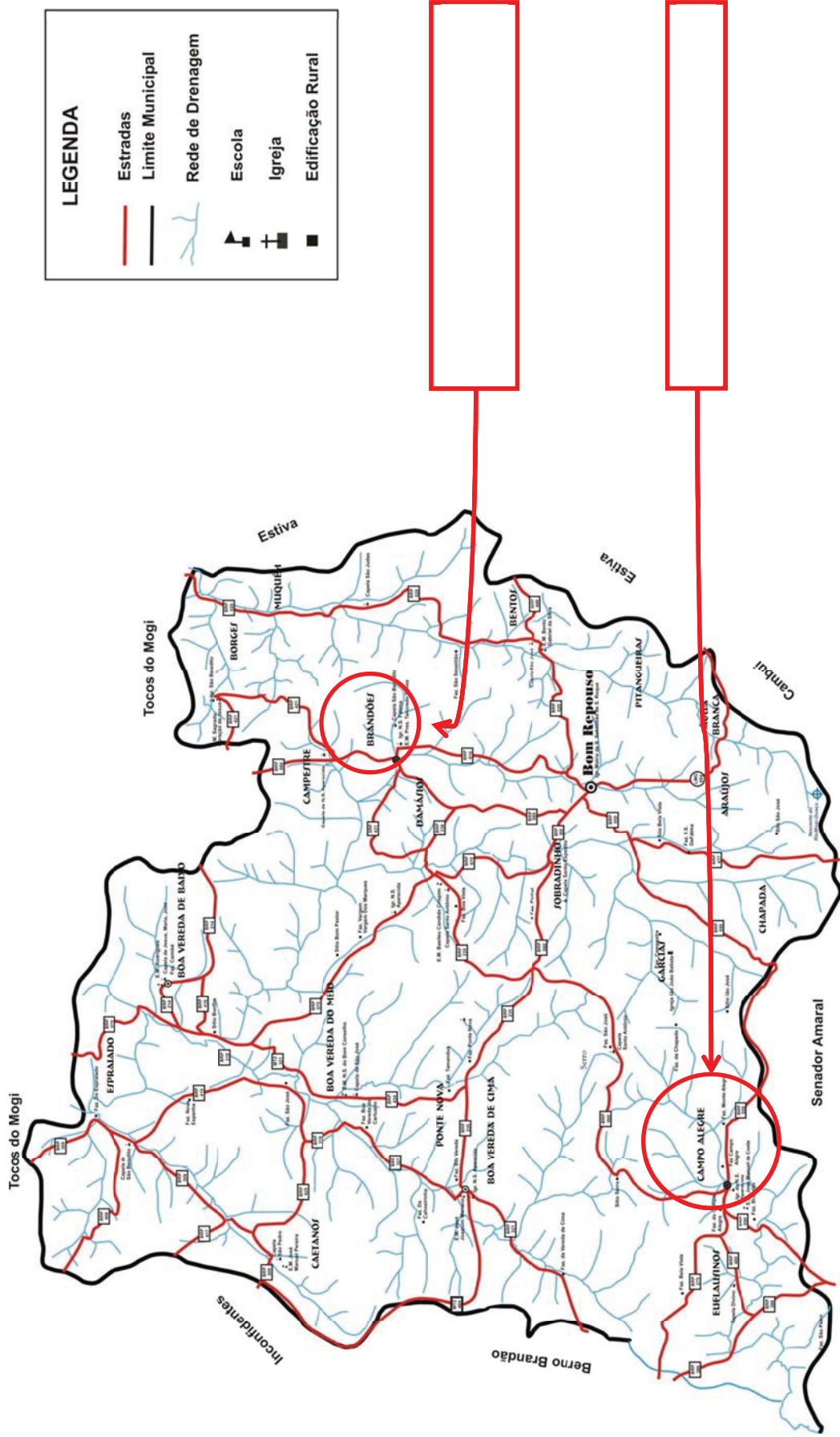


Figura 5. Mapa da região administrativa do município de Bom Repouso/MG. Em destaque, os bairros e os respectivos pontos de amostragem.

Foram realizadas duas campanhas para coleta de amostras de água nas nascentes descritas anteriormente: a primeira, realizada em Julho de 2008, teve por objetivo definir os pontos prioritários para aplicação da AIT e a segunda, em Novembro de 2008, foram coletadas amostras para a realização dos ensaios de AIT. O sedimento destas nascentes foi coletado apenas na campanha de Novembro. Os seguintes procedimentos foram aplicados para as amostragens:

- a) As amostras de água foram coletadas diretamente em garrafas de polipropileno. Duas alíquotas foram separadas: a primeira para os testes de toxicidade crônica iniciais foram resfriadas até o momento dos testes. A alíquota reservada aos testes de AIT foi congelada, pois os ensaios foram realizados após a obtenção dos resultados preliminares de toxicidade crônica. A norma NBR 13373 (ABNT, 2005) recomenda a refrigeração das amostras utilizadas a curto prazo e o congelamento das amostras utilizadas a longo prazo.
- b) As amostras de sedimento foram coletadas com uma pá, homogeneizadas e armazenadas em potes plásticos de 1L. O mesmo procedimento para preservação utilizado com as amostras de água foi aplicado nas amostras de sedimento.

As amostras de sedimento foram preparadas previamente para a realização dos ensaios crônicos. Devido às características granulométricas, onde predominam as frações arenosas (Resende, 2009), as amostras foram solubilizadas por meio dos seguintes procedimentos:

- As amostras descongeladas foram novamente homogeneizadas e uma parte de sedimento misturada a 4 partes de água utilizadas para o cultivo dos organismos-teste;
- Em seguida, as amostras foram submetidas a uma mesa agitadora de movimentos circulares por 24 horas;
- O sobrenadante foi extraído por centrifugação à 2500 *g*, à temperatura de 4 °C e por 1 hora, de acordo com a metodologia descrita por Schubauer-Berigan & Ankley (1991). O elutriato então foi utilizado imediatamente nos testes de toxicidade.

4.2. Cultivo dos Organismos

Os cultivos são mantidos de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT (2005) para *Ceriodaphnia dubia* no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia (USP – EESC – CRHEA – NEEA). São mantidos 70 indivíduos adultos de *C. dubia* em cristalizadores com 2L de água de cultivo (água natural reconstituída e filtrada) com dureza total entre 40 e 48 mg/L CaCO₃ e pH entre 7,0 - 7,6. O alimento, recomendado na norma supra citada, é composto por uma suspensão da alga *Pseudokirchneriella subcaptata* na proporção de 1 – 5 x 10⁵ células por organismo de *C. dubia* e 0,2mL de um outro alimento complementar (ração para peixe fermentado e levedura – “RL”) por litro de meio de cultivo. Os recipientes são mantidos em incubadora a 23°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro e a troca da água dos cristalizadores, bem como a alimentação são feitas 3 vezes por semana. Um resumo das condições do cultivo é apresentado na tabela 7.

Tabela 7. - Resumo das condições de cultivo e dos testes com *Ceriodaphnia dubia*.

Condições do Cultivos	Espécie
Temperatura	23°C ± 2°C
Fotoperíodo	16 horas de luz/8 horas de escuro
Água de Cultivo	Água Natural Reconstituída
pH	7,0 – 7,6
Dureza Total	40 – 48 mg/L CaCO ₃
Recipiente	Cristalizador de 2L
Volume da Água de Cultivo/Recipiente	2 Litros
Troca da Água	3 vezes por semana
Nº de indivíduos/recipiente	70
Alimento	<i>P. subcaptata</i> e ração de peixe fermentada
Quantidade de Alimento <i>P. subcaptata</i>	1 – 5 x 10 ⁵ células/ind.

4.3. Controle de Qualidade - Testes de Sensibilidade

Os testes de sensibilidade são realizados mensalmente de acordo com as recomendações da norma técnica (ABNT, 2005), com a substância de referência (cloreto de sódio - NaCl) em um teste de toxicidade aguda para avaliar as condições fisiológicas do lote de organismos – teste (Zagatto, 2006). Os resultados devem estar compreendidos entre os dois desvios - padrão (superior e inferior) da média acumulada de uma série de testes mensais que compõem a carta-controle (USEPA, 1992a; ABNT, 2005; ZAGATTO 2006).

4.4. Testes de Toxicidade Crônica

Nos ensaios crônicos com *C. dubia*, os efeitos observados são a sobrevivência e a reprodução (número médio de neonatos por fêmea) dos organismos-teste durante um período de exposição de 7-8 dias. Fêmeas neonatas com idade entre 6 e 24 horas foram mantidas individualmente em 15 ml de amostra (total de 10 réplicas por amostra) com alimento (Tabela 8). A cada 48 horas e até atingir a 3ª cria, são feitas renovações das soluções teste e do alimento em cada réplica, observando – se o número de organismos vivos e de neonatas. Em todos os ensaios, foram mensuradas no início e ao final, nas amostras e nos controles, as variáveis potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica e dureza total de CaCO₃, (ABNT, 2005).

Tabela 8. Resumo dos requisitos para os ensaios de toxicidade crônica

Requisitos	Espécies
Tipo de Ensaio	Semi – estático
Duração	Aprox. 7 dias (~168 h)
Idade dos Organismos - teste	6 a 24 horas
Água de diluição	Água Natural Reconstituída
Volume da solução - teste	15mL
Número de réplicas por diluição	10
Número de indivíduos por réplica	1
Renovação da solução teste	Sim, a cada 48 h
Alimentação	Sim, a cada 48 h
Temperatura	23°C ± 2°C
Fotoperíodo	16 horas de luz/8 horas de escuro
<i>Endpoint</i>	Sobrevivencia/ reprodução
Expressão dos resultados	Tóxica/ Não Tóxica

4.5. Avaliação e Identificação de Toxicidade

Os procedimentos descritos a seguir foram aplicados às amostras e brancos (água de cultivo, de acordo com o protocolo da USEPA (1992b).

4.5.1. Ajuste de pH

Alíquotas de 250 mL das amostras e meio de cultivo (Branco) tiveram seus valores de pH ajustados para 3 e 11 - com a adição de Ácido Clorídrico (HCl) 1N e/ou 0,1N (Merck), e Hidróxido de Sódio (NaOH) 1N e/ou 0,1N (Merck), respectivamente, sem que o volume total de ácido ou base não ultrapassasse 10% do volume da amostra, ou seja, 25mL. Após um período de 3 horas em repouso, os valores de pH das alíquotas foram reajustados ao valor inicial com a adição de HCl e NaOH.

4.5.2. Filtração

Neste procedimento, alíquotas de 250 mL do controle, sem tratamento prévio e em seu pH inicial, foram filtradas à vácuo por meio de filtros de Acetato de Celulose Millipore com 0,45 μm de porosidade e previamente lavados com água ultra purificada. Em seguida, o mesmo volume de amostra foi também filtrado e armazenado para os testes, bem como o filtro, mantido sob refrigeração para testes posteriores.

4.5.3. Aeração

As alíquotas de 250 mL das amostras e dos brancos foram dispostos em Erlenmeyers de 500mL para aeração. Em seguida, foi introduzido no interior e posicionadas ao centro de cada recipiente uma pipeta de vidro, conectada por meio de uma mangueira de silicone a uma bomba de aquário e mantidas por 1 hora sob aeração moderada (cerca de 500mL de ar/minuto). Ao final do processo, o volume foi retirado com pipetas para que não houvesse contato com a parede interna do recipiente e a fase sublátil se misturasse novamente à amostra tratada. Então, após a retirada total da amostra, o recipiente foi lavado com 50mL da água de cultivo e conseqüentemente armazenado sob refrigeração para possíveis testes posteriores.

4.5.4. Extração em Fase Sólida

A extração foi feita com colunas de Octadecil-sílica (C18) com as amostras e brancos sem tratamento. Inicialmente, a coluna foi pré-lavada com 15mL de Metanol marca J.T. Baker e 25mL de água ultra-pura, para que fosse retirado qualquer resíduo que pudesse contaminar a amostra/brancos. Em seguida, a coluna foi condicionada com um volume de 25mL de água de cultivo (posteriormente descartada) e um volume de 300mL do branco foi tratado e recolhido para os testes. Na mesma coluna, tais procedimentos de condicionamentos e extração foram aplicados também à amostra.

Com a coluna seca, ou seja, sem resíduos de amostra ou branco, procedeu-se a eluição das substâncias adsorvidas ao C18 utilizando-se 2 mL de metanol, obtendo-se um extrato 150x mais concentrado, e que foi reservado e mantido sob refrigeração.

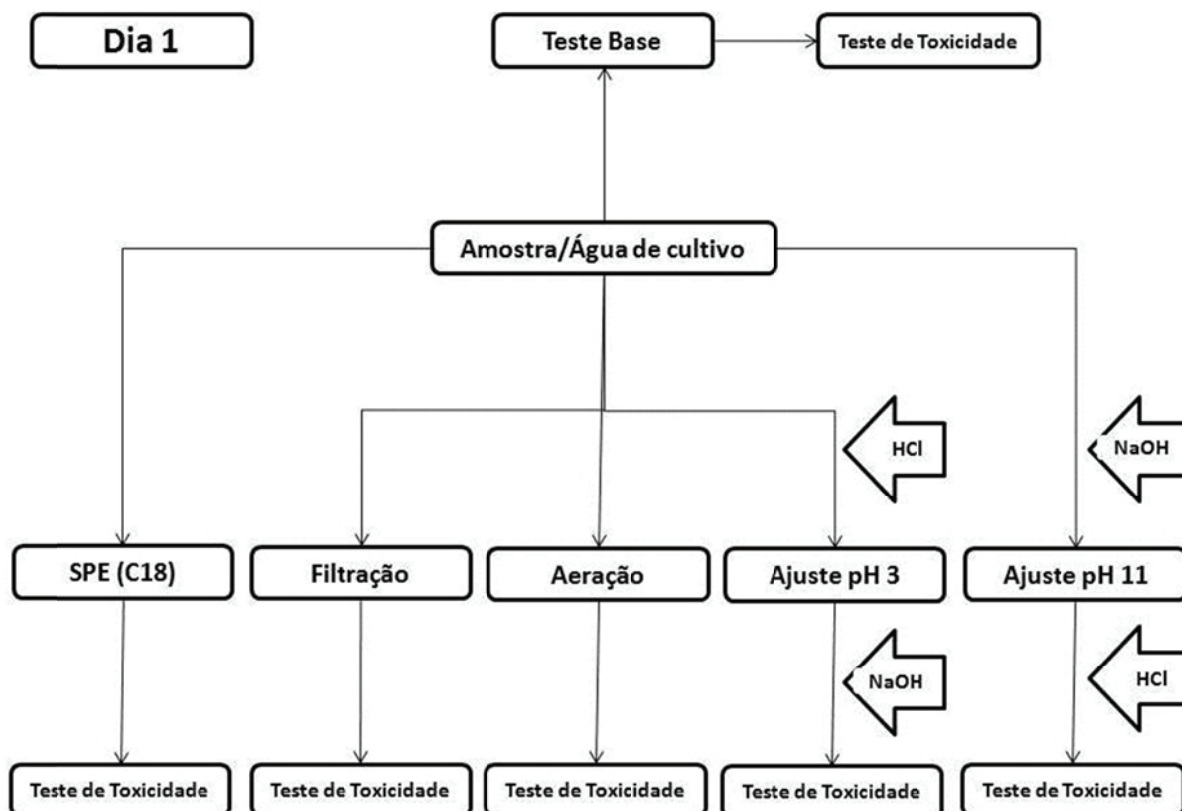


Figura 6. Procedimentos utilizados para caracterização de compostos tóxicos (Dia 1).

Os procedimentos descritos anteriormente foram feitos no dia anterior à montagem dos testes e as amostras tratadas utilizadas até a última troca (dia 6). Os procedimentos que serão descritos à seguir foram feitos apenas no dia de cada troca (Figura 7).

4.5.5. Graduação de pH

Alíquotas de 80mL das amostras e brancos tiveram seus valores de pH modificados à faixa fisiologicamente tolerável (6 – 9) aos organismos de *Ceriodaphnia dubia*. Devido ao baixo pH inicial das amostras (6,01 para água e 6,48 para o sedimento), as alíquotas foram

ajustadas para 7 (próximo á faixa dos controles) e 9, e os brancos - com pH por volta de 7,6 nos testes com amostras de água e sedimento - foram ajustados para 6 e 9. As alíquotas foram utilizadas logo em seguida nos testes, e os procedimentos foram repetidos em cada troca.

4.5.6. Tratamento com Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) e Tiosulfato de Sódio

Inicialmente foi preparada no dia dos testes soluções-estoque de 2500 mg L⁻¹ em água destilada, para ambas substâncias. Em seguida, foi feito 100 mL de soluções de 3,0 mg L⁻¹ e 8,0 mg L⁻¹ de EDTA, com os brancos e as amostras, dispostas posteriormente nos recipientes de teste e deixadas em repouso por 2 horas para que ocorressem as reações entre o EDTA e as substâncias presentes nas amostras. O mesmo procedimento foi aplicado ao Tiosulfato de sódio, entretanto, as concentrações finais em cada réplica foi de 10 mg L⁻¹ e 25 mg L⁻¹.

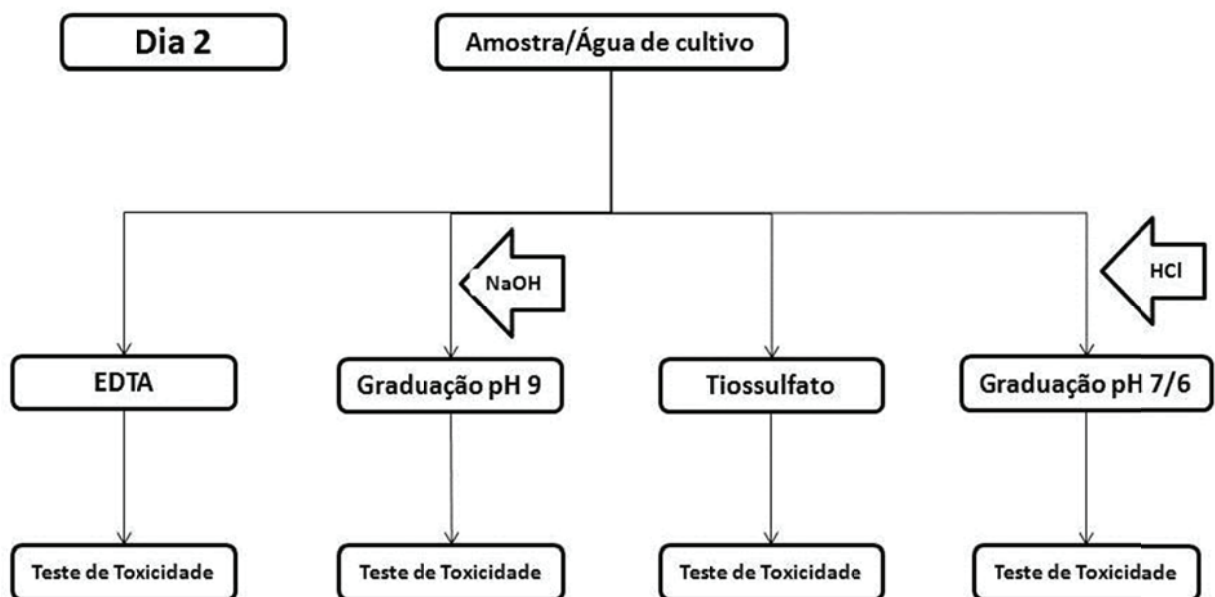


Figura 7. Procedimentos utilizados para caracterização de compostos tóxicos (Dia 2).

4.6. Análise Estatística

Os resultados de toxicidade crônica para *C. dubia* foram analisados de acordo com o diagrama apresentado na figura 8. Em resumo, os dados de sobrevivência são plotados inicialmente no Fisher's Exact Test para verificar diferenças nas médias de sobrevivência nas amostras com o controle (USEPA, 2002; Buratini & Bertoletti, 2006). Em caso contrário à evidência de mortalidade significativa com o controle, são feitos nos dados de reprodução (número de neonatas) testes de normalidade e homogeneidade, que irão definir qual melhor método para verificar diferenças com os dados do controle (USEPA, 2002). Para os dados dos tratamentos da AIT foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os resultados, tanto para sobrevivência e reprodução, são expressos em Tóxico (Diferenças entre controle e amostra) e Não Tóxico (sem diferenças significativas).

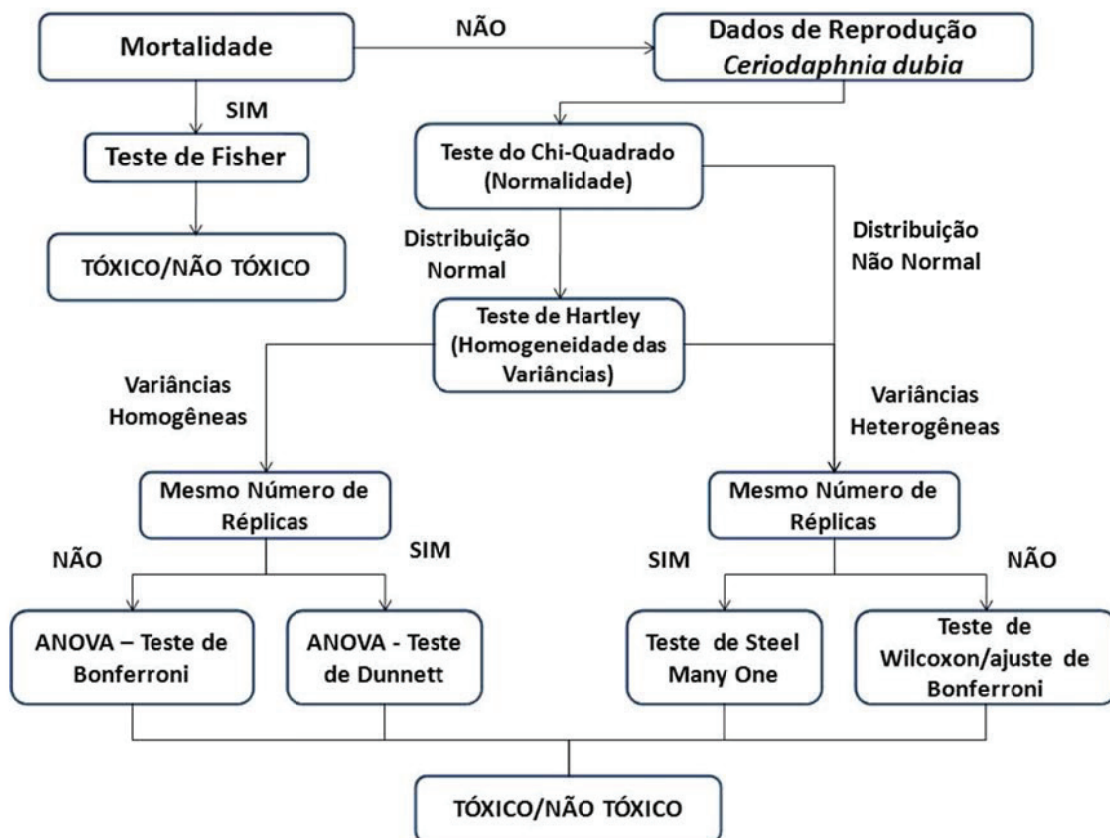


Figura 8. Procedimento estatístico utilizado na avaliação dos resultados de testes de toxicidade crônica com *C. dubia*. (Adaptado de USEPA, 2002; Buratini & Bertoletti, 2006)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Controle de qualidade - Sensibilidade dos organismos-teste

Assim como os diversos métodos de análise ambiental, testes de toxicidade apresentam também variações em seus resultados, atribuídas à diversos fatores bióticos e abióticos, como as condições dos organismos, do cultivo, alimento, meio de cultura, variedade genética, condições do ensaio, diferenças entre as manipulações dos operadores, dentre outras (Zagatto, 2006). Mesmo com a uniformização das práticas de manutenção das culturas e realização dos testes, existe a necessidade de avaliar a qualidade dos organismos-teste. São critérios de avaliação da qualidade a taxa de reprodução, sobrevivência dos organismos nas culturas e nos controles dos testes, presença de formas resistentes (efípios) longevidade e comportamento natatório, e principalmente, a utilização de testes de toxicidade com substâncias de referência para avaliar as condições fisiológicas dos organismos (USEPA, 1991).

No presente estudo, utilizou-se para o controle de qualidade dos organismos de *C. dubia*, testes de toxicidade aguda (48 horas de duração) com a substância Cloreto de sódio (NaCl), já utilizada no Laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia/USP/NEEA e recomendada pela norma ABNT (2005).

A carta controle apresenta valores de CE50 de 17 ensaios realizados entre 2008 e 2009 (Figura 9), período em que os testes com as amostras também foram realizados. Os resultados de CE50 variaram entre 1,08 (-2σ) e 1,96 g L⁻¹($+2\sigma$), com a média de 1,52 g L⁻¹ e coeficiente de variação de 14,5%, indicando que as culturas, bem como os procedimentos utilizados nos testes são adequadas, pois estão dentro dos limites de aceitabilidade estabelecidos pela ABNT (2005), ou seja, quanto à distribuição das médias entre os 2 desvios padrões ($\pm 2\sigma$) e pela Environmental Canadá (1990), quanto ao coeficiente de variação ($\leq 30\%$).

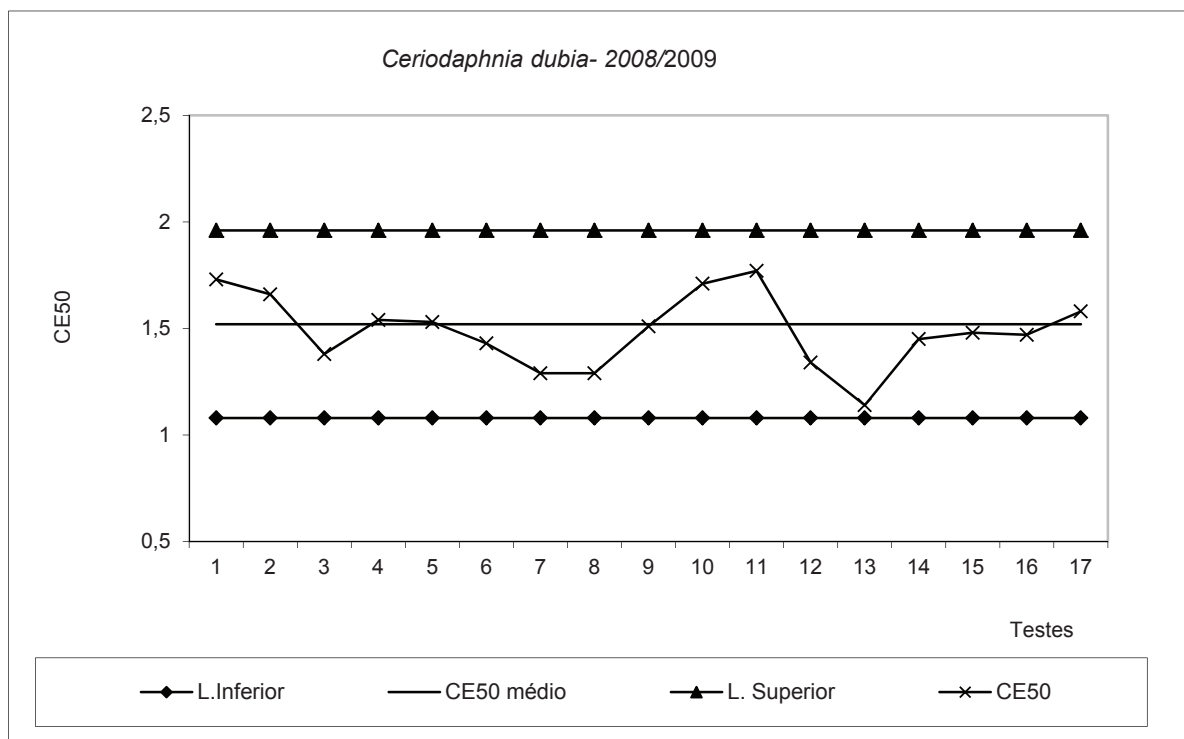


Figura 9. Carta-control da sensibilidade dos organismos de *C. dubia* à substância Cloreto de sódio (NaCl). Valores de CE50, 48h.

5.2. Testes de Toxicidade – Água e Sedimento

Os parâmetros físicos e químicos das amostras e dos controles, obtidos no início e ao final dos ensaios encontram-se listados no anexo B.

Os ensaios de toxicidade crônica, onde foi avaliado o número de neonatas produzidas pela fêmea adulta durante o período do testes (7 dias), realizadas com as amostras de julho mostraram que houveram diferenças significativas ($P < 0.05$) entre o controle e dois pontos dos três testados: o P2 (Campo Alegre) e o P22 (Brandões de Baixo) (Figura 10). O método estatístico utilizado para avaliar os resultados deste ensaio foi o Teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni, pois os dados não apresentaram homogeneidade na variância quando submetidos ao Teste de Hartley, apesar de apresentarem normalidade segundo o Teste do Qui-quadrado. O resultado detalhado dos testes estatísticos são apresentados no anexo C.

Tais resultados corroboram em parte com os dados de toxicidade crônica para a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*, obtidos por Resende (2009) na mesma campanha, pois os

testes estatísticos também indicaram toxicidade para o P2 e P22, entretanto, foi evidenciada diferenças significativas entre o controle e a amostra do ponto P24 no teste com *C. silvestrii*, o que não foi observado no teste com *C. dubia*.

Segundo diversos autores, as diferenças entre as características físico-químicas da amostra e da água de cultivo pode causar *stress* nos organismos-teste e isso pode interferir negativamente na reprodução dos mesmos (Brigante & Espíndola, 2003; Resende, *Ibid.*). Os indivíduos utilizados para os ensaios são cultivados em água natural reconstituída que apresenta dureza entre 40 e 44 mg L⁻¹ de CaCO₃ e pH entre 7,2 e 7,8. As características das amostras em questão eram bem distintas, pois apresentavam valores de pH e dureza abaixo dos 6,5 e 12 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 9).

Entretanto, para eliminar a suspeita de que a reprodução dos organismos era influenciada significativamente por diferenças de pH, dureza ou condutividade entre as amostras e controle, foi incluída no ensaio uma amostra de referência (C.C.), com características semelhantes às amostras. Foi utilizada a mesma água natural empregada no cultivo e nos controles, porém, sem ser reconstituída conforme as normas da ABNT (2005).

Tabela 9. – Parâmetros físico-químicos mensurados antes do teste com amostras da campanhas de julho e novembro de 2008.

Amostra	pH		OD (mg L ⁻¹)		Condutividade (μS cm ⁻²)		Dureza (mg L ⁻¹)	
	Julho	Novembro	Julho	Novembro	Julho	Novembro	Julho	Novembro
Controle	7,4	7,38	7,39	7,32	156,2	157,6	42	40
C.L.	6,01	6,70	7,28	7,35	26,1	24,9	10	10
P2	6,32	6,47	7,72	8,24	15,4	18,3	8	10
P22	6,33	6,36	7,84	8,90	21	21,6	8	8
P24	6,38	6,13	7,93	8,94	28,3	22,7	12	10

O teste estatístico revelou não haver diferenças significativas entre o Controle e a amostra de referência (Figura 10), o que aumenta as evidências de que a toxicidade crônica não é causada por *stress* e sim por outros fatores, como micropoluentes.

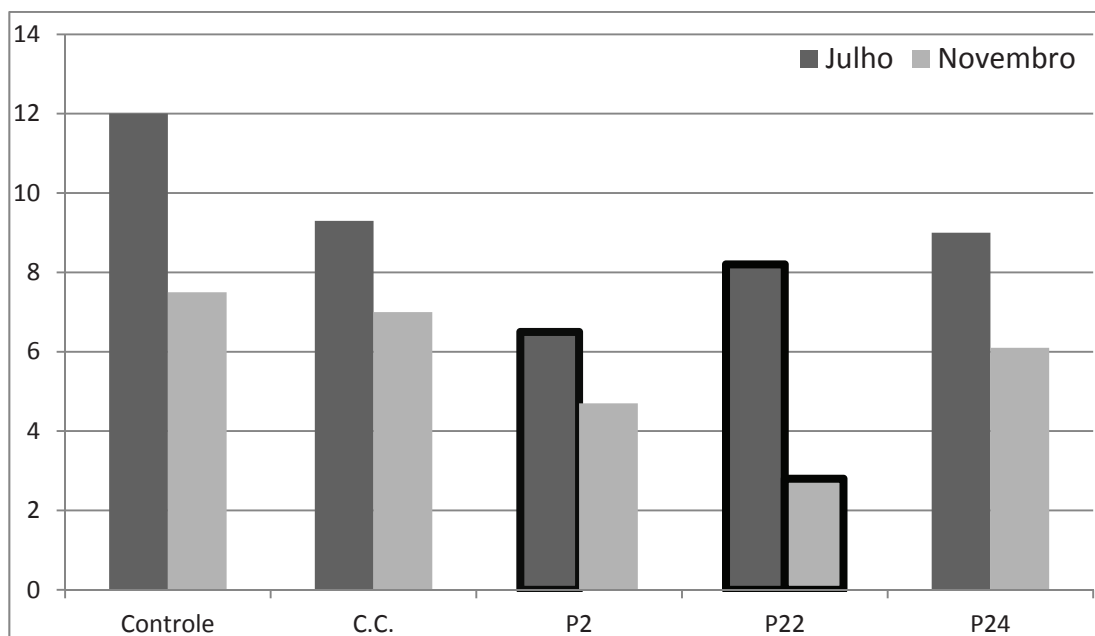


Figura 10. Média de neonatas de *C. dubia* por fêmea adulta nos bioensaios de toxicidade crônica com água no mês de julho e novembro de 2008. As colunas em destaque são as amostras que apresentaram diferenças significativas em relação ao Controle.

Os seguintes metais dissolvidos na água foram analisados por Resende (2009): cádmio, chumbo, cobre, cromo, zinco, níquel, manganês, ferro, cobalto, alumínio e sódio (Tabela 10). Nos pontos de coleta selecionados no presente estudo, apenas o zinco (P2 e P24) e sódio (nos 3 pontos) estiveram acima do limite de detecção, mas abaixo dos padrões exigidos pela legislação (Brasil, 2005).

No mesmo estudo, foram quantificados no sedimento os metais citados anteriormente. Da mesma forma que na água, não houve nenhum metal em concentrações superiores às estabelecidas na resolução CONAMA 344/04 (Brasil, 2004). Entretanto, nota-se que metais como manganês, zinco, cobre, cromo, ferro, sódio e alumínio são encontrados em concentrações bem superiores aos limites de quantificação (Tabela 11).

Lima (2010) também salienta as altas concentrações de ferro e alumínio em amostras de solos oriundas da zona rural de Bom Reposo/MG. Além disto, muitas vezes estes elementos desempenham funções importantes em organismos vivos. e ocorrem às vezes até em concentrações elevadas, devido principalmente às características geomorfológicas da

bacia onde está inserido o corpo d'água (Sperling¹, 1998 *apud* Brigante *et al.*, 2003), uma vez que a bacia do rio Mogi-Guaçu é formada principalmente por substratos rochosos ricos em ferro e solos do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo, rico em alumínio (Baruqui *et al.*, 1985).

Apesar das baixas concentrações encontradas, é importante ressaltar a presença de metais biocumulativos, e que podem causar efeitos deletérios aos organismos expostos em um longo período de tempo ao sedimento destes pontos, bem como a combinação entre estas substâncias pode potencializar os efeitos (Chapman, 1992).

Resende (2009) detectou nas amostras de julho de 2008 agrotóxicos como o Clordano no ponto 2 ($0,016 \mu\text{g L}^{-1}$) e Metolaclo-ro no ponto 22 ($0,0135 \mu\text{g L}^{-1}$), mas em concentrações abaixo dos limites estabelecidos pela legislação. No sedimento, apenas foi encontrada em pequenas concentrações Abamectina e Alfa – BHC, em pontos diferentes dos selecionados para o presente estudo. No solo, Lima (2006) detectou em baixas concentrações o Metolaclo-ro em uma área de cultivo de morango, Abamectina em áreas de mata e em um solo com plantação de morango e Carbofuran (solo das áreas de mata, cultivo de batata e de morango).

¹ Sperling, E. V. Qualidade da água em atividades de mineração (1998) In: Dias, L. E.; Vargas De Mello, J. W. *Recuperação de áreas degradadas*. Universidade Federal de Viçosa, Depto. de Solos, Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, Viçosa/MG. pp. 95-105.

Tabela 10. - Concentração de metais dissolvidos (Fe, Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Cd, Mn, Na, Al e Co) quantificados na água por Resende (2009) na campanha de julho de 2008. ND= Abaixo do limite de detecção; NE=Não Estabelecido

Estação de coleta	Concentração (mg L ⁻¹)										
	Mn	Ni	Pb	Zn	Cu	Cr	Cd	Fe	Na	Al	Co
Limite de Detecção	0	0,02	0,01	0,01	0,02	0,0011	0,0004	0,04	0	0,00043	0,046
Limite de Quantificação	0,01	0,05	0,06	0,02	0,06	0,0039	0,0012	0,14	0,001	0,0015	0,015
CONAMA 357/05	0,1	0,025	0,01	0,18	0,009	0,05	0,001	0,3	NE	0,1	0,05
P2	ND	ND	ND	0,0017	ND	ND	ND	ND	0,9066	ND	ND
P22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,0867	ND	ND
P24	ND	ND	ND	0,0601	ND	ND	ND	ND	1,5692	ND	ND

Tabela 11. - Concentração de metais (Fe, Ni, Cr, Zn, Pb, Cu, Cd, Mn, Na, Al e Co) quantificados no sedimento por Resende (2009) na campanha de julho de 2008. ND= Abaixo do limite de detecção; NE=Não Estabelecido.

Estação de coleta	Concentração (mg Kg ⁻¹)										
	Mn	Ni	Pb	Zn	Cu	Cr	Cd	Fe	Na	Al	Co
Limite de Detecção	0	0,02	0,01	0,01	0,02	0,0011	0,0004	0,04	0	0,00043	0,046
Limite de Quantificação	0,01	0,05	0,06	0,02	0,06	0,0039	0,0012	0,14	0,001	0,0015	0,015
CONAMA 344/04	NE	18	35	123	35,7	37,3	0,6	NE	NE	NE	NE
P2	60,875	ND	ND	5,003	ND	0,5	ND	972,663	22,14	1414,3	ND
P22	67,5	ND	ND	6,638	0,975	0,3	ND	849,193	25,403	1675,75	ND
P24	0,075	ND	ND	12,583	17,35	4,85	ND	773,483	24,163	2614,7	ND

No sedimento elutriado foi observado efeito na sobrevivência das fêmeas expostas à amostra do ponto P22, onde apenas 30% sobreviveram ao final dos 7 dias de testes (tabela 12).

Tabela 12. - Resultado do teste de toxicidade crônica com a fase líquida do sedimento da campanha de novembro de 2008.

Pontos	Número de organismos		Sobrevivência (%)
	Inicial	Final	
Controle	10	10	100
P2	10	10	100
P22	10	3	30
P24	10	7	70

A toxicidade no ponto P22 é coincidente com o aumento nos níveis pluviométricos na região. Enquanto que no mês de julho não houve precipitação (0 mm), o valor total no mês de outubro (mês que antecedeu a coleta, realizada no dia 1 de novembro) foi de 130,1 mm, e seu pico máximo de 76,1 mm foi registrado em 30 de outubro, apenas dois dias antes da coleta (Figura 11).

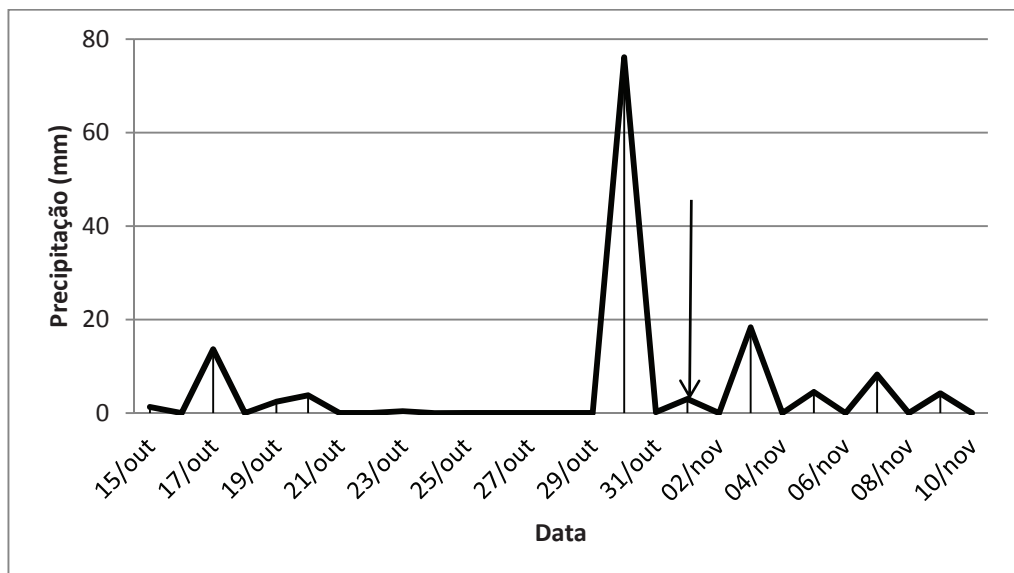


Figura 11. Precipitação diária nos meses de outubro e novembro de 2008. A seta indica a data da coleta (1º de novembro). Fonte: Posto pluviométrico de Inconfidentes (MG), código 26056 (ANA, 2008).

5.3. Avaliação e Identificação de Toxicidade

AIT - Água

Os testes com os controles dos tratamentos (Branco) da AIT realizados paralelamente aos das amostras contribuem para a redução de incertezas e aceitação de falsos positivos entre os resultados, evidenciando problemas na manipulação, nos materiais utilizados ou mesmo nos organismos-teste. No presente estudo, os testes com os brancos revelaram diferenças na sobrevivência e reprodução entre o controle (sem tratamento) e o branco da Extração em Fase Sólida, apesar de não ser observada toxicidade em nenhum outro branco. Diversas causas podem ser atribuídas a esse resultado, como contaminação do cartucho, erros de manipulação, a própria toxicidade residual da resina Octadecil-sílica, entre outros. Entretanto, o método de preparação (*clean-up* e condicionamento) da coluna C18 recomendada pela USEPA (1991) ajuda a reduzir qualquer contaminação para a amostra, visto que, após a pré-lavagem do cartucho, passa-se água de cultivo (os primeiros 25 mL da água de cultivo são descartados, o mesmo procede-se com a amostra) e só após estes processos a amostra é tratada.

Após ser passada pela coluna C18, a amostra P22 em pH inicial também apresentou aumento de toxicidade em relação ao teste base inicial, ou seja, apenas 20% das fêmeas expostas sobreviveram ao final do ensaio, enquanto que na amostra não-tratada (teste base), este percentual foi 80%. Estes resultados descartam a hipótese de que a toxicidade da amostra tenha sido causada por compostos orgânicos apolares, o que não significa que a suspeita por contaminação por pesticidas, por exemplo, seja completamente descartada. Diversos estudos afirmam que muitos compostos orgânicos (algumas classes de pesticidas, por exemplo) não são bem adsorvidos pela C18 ou não são removidos com o Metanol, pois têm características distintas e que necessitam de técnicas específicas, o que torna difícil sua caracterização e identificação (Durhan *et al.*, 1993; Ankley, & Schubauer-Berigan, 1995; Botta-Paschoal, 2002).

Outros tratamentos também não foram eficientes na redução de toxicidade, e em alguns, como nos tratamentos com EDTA (3,0 e 8,0 mg L⁻¹) e filtração, houve aumento na toxicidade como ocorreu à SPE. O tratamento EDTA 1 (3,0 mg L⁻¹) causou 40% de mortalidade, e nenhuma neonata foi produzida, enquanto o EDTA 2 (8,0 mg L⁻¹) causou a

morte de 60% e a filtração de 100% dos organismos expostos. Os demais tratamentos, como ajuste de pH 3, ajuste de pH 11, Graduação de pH 9, aeração e Tiosulfato 2 (25 mg L^{-1}), não causaram nenhuma alteração na toxicidade da inicial da amostra. Assim, puderam ser descartadas quaisquer suspeitas para metais catiônicos (Cu, Fe, Pb, Ni, Zi, Mn, Co, Al), voláteis (cloro, amônia e sulfetos), sublúteis (surfactantes) e associadas ao material particulado (USEPA,1992b).

As etapas de graduação em pH 7 e no tratamento com 10 mg L^{-1} de Tiosulfato de sódio (Tiosulfato 1) reduziram a toxicidade da amostra (Figura 12).

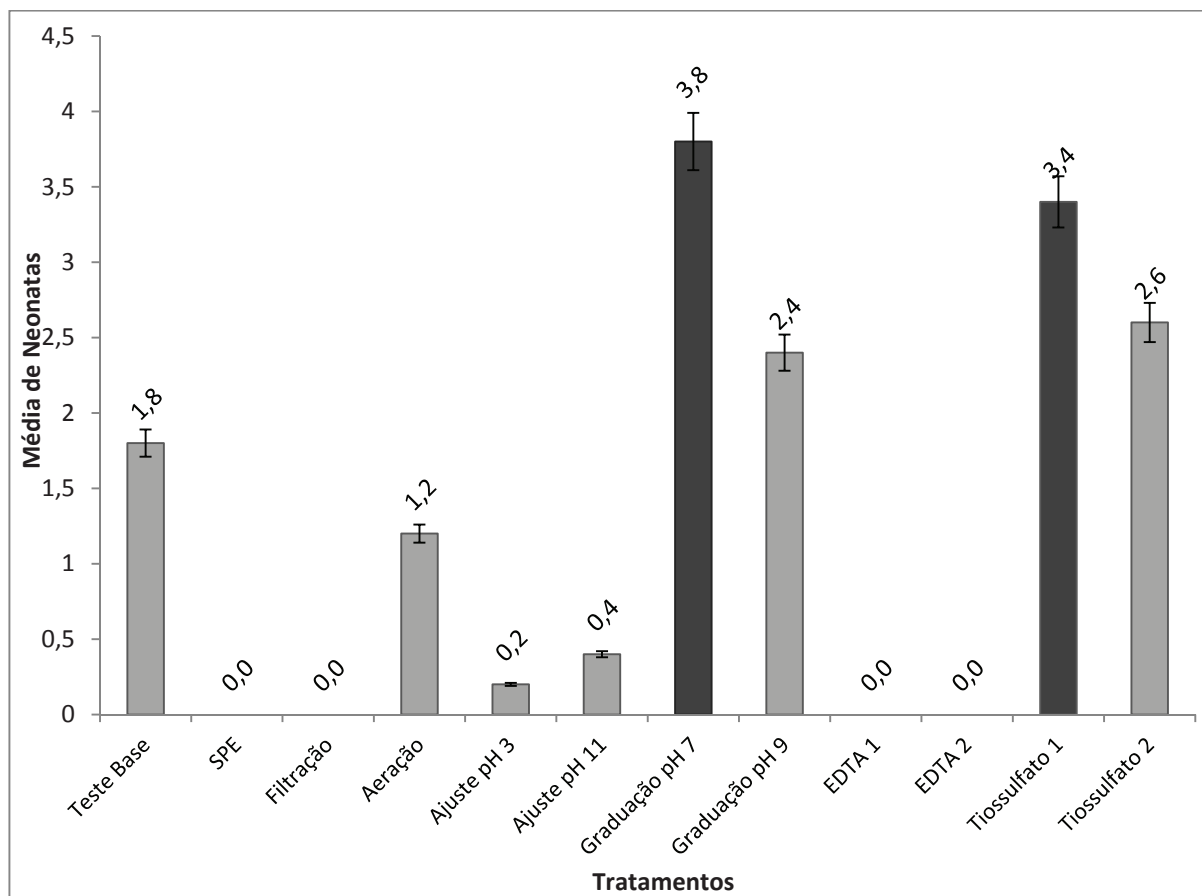


Figura 12. Médias de reprodução em cada tratamento da Fase I na amostra de água do ponto 22. As colunas em destaque (em cinza escuro) indicam os tratamentos que reduziram significativamente a toxicidade crônica da amostra.

A amostra foi ajustada para o pH 7 ao invés do 6, pois inicialmente a amostra apresentava um valor de pH 6,05. Esta manipulação mostrou aumento significativo na quantidade de juvenis, indicando redução da toxicidade. A biodisponibilidade de alguns metais catiônicos pode ser aumentada em valores de pH mais baixos do que o neutro (7,0) (Stumm & Morgan), entretanto, os resultados negativos para redução de toxicidade nos tratamentos com EDTA contradiz tal afirmação para esta amostra.

Assim, o efeito tóxico da amostra pode ser atribuído a um conjunto de fatores, como o baixo pH na amostra e a presença de substâncias que, mesmo em baixas concentrações, poderiam ter seus efeitos maximizados. A redução da toxicidade pelo tiosulfato pode indicar a presença de substâncias oxidáveis ou que são complexadas por este reagente. Dentre as listadas por outros estudos, estão o cloro, ozônio, ânions de bromo, manganês, selênio e cromo, e metais como cobre, cádmio, prata e mercúrio (USEPA, 1991; Botta-Paschoal, 2002; Hockett & Mount, 1996). Entretanto, algumas substâncias redutíveis como o cloro por exemplo, são removidos na aeração por ser muito volátil. Se o cloro estivesse presente na amostra em concentrações suficientes para causar efeito aos organismos, é muito provável que o tratamento aeração tivesse médias de reprodução mais próximas ao controle.

Segundo Hockett & Mount (1996), além de ser um agente redutor, o tiosulfato forma complexos com alguns metais, que também são removidos também pelo EDTA. Os autores realizaram testes de toxicidade com 16 espécies químicas (como o Cd, Cu, Hg, Cr VI, Ag, Zi, Ni, Pb, Al, Fe, As III e V, Mn, Se IV e VI). Os ensaios revelaram que o EDTA reduziu a toxicidade de zinco, manganês, chumbo e níquel melhor do que o tiosulfato; as formas químicas de Fe, Cr, Al, As e o Se IV (selenito) não tiveram sua toxicidade reduzida por nenhum dos dois reagentes; e o Tiosulfato reduziu com mais eficiência a toxicidade do selenato (Se VI) e da prata em água com menor dureza, enquanto o EDTA não foi capaz de fazê-lo nestas condições. Um resumo dos resultados do referido estudo estão apresentados na figura 13.

Redução de toxicidade por EDTA

		Forte	Fraca	Nenhuma
Redução de toxicidade por Tiosulfato	Forte	Cloreto de cobre Cloreto de Mercurio Cloreto de mercurio II (24h)	Cloreto de prata	
	Fraca	Cloreto de zinco Nitrato de chumbo Cloreto de níquel	Cloreto manganoso Cloreto de mercurio II (48h)	Selenato de sódio
	Nenhuma			Cloreto ferroso Cloreto de crômio III Dicromato de potássio Arsenato de sódio Arsenito de sódio Cloreto de alumínio

Figura 13. Redução da toxicidade de metais para *C. dubia* quando tratados com EDTA e tiosulfato de sódio (Hockett & Mount, 1996).

5.3.1. AIT - Sedimento

Na caracterização da toxicidade com o elutriado do sedimento da amostra P22, observa-se nos testes com os brancos um efeito negativo na reprodução de *C. dubia* quando expostas às duas concentrações de EDTA (3,0 e 8,0 mg L⁻¹) e à concentração mais alta de tiosulfato (25 mg L⁻¹). Segundo a Botta-Paschoal (2002), as concentrações utilizadas nestes testes são calculadas em função dos valores de concentração efetiva para as espécies. A tabela 13 mostra os valores de IC50, IC25, CENO (Concentração de efeito não-observado) e CEO (Concentração de efeito observado) para *C. dubia* em relação à dureza da água que as amostras e a água de cultivo apresentaram.

Tabela 13. – Toxicidade crônica do EDTA para a espécie *Ceriodaphnia dubia* (7 dias) em relação à dureza do meio. Valores em mg L^{-1} . (USEPA, 1992b)

Tipo de água	Dureza	Cip50	Cip25	CENO	CEO
ARMM	8-20 ⁽¹⁾	4,5 (3,6-6,0)	3,0 (2,1-3,9)	2,5	5,0
ARM	40-48 ⁽²⁾	7,5 (6,2-8,3)	4,9 (3,7-5,7)	3,1	6,3

CENO: Concentração de Efeito Não Observado;

CEO: Concentração de Efeito Observado;

Cip50: Concentração de Inibição da reprodução em 50% da população;

Cip25: Concentração de Inibição da reprodução em 25% da população;

ARMM: Água Reconstituída Muito Mole (Very Soft Reconstituted Water);

ARM: Água Reconstituída Mole (Soft Reconstituted Water);

(1): Faixa de dureza encontrada nas amostras e no elutriato;

(2): Faixa de dureza da água de cultivo utilizada nos testes.

Os valores baseiam-se em testes com efluentes, onde pode haver altas concentrações de outros metais e o EDTA portanto não reagiriam com metais essenciais para os organismos, como o Cálcio e o Magnésio. Neste caso, as altas concentrações de EDTA ($8,0 \text{ mg L}^{-1}$) causariam os efeitos, tanto por remover os elementos essenciais quanto por sua toxicidade (USEPA, 1992b). Por outro lado, o tratamento da amostra P22 com o EDTA não interferiu na toxicidade, o que pode reforçar as evidências de que outras substâncias que não interagem com o EDTA possam ter causado a toxicidade.

O mesmo se aplica ao tiosulfato, em que os valores também são definidos de acordo com a concentração de efeito. As concentrações utilizadas no teste (10 e 25 mg L^{-1}) estão abaixo da CENO, ou seja, da maior concentração que não causa efeitos significativos na população (Tabela 14). Entretanto, na AIT com a água e sedimento do ponto P22, foram observados efeitos negativos na reprodução nas amostras e brancos testados com a maior concentração de tiosulfato de sódio (25 mg L^{-1}).

Assim, para algumas situações em que as amostras são pouco tóxicas, recomenda-se cautela ou até dispensa-se o uso destes agentes quelantes e oxidantes em concentrações próximas aos níveis de efeito (USEPA, 1992b).

Tabela 14. – Toxicidade crônica do Tiosulfato de sódio para a espécie *Ceriodaphnia dubia* (7 dias) em relação à dureza do meio. Valores em mg L^{-1} . (USEPA, 1992b)

Tipo de água	Dureza	Clp50	Clp25	CENO	CEO
ARM	40-48 ⁽¹⁾	39 (30-42)	26 (15-33)	30	60

CENO: Concentração de Efeito Não Observado;

CEO: Concentração de Efeito Observado;

Clp50: Concentração de Inibição da reprodução em 50% da população;

Clp25: Concentração de Inibição da reprodução em 25% da população;

ARMM: Água Reconstituída Muito Mole (Very Soft Reconstituted Water);

ARM: Água Reconstituída Mole (Soft Reconstituted Water);

(1): Faixa de dureza da água de cultivo utilizada nos testes.

Apenas três tratamentos reduziram significativamente a toxicidade nas amostras de sedimento elutriado: Extração em Fase Sólida, Graduação de pH 7 e 9 (Figura 14). Para estes dados, foi utilizado o teste estatístico Steel's Many One, pois não houve normalidade nas médias de reprodução das fêmeas segundo o teste do Qui-quadrado.

As reduções de graduação de pH, como já exposto anteriormente no item 3.1. (Aspectos Metodológicos da AIT), indicam a toxicidade causada por substâncias pH-dependentes, como a amônia e sulfetos (Botta-Paschoal, 2002). No teste com a amostra, nota-se a redução de toxicidade em valores de pH superiores, e que em conjunto com os resultados negativos para a redução de toxicidade pela aeração, descartam a possibilidade de toxicidade por sulfetos (H_2S e HS^-) e surfactantes; metais pH-dependentes também são descartados devido aos resultados de EDTA e Tiosulfato (USEPA, 1991).

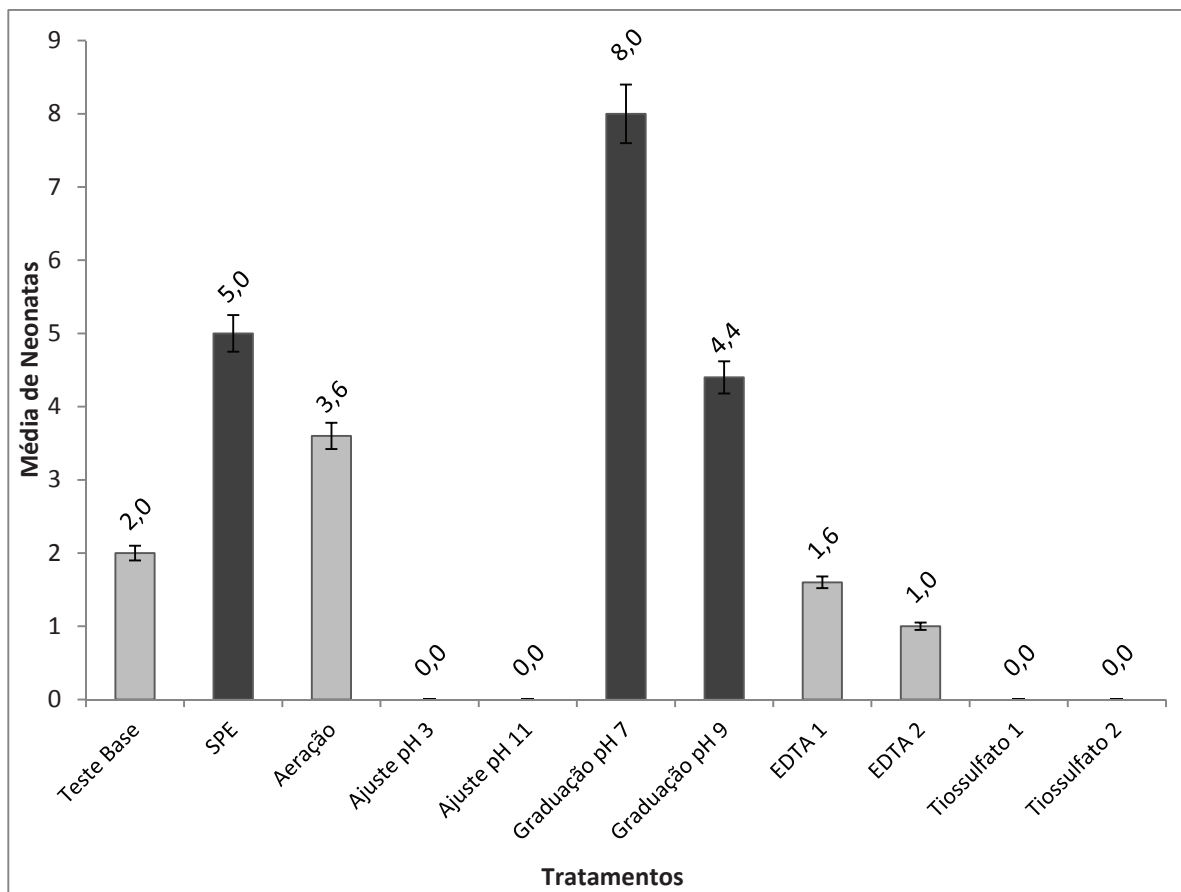


Figura 14. Médias de reprodução em cada tratamento da Fase I na amostra de sedimento do ponto 22. As colunas em destaque (em cinza escuro) indicam os tratamentos que reduziram significativamente a toxicidade crônica da amostra.

Assim, as evidências apontam para substâncias orgânicas, já que a toxicidade pôde ser reduzida pós extração em fase sólida. Entretanto, os testes de recuperação da toxicidade, com os eluatos de metanol não demonstraram toxicidade. Após a extração dos compostos pela coluna C18, a mesma foi eluída com 2mL de metanol 100%. O extrato final estava 150x mais concentrado, e os testes de recuperação foram ordenados em 3x e 1,5x mais concentrados que na amostra. Os extratos foram adicionados à água de cultivo (300 e 150 μ L em 15 mL para cada réplica), bem como 300 μ L de metanol puro foi adicionado e serviu como controle positivo.

Os testes de toxicidade crônica com *C. dubia* com os eluatos da coluna C18 não mostraram diferenças significativas com o controle negativo, ou seja, não houve

recuperação da toxicidade. Quando a toxicidade é removida na coluna e o extrato de metanol não recupera toxicidade, não significa que a possibilidade de toxicidade causada por orgânicos apolares está totalmente descartada, pois existem compostos que são bem adsorvidos pela Octadecil-silica e que podem ser removidos com solventes mais polares (Lukasewycz & Durhan, 1992; USEPA, 1992). Isto pode ser feito diluindo-se o metanol em água, formando várias frações diferentes (100%, 95%, 90%, 85% etc...) aumentando consequentemente a polaridade, ou em alguns casos, utilizar outros tipos de solvente ou até mesmo outras fases sólidas.

Situação semelhante foi descrita por Anderson e colaboradores (2006) em dois corpos d'água na Califórnia. Os ensaios da fase I da AIT com *C. dubia* e *Hyalella azteca* mostraram reduções na toxicidade em amostras de água e sedimento após tratamento com C18. A coluna foi eluída com metanol 100%, mas o extrato não recuperou a toxicidade. De acordo com as análises químicas, o metanol foi capaz de recuperar apenas fração de Chlorpyrifos presente na C18.

Os autores ainda utilizaram a adição de enzimas para caracterizar a toxicidade causada por algumas classes de pesticidas. A adição de Piperonyl Butoxide (PBO) nas amostras de água reduziu a toxicidade, forte evidência que sugere a toxicidade causada por Compostos Ativados Metabolicamente. A toxicidade de alguns pesticidas como o Chlorpyrifos, encontrado na amostra, é reduzida quando a ação do Citocromomo P450 é inibida por enzimas como a PBO (Ankley *et al.* 1991). No sedimento, a adição de PBO aumentou toxicidade da amostra, indicando também a presença de pesticidas Piretróides, devido ao sinergismo entre estas duas substâncias (Anderson *et al.*, 2006)

Outros autores também utilizam enzimas na caracterização de toxicidade em corpos d'água influenciados por atividades agrícolas. A enzima Carboxyl Esterase e Piperonyl Butoxide, por exemplo, foram utilizadas por Phillips e colaboradores (2006) para caracterizar a toxicidade de pesticidas Piretróides (Permethrin, Esfenvalerate e Fenvalerate) e organofosforados (Chlorpyrifos e Diazinon), respectivamente; em um córrego influenciado por agricultura na Califórnia, Weston e colaboradores (2007) caracterizaram a toxicidade de piretróides com a combinação de resultados dos testes de adição da PBO, de esterase e diminuição da temperatura nas amostras; a toxicidade associada aos pesticidas piretróides

permethrin e bifenthrin em amostras de água e sedimento (água intersticial) foi removida pela adição de Carboxylesterase em ensaios com *C. dubia* e *H. Azteca* (Wheelock *et al.*, 2006).

Estes resultados mostram a eficiência da utilização de enzimas em conjunto com os procedimentos de avaliação e identificação de toxicidade tradicionais, propostos pela USEPA (1991). Em casos como o de Bom Repouso, a utilização das enzimas poderia aumentar o peso da evidência da contaminação causada por pesticidas. Em um recente trabalho publicado por Weston & Lydy (2010), os autores propõem a utilização de uma metodologia focada para os pesticidas, com a utilização de enzimas e redução de temperatura para a caracterização da toxicidade em ambientes aquáticos influenciados por atividades agrícolas.

6. CONCLUSÕES

Os testes de toxicidade mostraram que as amostras de água apresentaram apenas toxicidade crônica, e que poderia perder toxicidade ao ser diluída. Entretanto, efeitos mais sérios (mortalidade) sobre os organismos testados foi observado no sedimento do Ponto 22, circundado por plantações de morango, batata e pasto para pecuária.

Os resultados dos ensaios com uma amostra de referência aumentaram as evidências de que o efeito sobre os organismos não era apenas causado por *stress* devido às diferenças físicas e químicas entre as amostras e a água em que foram cultivados.

Assim, a AIT com as amostras de água permitiu observar que os efeitos eram causados por uma combinação de fatores, como o baixo pH e dureza da amostra e a presença de substâncias como o ferro e cromo, por exemplo. A AIT em amostras de sedimento elutriado revelou um panorama diferente do visto com as amostras de água, pois os testes demonstraram reduções de toxicidade nas fases de graduação e extração em fase sólida, o que também caracteriza combinação de fatores como *stress* dos organismos e presença de substâncias orgânicas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação ambiental na atualidade tem uma importância considerável, visto que devido as atividades humanas, a pressão sobre os recursos naturais apenas aumentou desde a revolução industrial em meados do século XVIII. Observa-se que hoje existem milhares de substâncias químicas que são lançadas no ambiente pontualmente ou difusamente, resíduos das atividades humanas.

Devido à essa complexidade, as técnicas de avaliação da saúde ambiental, especialmente dos ecossistemas aquáticos, devem integrar ferramentas para que se reduzam as incertezas e se estabeleçam medidas de controle e recuperação. Assim, a Avaliação e Identificação de Toxicidade assume no mundo atual um importante papel nos estudos de ambientes degradados por substâncias químicas e resíduos gerados pelas atividades humanas

Em ambientes em que há suspeitas de toxicidade, e em que existem diversos fatores de risco, como o uso extensivo de agroquímicos e falta de saneamento básico, e despejo de efluentes domésticos e industriais, é interessante o desenvolvimento de estudos de AIT, tanto para a avaliação de risco sobre os ecossistemas, quanto para a saúde humana. Entretanto, a rotina completa ainda é muito cara e dispendiosa, e muitas classes de contaminantes ainda não são bem caracterizados na fase I, o que dificulta a realização em projetos com baixo orçamento e pessoal reduzido.

No caso de Bom Repouso, em que existe risco potencial por conta da agricultura de morango e batata, e por ser a região em que as nascentes são abundantes, foi justificada a utilização da técnica, motivada por resultados de toxicidade crônica em campanhas anteriores. Para estudos futuros nos corpos d'água de Bom Repouso ou outras regiões onde há possível contaminação causada por atividades agrícolas, recomenda-se a utilização de metodologias de Avaliação e Identificação de Toxicidade, mais específicas à caracterização de classes de pesticidas, como a adição de enzimas e utilização de outras técnicas na Extração em Fase Sólida.

A resolução de qualquer problema relacionado à toxicidade nas nascentes de Bom Repouso, assim como já demonstrado em estudos anteriores, está na adoção de políticas públicas para a solução dos problemas de saneamento básico; conscientização da população quanto ao problema do uso extensivo de agroquímicos; incentivo aos meios de produção mais sustentáveis, como a agricultura orgânica, por exemplo; a recuperação das áreas de entorno com vegetação nativa, para minimizar quaisquer efeitos causados pelo escoamento superficial, evitando que as substâncias usadas nas plantações de entorno alcancem os corpos d'água; e por fim, projetos de monitoramento ambiental mais frequentes e com maior duração, que poderão subsidiar quaisquer ações de manejo de forma mais completa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (2005) *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Projeto NBR 13573. ABNT. Rio de Janeiro, 15p.
- Amato, J.R.; Mount, D.I.; Durhan, E.J.; Lucasewycz, M.T.; Ankley, G.T.; Robert, E.D. (1992) An Example of the Identification of Diazinon as a Primary Toxicant in Effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 11, pp. 209 - 216.
- ANA - Agência Nacional das Águas (2008). Dados pluviométricos do posto pluviométrico de Inconfidentes (MG) (código 2246056). Disponível em <www.hidroweb.ana.gov.br>. Acesso: 09 de dezembro de 2008.
- Anderson, B. S., Phillips, B. M., Hunt, J. W., Worcester, K., Adams, M. S., Kapellas, N., and Tjeerdema, R. S. (2006) Evidence of pesticide impacts in the Santa Maria river watershed, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n. 25, v.4. pp 1160-1170.
- Ankley, G.T. & Burkhard, L. P. (1992) Identification of Surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 11, pp. 1235 – 1248.

- Ankley, G.T.; Katko, A. & Arthur, J.W. (1990) Identification of ammonia as important sediment-associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 9, pp. 313 – 322
- Ankley, G.T & Schubauer-Berigan, M. K. (1994) Comparison of Techniques for the Isolation of Sediment Pore Water for Toxicity Testing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* N. 27. pp. 507-512
- Ankley, G. T. & Schubauer-Berigan, M. K. (1995) Background and overview of current sediment toxicity identification evaluation procedures. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, n, 4. pp 133-149.
- 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. (2006) Application of Toxicity Identification Evaluation to Sediment in a Highly Contaminated Water Reservoir in Southeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. V. 25, N. 2. pp. 581 – 588.
- Azevedo, F.A. & Chasin, A.A.M. (Coords.) (2003) *Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. Editora RIMA. São Carlos, 322 p.
- Badaró-Pedroso, C. (1999). *Avaliação dos Efeitos e Identificação da Toxicidade da Água de Produção de Petróleo sobre Algumas Espécies Marinhas*. Tese de Doutorado, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 242 p.
- Baruqui, F. M.; Resende, M.; Figueiredo, M. S. 1985. Causas da degradação e possibilidades de recuperação das pastagens em Minas (Zona da Mata e Rio Doce). *Informe Agropecuário*, n. 128, v. 11, pp. 27-37.
- Besser, J. M.; Ingersoll, C. G.; Leonard, E. N.; Mount, D. R. (1998). Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: Implications for toxicity identification evaluation procedures. *Environ. Toxicol. Chem.* V. 17, N. 11, pp. 2310-2317.
- Botta, C.M.R.; Araújo, R.P.A.; Silvério, P.F.; Almeida, F.V.; Mozeto, A.A. (2006) Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) de Amostra de Sedimento de Água Doce. In: Mozeto, A.A; Umbuzeiro, G.A.; Jardim, W.F.(2006) *Métodos de Coleta, análises físico-químicas e*

ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce. Cubo Multimídia, São Carlos – SP. 135 - 160p.

Botta-Paschoal, C.M.R. (2002) *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 de Doutorado, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 146 p.

Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Espíndola, E. L. G. (2004) *Avaliação e Identificação da Toxicidade do Sedimento no Reservatório de Salto Grande*. In: Espíndola, E. L. G.; Leite, M.A.; Dornfeld, C.B. (Eds.) (2004) *Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo*. Rima Editora, São Carlos – SP. 339 - 357p.

Brasil. (2005) Congresso. Senado. Resolução Conama n. 357, de 18 de março de 2005. Dispõe sobre padrão de qualidade de água e emissão de poluentes. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/>>. Acesso em: 07 dez. 2009.

Brasil.(2008) Congresso. Senado. Resolução Conama n. 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/>>. Acesso em: 07 dez. 2009.

Brigante, J.; Espíndola, E. L. G. (2003) A bacia hidrográfica: aspectos conceituais e caracterização geral da bacia do Rio Mogi-Guaçu. In: Brigante, J. & Espíndola, E. L. G. (Eds) (2003). *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. Rima. São Carlos – SP. Cap 1. 1-13 pp.

Brigante, J.; Espíndola, E. L. G.; Eler, M. N. (2003) Análise dos principais impactos ambientais no rio Mogi-Guaçu: recomendações para orientar políticas públicas. In: Brigante, J. & Espíndola, E. L. G. (Eds) (2003). *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. Rima. São Carlos – SP. Cap 12. 204-230 pp.

- Buratini, S. & Bertoletti, E. (2006). Análise Estatística. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (Eds.) 2006. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. São Carlos – SP. 464p.
- Buratini, S.V.; Aragão, M.A.; Araújo, R.P.A.; Prósperi, V.A.; Werner, L.I. (2007) Avaliação e Identificação da Toxicidade no rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, V.2, N.3, pp. 257 - 262
- Burgess, R. M.; Cantwell, M. G.; Pelletier, M. C.; Ho, K. T.; Serbst, J. R.; Cook, H. F.; Kuhn, A. (2000) Development of a Toxicity Identification Evaluation Procedure for Characterizing Metal Toxicity in Marine Sediments. *Environ. Toxicol. and Chem.* Vol. 19, No. 4, pp. 982–991
- Burkhard, L.P. & Jenson, J.J. (1993) Identification of Ammonia, Chlorine, and Diazinon as Toxicants in a Municipal Effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 506-515
- Carr, R.S.; Nipper, M.; Biedenbach, J.M.; Hooten, R.L.; Miller, K.; Saepoff, S. (2001) Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Studies at Marine Sites Suspected of Ordnance Contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* N. 41, pp. 298–307
- CAS - Chemical Abstracts Service. (2009) 50 Millionth Unique Chemical Substance Recorded in CAS registry. Disponível em: <http://www.cas.org/newsevents/releases/50millionth090809.html>. Acessada em junho de 2009.
- Chapman, D. (Ed) (1992) *Water quality assessments. A guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring*. 1st ed. Chapman & Hall, Cambridge. 585 p.
- Costa, C. M. R. (1998). Biodiversidade em Minas Gerais: um Atlas para sua conservação. Belo Horizonte: FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 94p, il.
- Costa, J.B. (2007) *Avaliação Ecotoxicológica de Efluente de Tratamento Secundário de Esgoto Sanitário Após Desinfecção com Ácido Peracético, Cloro, Ozônio e Radiação Ultravioleta*. Tese de Doutorado, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 180 p.

- Cuhna, G. P. Q. (2009) *Caracterização ambiental da região de montante do rio Mogi-Guaçu (Bom Repouso —MG): estratégias para a replicabilidade e diretrizes para elaboração do plano de adequação ambiental*. Tese de Doutorado, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 232 p.
- Cunha, G.P.Q.; Espíndola, E.L.G.; Brigante, J. (2007) Potencialidades e Fragilidades dos Sistemas Hídricos Localizados na Região de Montante do Rio Mogi-Guaçu: Enfoque Sobre os Impactos Ambientais e Cumprimento da Legislação Ambiental Vigente. In: XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2007, São Paulo. *Anais do XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos*.
- Deanovic, L.; Connor, V. M.; Knight, A.W.; Maier, K. J. (1999) The Use of Bioassays and Toxicity Identification Evaluation (TIE) Procedures to Assess Recovery and Effectiveness of Remedial Activities in a Mine Drainage-Impacted Stream System. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* N. 36. pp. 21–27
- Douglas, W. S.; Grasso, S. S.; Hutton, D. G; Schroeder, K. R. (1996) Ionic Imbalance as a Source of Toxicity in an Estuarine Effluent. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* N. 31. pp. 426-432
- Duarte, I.C.S. (2006) *Caracterização Microbiológica da Remoção e Degradação de Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) em Reatores Anaeróbios com Biofilmes e Células Planctônicas*. Tese de Doutorado, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil, 262 p.
- Durhan, E. J., Lukasewycz, M. T., & Baker, S. E. (1993) Alternatives to methanol-water elution of solid phase extraction columns for the fractionation of high log Kow organic compounds in aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography*, n. 629. pp. 67-74.
- Environment Canada (1990) *Guidance document control of toxicity test precision using reference toxicants*. Report EPS 1/RM/12. 85p.

- Espíndola, E. L. G.; Brigante, J. ; Dornfeld, C. B. (2003) Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: Brigante, J. & Espíndola, E. L. G. (Eds) (2003). *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. Rima. São Carlos – SP. Cap 8. 129-148 pp.
- Fernández, c.; Alonso, c.; Pro, j.; Babín, m. M.; García, p.; Tarazona, j. V.; Carbonell, G. (2004) Toxicity Identification Evaluation of Organic Pollutants Based on Solid-Phase Micro-Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* V.72. pp. 903–910
- Gandolfi, N. (1971). *Investigações sedimentológicas, morfométricas e físico-químicas nas Bacias do Mogi-Guaçu, do Ribeira de Iguape e do Peixe*. Livre Docência. Dept. de Geologia e Mecânica dos Solos. EESC. USP. 108p.
- Gesberg, R.M.; Daft, D.; Yorkey, D. (2004). Temporal Pattern in Runoff from the Tijuana River Watershed. *Water Research*. V. 38. pp. 559-568.
- Grung, M.; Lichtenthaler, R.; Ahel, M.; Tollefsen, K.; Langford, K.; Thomas, K. (2007) Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere*, V.67. pp. 108–120.
- Guzzella, L.; Bartone, C.; Ross, F.; Tartari, G.; Muntau, H. (1996) Toxicity Identification Evaluation of Lake Orta (Northern Italy) Sediments Using the Microtox System. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. N. 35. pp. 231–235
- Ho, K. T.; McKinney, R.A.; Kuhn, A.; Pelletier, M. C.; Burgess, R. M. (1997) Identification of Acute Toxicants in New Bedford Harbor Sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. V. 16, N. 3, pp. 551-558
- Hockett, J. R. & Mount, D. R. (1996) Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. V.10, N. 15, pp. 1687-1693.
- Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns J. R. J. (Eds.). (2003) *Handbook of Ecotoxicology*. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton/USA. 1257p.

- Jin, H.; Yang, X.; Yin, D.; Yu, H. (1999). A Case Study on Identifying the Toxicant in Effluent Discharged from a Chemical Plant. *Marine Pollution Bulletin*, V. 39, N. 1-12, pp. 122-125.
- Jo, H.J.; Park, E.J.; Cho, K.; Kim, E.H.; Jung, J. (2008) Toxicity identification and reduction of wastewaters from a pigment manufacturing factory. *Chemosphere*, n. 70, pp. 949–957
- Kay, D.P.; Newsted, J.L.; Benkinney, M.T.; Iannuzzi, T.J.; Giesy, J.P. (2007) Passaic River Sediment Interstitial Water Phase I Toxicity Identification Evaluation. *Chemosphere*. In press. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.048
- Keddy, C. J.; Greene, J.C.; Bonnell, M.A. (1995) Review of Whole-Organism Bioassays: Soil, Freshwater Sediment and Freshwater Assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30. pp. 221 – 251.
- Kim, E.; Jun, Y.; Jo, H.; Shim, S.; Jung, J. (2008) Toxicity identification in metal plating effluent: Implications in establishing effluent discharge limits using bioassays in Korea. *Marine Pollution Bulletin*. V. 57, pp. 637–644
- Kwok, Y.C.; Hsieh, D.P.H.; Wong, P.K. (2005) Toxicity identification evaluation (TIE) of pore water of contaminated marine sediments collected from Hong Kong Waters. *Marine Pollution Bulletin*. V.51, pp. 1085–1091
- Lukasewycz, M.T. & Durhan, E.J. (1992) Strategies for Identification of Non – Polar Toxicants in Aqueous Environmental Samples using Toxicity – Based Fractionation and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*. N. 580. pp. 215-228.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010). AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: junho de 2010.
- Meletti, P. C.; Rocha, O.; Martinez, C. B. R. (2003) Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas. In: Brigante, J. & Espíndola, E. L. G. (Eds) (2003). *Limnologia Fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. Rima. São Carlos – SP. Cap. 9. 149-180 pp.

- Mount, D.R. & Hockett, R. (2000). Use of Toxicity Identification Evaluation Methods to Characterize, Identify, and Confirm Hexavalent Chromium Toxicity in an Industrial Effluent. *Water Research*. V. 34, N. 4. pp. 1379 - 1385
- Muñoz, M.J.; Castaño, A; Blazquez, T.; Vega, M.; Carbonell, G.; Ortiz, J.A.; Carballo, M.; Tarazona, J.V. (1994) Toxicity Identification Evaluations for the Investigation of Fish Kills: A Case Study. *Chemosphere*, V. 29, N. 1. pp. 55-61
- Newman, M.C. & Unger, M.A. (2003) *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2nd Ed. Lewis Publishers. Boca Raton, 458 p.
- Norbert-King, T. J.; Durhan, E. J.; Ankley, G. T.; Robert, E. (1991) Application of Toxicity Identification Evaluation Procedures to the Ambient Waters of the Colusa Basin Drain, California. *Environ. Toxicol. Chem.* V. 10, pp. 891-900.
- Onikura, N.; Kishi, K.; Nakamura, A.; Takeuchi, S. (2007) A Screening Method for Toxicity Identification Evaluation on an Industrial Effluent Using Chelex®-100 Resin and Chelators for Specific Metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, V. 27, N. 2. pp. 07 - 27
- ONU – Organização das Nações Unidas (2002) *Global challenge. Global opportunity: trends in sustainable development*. The United Nations Department of Economic and Social Affairs for the World Summit on Sustainable Development. Johannesburg, 24p.
- Ostroumov, S.A. (2006) *Biological Effects of Surfactants*. Taylor & Francis, Boca Raton – USA. 252 p.
- Paasivirta, J. (1991) *Chemical Ecotoxicology*. Chelsea: Lewis Publication, Inc. 210 p.
- Petrovic, M.; Eljarrat, e.; Lopez de Alda, M.J.; Barcelo, D. (2004) Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal Bioanal Chem.* 378 : 549-562
- Phillips, B. M., Anderson, B. S., Hunt, J. W., Huntley, S. A., Tjeerdema, R. S., Kapellas, N., and Worcester, K. (2006) Solid-phase sediment toxicity identification evaluation in an agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n. 25, v. 6. pp. 1671-1676.

- Phillips, B. M.; Anderson, B. S.; Hunt, J. W.; Thompson, B.; Lowe, S.; Hoenicke, R.; Tjeerdema, R.S. (2003) Causes of Sediment Toxicity to *Mytilus galloprovincialis* in San Francisco Bay, California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* N. 45. pp. 492–497
- Picone, M.; Bergamin, M.; Volpato, E.; Delaney, E.; Turetta, C.; Ranaldo, M. Capodaglio, G.; Nasi, C. (2008) Sequential toxicity identification evaluation (TIE) for characterizing toxicity of Venice Lagoon sediments: Comparison of two different approaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. In Press. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.06.010
- Pimentel, L.C.F.; Chaves, C.R.; Freire, L.A.A.; Afonso, J.C. (2006) O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. *Química Nova*, 29, n.5. pp. 1138-1149.
- Pritchard, J.B.; Walden, R.; Oikari, A. (1991) Dehydroabiatic Acid, a Major Anionic Contaminant of Pulp Mill Effluent, Reduces Both Active p-Aminohippurate Transport and Passive Membrane Permeability in Isolated Renal Membranes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. V.259, N.1. pp. 156-163
- Resende, J. C. (2009) *Avaliação das águas de abastecimento da área rural do município de Bom Repouso, MG*. Monografia de Graduação, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 130 p.
- Rissanen, E.; Krumschnabel, G.; Nikinmaa, M. (2003) Dehydroabiatic acid, a major component of wood industry effluents, interferes with cellular energetics in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology*. V.62. pp. 45-53.
- Riveles, K.; Gesberg, R.M. (1999) Toxicity Identification Evaluation of Wet and Dry Weather Runoff from the Tijuana River Watershed. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* N. 63. pp.625-632.
- Rodrigues, B.K. (2007) *Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae)*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. 138p.
- Schiel, D.; Mascarenhas, S.; Valeiras, N.; Santos, S. A. M.(Org.) (2002) *O Estudo de Bacias Hidrográficas. Uma estratégia para educação ambiental*. Rima, São Carlos – SP. 177p.

- Schubauer-Berigan, M. K. and Ankley, G. T. (1991) The contribution of ammonia, metals and nonpolar organics compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an Illinois River tributary. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 10. pp. 925-939.
- Schwarzenbach, R.P.; Escher, B.I.; Fenner, K.; Hofstetter, T.B.; Johnson, C.A.; Von Gunten, U.; Wehrli, B. (2006) The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313. pp. 1072-1077.
- Stronkhorst, J.; Schot, M.E.; Dubbeldam, M.C.; Ho, K.T. (2003) A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Marine Pollution Bulletin*. V. 46, PP. 56–64
- Stumm, W.; Morgan, J.J. (1981) *Aquatic Chemistry – An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 583p.
- Thomas, K. V., Hurst, M. R., Matthiessen, P., Sheahan, D., and Williams, R. (2001) Toxicity characterisation of organic contaminants in stormwaters from an agricultural headwater stream. *Water Research*, V. 35, N. 10. pp. 2411-2416.
- Truhaut, R. (1977) Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **1**, 151-173.
- Tundisi, J. G. (2003) *Água no século XXI: enfrentando a escassez*. 1. ed. Editora Rima, São Carlos. 248 p
- USEPA (1989) Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations (TREs). EPA/600/2-88/070. 107p.
- _____ (1991) *Methods for Aquatic Toxicity Identifications Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures*. 2ed. EPA/600/6-91/003. 87p.
- _____ (1992a). *Short – term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. EPA/600/4-91/022. 355p.
- _____ (1992b) *Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents*, Phase I. EPA/600/6-91/005F. 59 p.

- _____ (1993a) *Methods for Aquatic Toxicity Identifications Evaluations. Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity.* EPA/600/R-92/080. 70p.
- _____ (1993b) *Methods for Aquatic Toxicity Identifications Evaluations. Phase III Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity.* EPA/600/R-92/081. 40p.
- _____ (1999) *Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants.* EPA/833B-99/002. 97p.
- _____ (2002). *Short – term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.* 4 ed. EPA – 821 – R – 02 – 13. 355p.
- Wells , M. J. M; Rossano, Jr., A. J.; Roberts, E. C. (1994) Textile Wastewater Effluent Toxicity Identification Evaluation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* N. 27. pp. 555-560
- Wenholz, M. & Crunkilton, R. (1995) Use of Toxicity Identification Evaluation Procedures in the Assessment of Sediment Pore Water Toxicity from an Urban Stormwater Retention Pond in Madison, Wisconsin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* N. 54. pp.676-682
- Weston, D. P. and Lydy, M. J. (2010) Focused toxicity identification evaluations to rapidly identify the cause of toxicity in environmental samples. *Chemosphere*, N. 78. pp. 368-374.
- Weston, D.P.; Zhang, M.; Lydy, M.J.(2008) Identifying the Cause and Source of Sediment Toxicity in an Agriculture-Influenced Creek. *Environ. Toxicol. and Chem.* V. 27. N.4. pp. 953-962.
- Wheelock, C. E.; Miller, J. L.; Miller, M. J.; Gee, S.J.; Shan, G.; Hammock, B. D. (2004) Development of Toxicity Identification Evaluation Procedures for Pyrethroid Detection Using Esterase Activity. *Environ. Toxicol. Chem.* N. 23, V. 11, pp. 2699-2708.
- Wheelock, C. E., Miller, J. L., Miller, M. J., Phillips, B. M., Huntley, S. A., Gee, S. J., Tjeerdema, R. S., and Hammock, B. D. (2006) Use of carboxylesterase activity to remove pyrethroid-

associated toxicity to ceriodaphnia dubia and hyalella azteca in toxicity identification evaluations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, V. 25, N.4. pp. 973-984.

Yang, L.; Yu, H. ; Yin, D.; Jin, H. (1999) Application of the Simplified Toxicity Identification Evaluation Procedures to a Chemical Works Effluent. *Chemosphere*, Vol. 38, No. 15, pp. 3571-3577.

Zagatto, P.A. (2006) O Uso de Substâncias de Referência no Controle de Qualidade de Ensaio Ecotoxicológicos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. (Eds.) (2006) *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. São Carlos – SP. 464p.

ANEXOS

Anexo A
Bibliografia Consultada

Trabalhos em revistas periódicas sobre Avaliação e Identificação de Toxicidade

- Alonso, C., Carbonell, G., Tarazona, J. V., Bab, M., Garc, P., and Fernández, C. (2001) Toxicological characterisation of sludge from sewage treatment plants using toxicity identification evaluation protocols based on in vitro toxicity tests. *Toxicology in Vitro*, 15, 519-524.
- Amato, J. R., Mount, D. R., Durhan, E. J., Lukasewycz, M. T., Ankley, G. T., and Robert, E. D. (1992) An example of the identification of Diazinon as a primary toxicant in an effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 209-216.
- Amweg, E. L. and Weston, D. P. (2007) Whole-sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: i. piperonyl butoxide addition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(11), 2389-2396.
- Amweg, E. L. and Weston, D. P. (2007) Whole-sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: II. esterase addition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(11), 2397-2404.
- Andersen, H. B. (2004) Toxicity Identification Evaluations (TIEs) of Freshwater Samples Using a Metal Chelating Resin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 697-705.
- Anderson, B. S., Hunt, J. W., Phillips, B. M., Thompson, B., Lowe, S., Taberski, K., and Carr, R. S. (2007) Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environmental Research*, 105, 145-155.
- Anderson, B. S., Phillips, B. M., Hunt, J. W., Worcester, K., Adams, M. S., Kapellas, N., and Tjeerdema, R. S. (2006) Evidence of pesticide impacts in the Santa Maria river watershed, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(4), 1160-1170.
- Ankley, G. T. and Burkhard, L. P. (1992) Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1235-1248.

- Ankley, G. T. and Hoke, R. A. (1992) Use of Toxicity Identification Evaluation Techniques to Identify Dredged Material Disposal Options: A Proposed Approach. *Environmental Management*, 16(1), 1-6.
- Ankley, G. T. and Schubauer-Berigan, M. K. (1994) Comparison of Techniques for the Isolation of Sediment Pore Water for Toxicity Testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27, 507-512.
- Ankley, G. T. and Schubauer-Berigan, M. K. (1995) Background and overview of current sediment toxicity identification evaluation procedures. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 4, 133-149.
- Ankley, G. T., Dierkes, J. R., Jensen, D. A., and Peterson, G. S. (1991) Piperonyl Butoxide as a Tool in Aquatic Toxicological with Organophosphate Insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 266-274.
- Ankley, G. T., Katko, A., and Arthur, J. W. (1990) Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the Lower Fox river and Green Bay, Wisconsin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 313-322.
- Ankley, G. T., Peterson, G. S., Lukasewycz, M. T., and Jensen, D. A. (1990) Characteristics of surfactants in Toxicity Identification Evaluations. *Chemosphere*, 21(1-2), 3-12.
- Araújo, R. P., Botta-paschoal, C. M., Silvério, P. F., Almeida, F. V., Rodrigues, P. F., Umbuzeiro, G. A., Jardim, W. F., and Mozeto, A. A. (2006) Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(2), 581-588.
- Bailey, H. C., Deanovic, L., Reyes, E., Kimball, T., Larson, K., Cortright, K., Connor, V. M., and Hinton, D. E. (2000) Diazinon and Chlorpyrifos in Urban Waterways in Northern California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(1), 82-87.
- Bailey, H. C., Digiorgio, C., Kroll, K., Miller, J. L., Hinton, D. E., and Starrett, G. (1996) Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(6), 837-845.

- Bailey, H. C., Elphick, J. R., Krassol, R., Mulhall, A. M., Lovell, A. J., and Slee, D. J. (2005) Identification of chlorfenvinphos toxicity in a municipal effluent in Sydney, New South Wales, Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1773-1778.
- Bailey, H. C., Elphick, J. R., Potter, A., and Zak, B. (1999) Zinc toxicity in stormwater runoff from sawmills in British Columbia. *Water Research*, 33(11), 2721-2725.
- Beg, M. U., Saeed, T., Al-Muzaini, S., Beg, K. R., Al-Obaid, T., and Kurian, A. (2001) Extraction, Fractionation, and Toxicity Determination of Organic Contaminants in Sediment from Coastal Area Receiving Industrial Effluents in Kuwait. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 881- 888.
- Besser, J. M., Ingersoll, C. G., Leonard, E. N., and Mount, D. R. (1998) Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: implications for toxicity identification evaluation procedures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(11), 2310-2317.
- Boucher, A. M. and Watzin, M. C. (1999) Toxicity identification evaluation of metal-contaminated sediments using an artificial pore water containing dissolved organic carbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(3), 509-518.
- Boxall, A. B. and Maltby, L. (1995) The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff. *Water Research*, 29(9), 2043-2050.
- Brack, W., Paschke, A., Segner, H., Wennrich, R., and Schüürmann, G. (2000) Urease inhibition: a tool for toxicity identification in sediment elutriates. *Chemosphere*, 40, 829-834.
- Buratini, S. V., Aragão, M. A., Araújo, R. P., Prósperi, V. A., Werner, L. I. (2007) Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2(3), 257-262.
- Burch, S. W., Fitzpatrick, L. C., Goven, A. J., Venables, B. J., and Giggelman, M. A. (1999) In Vitro Earthworm *Lumbricus terrestris* Coelomocyte Assay for Use in Terrestrial Toxicity Identification Evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 547-554.

- Burgess, R. M., Cantwell, M. G., Pelletier, M. C., Ho, K. T., Serbst, J. R., Cook, H., and Kuhn, A. (2000) Development of a toxicity identification evaluation procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4), 982-991.
- Burgess, R. M., Chales, J. B., Kuhn, A., Ho, K. T., Patton, L. E., and McGovern, D. G. (1997) Development of a cation-exchange methodology for marine toxicity identification evaluation applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6), 1203-1211.
- Burgess, R. M., Ho, K. T., Tagliabue, M. D., Kuhn, A., Comeleo, R., Comeleo, P., Modica, G., and Morrison, G. E. (1995) Toxicity Characterization of an Industrial and a Municipal Effluent Discharging to the Marine Environment. *Marine Pollution Bulletin*, 30(8), 524-535.
- Burgess, R. M., Pelletier, M. C., Ho, K. T., Serbst, J. R., Ryba, S. A., Kuhn, A., Perron, M. M., Raczelowski, P., and Cantwell, M. G. (2003) Removal of ammonia toxicity in marine sediment TIEs: a comparison of *Ulva lactuca*, zeolite and aeration methods. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 607-618.
- Burgess, R. M., Perron, M. M., Cantwell, M. G., Ho, K. T., Pelletier, M. C., Serbst, J. R., and Ryba, S. A. (2007) Marine sediment Toxicity Identification Evaluation methods for the anionic metals Arsenic and Chromium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), 61-67.
- Burgess, R. M., Perron, M. M., Cantwell, M. G., Ho, K. T., Serbst, J. R., and Pelletier, M. C. (2004) Use of Zeolite for Removing Ammonia and Ammonia-Caused Toxicity in Marine Toxicity Identification Evaluations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47, 440 - 447.
- Burkhard, L. P. and Jenson, J. J. (1993) Identification of Ammonia, Chlorine, and Diazinon as Toxicants in a Municipal Effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 506-515.
- Burnison, B. K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M. R., Ternes, T., and Kraak, G. V. (2003) A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog

manure and agricultural runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10), 2243-2250.

Burton Jr, A. and Nordstrom, J. (2004) An in situ toxicity identification evaluation method part I: laboratory validation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(12), 2844-2850.

Burton Jr, A. and Nordstrom, J. (2004) An in situ toxicity identification evaluation method part II: field validation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(12), 2851-2855.

Carr, R. S., Biedenbach, J. M., and Hooten, R. L. (2001) Sediment Quality Assessment Survey and Toxicity Identification Evaluation Studies in Lavaca Bay, Texas, a Marine Superfund Site. *Environmental Toxicology*, 16(1), 20-30.

Carr, R. S., Nipper, M., Biedenbach, J. M., Hooten, R. L., Miller, K., and Saepoff, S. (2001) Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Studies at Marine Sites Suspected of Ordnance Contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41, 298 -307.

Chan, K., Wong, C. K., Hsieh, D. P., Ng, S. P., Lau, T. K., and Wong, P. K. (2003) Application of a Toxicity Identification Evaluation for a Sample of Effluent Discharged from a Dyeing Factory in Hong Kong. *Environmental Toxicology*, 18(5), 312-316.

Cooman, K., Gajardo, M., Nieto, J., Bornhardt, C., and Vidal, G. (2003) Tannery Wastewater Characterization and Toxicity Effects on *Daphnia* spp. *Environmental Toxicology*, 18(1), 45-51.

Coombe, V. T., Moore, K. W., and Hutchings, M. J. (1999) Tie and tre: an abbreviated guide to dealing with toxicity. *Water Science and Technology*, 39(10-11), 91-97.

Custer, K. W. and Burton Jr, A. (2008) *Isonychia* spp. and macroinvertebrate community responses to stressors in streams utilizing the benthic in situ toxicity identification evaluation (BiTIE) method. *Environmental Pollution*, 151.

Custer, K. W., Burton Jr, A., Coelho, R. S., and Smith, P. R. (2006) Determining stressor presence in streams receiving urban and agricultural runoff: development of a benthic in

situ toxicity identification evaluation method. *Environmental Toxicology*, 25(9), 2299-2305.

Deanovic, L., Connor, V. M., Knight, A. W., and Maier, K. J. (1999) The Use of Bioassays and Toxicity Identification Evaluation (TIE) Procedures to Assess Recovery and Effectiveness of Remedial Activities in a Mine Drainage-Impacted Stream System. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 21-27.

Desbrow, C., Routledge, J., Brighty, G., Sumpter, J., and Waldock, M. (1998) Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, 32(11), 1549-1558.

Douglas, W. S., Grasso, S. S., Hutton, D. G., and Schroeder, K. R. (1996) Ionic Imbalance as a Source of Toxicity in an Estuarine Effluent. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31, 426-432.

Durhan, E. J., Lukasewycz, M. T., and Baker, S. E. (1993) Alternatives to methanol-water elution of solid phase extraction columns for the fractionation of high log Kow organic compounds in aqueous environmental samples. *Journal of Chromatography*, 629, 67-74.

Elias-Samlalsingh, N. and Agard, J. B. (2004) Application of toxicity identification evaluation procedures for characterizing produced water using the tropical mysid, *metamysidopsis insularis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(5), 1194-1203.

Fernández, C., Alonso, C., Pro, J., Babín, M. M., García, P., Tarazona, J. V., and Carbonell, G. (2004) Toxicity Identification Evaluation of Organic Pollutants Based on Solid-Phase Micro-Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 903-910.

Fjälborg, B., Ahlberg, G., Nilsson, E., and Dave, G. (2005) Identification of metal toxicity in sewage sludge leachate. *Environment International*, 31, 25 - 31.

Fjälborg, B., Li, B., Nilsson, E., and Dave, G. (2006) Toxicity Identification Evaluation of Five Metals Performed with Two Organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 196-204.

- Furley, T. H. (2009) Identificação da causa da toxicidade de efluentes de fábricas de celulose e papel da América Latina. *O Papel*, Março, 34-42.
- Galassi, S. and Benfenati, E. (2000) Fractionation and toxicity evaluation of waste waters. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 149-154.
- Gersberg, R. M., Daft, D., and Yorkey, D. (2004) Temporal pattern of toxicity in runoff from the Tijuana River Watershed. *Water Research*, 38, 559-568.
- Grote, M., Brack, W., Walter, H., and Altenburger, R. (2005) Confirmation of cause-effect relationships using effect-directed analysis for complex environmental samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6), 1420-1427.
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K., Langford, K., and Thomas, K. V. (2007) Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere*, 67, 108-120.
- Gupta, G. and Karuppiah, M. (1996) Toxicity Identification Of Pocomoke River Porewater. *Chemosphere*, 33(5), 939-960.
- Gupta, G. and Karuppiah, M. (1996) Toxicity study of a chesapeake bay tributary - Wicomico River. *Chemosphere*, 32(6), 1193-1215.
- Gustavson, K. E., Sonsthagen, S. A., Crunkilton, R. A., and Harkin, J. M. (2000) Groundwater Toxicity Assessment Using Bioassay, Chemical, and Toxicity Identification Evaluation Analyses. *Environmental Toxicology*, 15, 421-430.
- Guzzella, L., Bartone, C., Ross, P., Tartari, G., and Muntau, H. (1996) Toxicity Identification Evaluation of Lake Orta (Northern Italy) Sediments Using the Microtox System. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 231-235.
- Hawthorne, S. B., Lanno, R., and Kreitinger, J. P. (2005) Reduction in acute toxicity of soils to terrestrial oligochaetes following the removal of bioavailable Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with mild supercritical carbon dioxide extraction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(8), 1893-1895.

- Heinis, L. J., Highland, T. L., and Mount, D. R. (2004) Method for Testing the Aquatic Toxicity of Sediment Extracts for Use in Identifying Organic Toxicants in Sediments. *Environmental Science & Technology*, 38, 6256-6262.
- Hewitt, L. M. and Marvin, C. H. (2005) Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutation Research*, 589, 208-232.
- Hewitt, L. M., Kovacs, T. G., Dubé, M. G., MacLatchy, D. L., Martel, P. H., McMaster, M. E., Paice, M. G., Parrot, J. L., Van Den Heuvel, M. R., and Van Der Kraak, G. J. (2008) Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: roles of individual compounds and mill operating conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(3), 682-697.
- Hewitt, L. M., Munkittrick, K. R., Scott, I. M., Carey, J. H., Solomon, K. R., and Servos, M. R. (1996) Use of an mfo-directed toxicity identification evaluation to isolate and characterize bioactive impurities from a lampricide formulation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(6), 894-905.
- Ho, K. T., Burgess, R. M., Pelletier, M. C., Serbst, J. R., Cook, H., Cantwell, M. G., Ryba, S. A., Perron, M. M., Lebo, J. A., Huckins, J. N., and Petty, J. D. (2004) Use of powdered coconut charcoal as a toxicity identification and evaluation manipulation for organic toxicants in marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(9), 2124-2131.
- Ho, K. T., Burgess, R. M., Pelletier, M. C., Serbst, J. R., Ryba, S. A., Cantwell, M. G., Kuhn, A., and Raczelowski, P. (2002) An overview of toxicant identification in sediments and dredged materials. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 286-293.
- Ho, K. T., Kuhn, A., Pelletier, M. C., Hendricks, T. L., and Helmstetter, A. (1998) pH Dependent Toxicity of Five Metals to Three Marine Organisms. *Environmental Toxicology*, 14, 235-240.
- Ho, K. T., McKinney, R. A., Kuhn, A., Pelletier, M. C., and Burgess, R. M. (1997) Identification of acute toxicants in new bedford harbor sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(3), 551-558.

- Ho, K. T., Mitchell, K., Zappala, M., and Burgess, R. M. (1995) Effects of brine addition on effluent toxicity and marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) manipulations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(2), 245-249.
- Hockett, J. R. and Mount, D. R. (1996) Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(10), 1687-1693.
- Hogan, A. C., Stauber, J. L., Pablo, F., Adams, M. S., and Lim, R. P. (2005) The Development of Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Procedures Using the Unicellular Alga *Nitzschia closterium*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 433-443.
- Hoke, R. A., Giesy, J. P., and Kreis Jr, R. G. (1992) Sediment Pore Water Toxicity Identification in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin, Using the Microtox Assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23, 343-354.
- Houtman, C. J., Booij, P., Jover, E., Pascual, D., Swart, K., Vreuls, R., Legler, J., Brouwer, A., and Lamoree, M. H. (2006) Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses. *Chemosphere*, 65, 2244-2252.
- Hunt, J. W., Anderson, B. S., Phillips, B. M., Tjeerdema, R. S., Largay, B., Beretti, M., and Bern, A. (2008) Use of toxicity identification evaluations to determine the pesticide mitigation effectiveness of on-farm vegetated treatment systems. *Environmental Pollution*, 156, 348-358.
- Hutchings, M. J., Johnson, I., Hayes, E., Girling, A. E., and Thain, J. (2004) Toxicity Reduction Evaluation, Toxicity Identification Evaluation and Toxicity Tracking in Direct Toxicity Assessment. *Ecotoxicology*, 13, 475-484.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., and Parrella, A. (2003) Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. *Chemosphere*, 52, 85-94.

- Jin, H., Yang, X., Yin, D., and Yu, H. (1999) A case study on identifying the toxicant in effluent discharged from a chemical plant. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12), 122-125.
- Jo, H., Park, E., Cho, K., Kim, E., and Jung, J. (2008) Toxicity identification and reduction of wastewaters from a pigment manufacturing factory. *Chemosphere*, 70, 949-957.
- Jop, K. M. and Askew, A. M. (1994) Toxicity Identification Evaluation Using a Short-Term Chronic Test with *Ceriodaphnia dubia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 91-97.
- Karuppiah, M. and Gupta, G. (1996) Impact of Point and Nonpoint Source Pollution on Pore Waters of Two Chesapeake Bay Tributaries. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 81-85.
- Kay, D., Newsted, J., Benkinney, M., Iannuzzi, T., and Giesy, J. (2008) Passaic river sediment interstitial water phase I toxicity identification evaluation. *Chemosphere*, 70(10), 1737-1747.
- Kayhanian, M., Stransky, C., Bay, S., Lau, S. L., and Stenstrom, M. K. (2008) Toxicity of urban highway runoff with respect to storm duration. *The Science of Total Environment*, 389, 386-406.
- Kim, E., Jun, Y., Jo, H., Shim, S., and Jung, J. (2008) Toxicity identification in metal plating effluent: Implications in establishing effluent discharge limits using bioassays in Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 637-644.
- Kosian, P. A., Makynen, E. A., Monson, P. D., Mount, D. R., Spacie, A., Mekenyan, O. G., and Ankley, G. T. (1998) Application of toxicity-based fractionation techniques and structure–activity relationship models for the identification of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment pore water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(6), 1021-1033.
- Kosian, P. A., West, C. W., Pasha, M. S., Cox, J. S., Mount, D. R., Huggett, R. J., and Ankley, G. T. (1999) Use of nonpolar resin for reduction of fluoranthene bioavailability in sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(2), 201-206.

- Kwok, C., Hsieh, H., and Wong, K. (2005) Toxicity identification evaluation (TIE) of pore water of contaminated marine sediments collected from Hong Kong waters. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 1085-1091.
- Lebo, J. A., Huckins, J. N., Petty, J. D., and Ho, K. T. (1999) Removal of organic contaminant toxicity from sediments-early work toward development of a Toxicity Identification Evaluation (TIE) method. *Chemosphere*, 39(3), 389-406.
- Lebo, J. A., Huckins, J. N., Petty, J. D., Ho, K. T., and Stern, A. (2000) Selective removal of organic contaminants from sediments: a methodology for toxicity identification evaluations (TIEs). *Chemosphere*, 40, 811-819.
- Lukasewycz, M. T. and Durhan, E. J. (1992) Review Strategies for the identification of non-polar toxicants in aqueous environmental samples using toxicity-based fractionation and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 580, 215-228.
- Mount, D. R. and Hockett, J. R. (2000) Use of toxicity identification evaluation methods to characterize, identify, and confirm hexavalent chromium toxicity in an industrial effluent. *Water Research*, 34(4), 1379-1385.
- Muñoz, M. J., Castaño, A., Blazquez, T., Vega, M., Carbonell, G., Ortiz, J. A., Carballo, M., and Tarazona, J. V. (1994) Toxicity identification evaluations for the investigation of fish kills: a case study. *Chemosphere*, 29(1), 55-61.
- Neculita, C. M., Vigneault, B., and Zagury, G. J. (2008) Toxicity and metal speciation in acid mine drainage treated by passive bioreactors. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(8).
- Norberg-King, T. J., Durhan, E. J., and Ankley, G. T. (1991) Application of Toxicity Identification Evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa Basin Drain, California. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 891-900.
- Onikura, N., Kishi, K., Nakamura, A., and Takeuchi, S. (2008) A screening method for toxicity identification evaluation on an industrial effluent using chelex -100 resin and chelators for specific metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(2), 266-271.

- Pessala, P., Schultz, E., Nakari, T., Joutti, A., and Herve, S. (2004) Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 263-272.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez De Alda, M. J., and Barceló, D. (2004) Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 549-562.
- Phillips, B. M., Anderson, B. S., Hunt, J. W., Clark, S. L., and Voorhees, J. P. (2009) Evaluation of phase II toxicity identification evaluation methods for freshwater whole sediment and interstitial water. *Chemosphere*, 74, 648-653.
- Phillips, B. M., Anderson, B. S., Hunt, J. W., Huntley, S. A., Tjeerdema, R. S., Kapellas, N., and Worcester, K. (2006) Solid-phase sediment toxicity identification evaluation in an agricultural stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(6), 1671-1676.
- Phillips, B. M., Anderson, B. S., Hunt, J. W., Thompson, B., Lowe, S., Hoenicke, R., and Tjeerdema, R. S. (2003) Causes of Sediment Toxicity to *Mytilus galloprovincialis* in San Francisco Bay, California. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 492- 497.
- Picone, M., Bergamin, M., Volpato, E., Delaney, E., Turetta, C., Ranaldo, M., Capodaglio, G., and Nasci, C. (2009) Sequential toxicity identification evaluation (TIE) for characterizing toxicity of Venice Lagoon sediments: Comparison of two different approaches. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 538-545.
- Powell, R. L., Moser, E. M., Kimerle, R. A., Mckenzie, D. E., and Mckee, M. (1996) Use of a Miniaturized Test System for Determining Acute Toxicity of Toxicity Identification Evaluation Fractions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 1-6.
- Reineke, N., Bester, K., Jastor, B., and Weigel, S. (2002) Bioassay-directed chemical analysis of River Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*, 47, 717-723.

- Riveles, K. and Gersberg, R. M. (1999) Toxicity Identification Evaluation of Wet and Dry Weather Runoff from the Tijuana River. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 625-632.
- Rotteveel, S. G. and Den Besten, P. J. (2002) Differentiating Metal from Ammonia Toxicity in Toxicity Identification Evaluations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69, 576 -585.
- Schlenk, D. (2008) Are steroids really the cause for sh feminization? A mini-review of in vitro and in vivo guided TIEs. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 250-254.
- Schubauer-Berigan, M. K. and Ankley, G. T. (1991) The contribution of ammonia, metals and nonpolar organics compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an Illinois River tributary. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 925-939.
- Schubauer-Berigan, M. K., Amato, J. R., Ankley, G. T., Baker, S. E., Burkhard, L. P., Dierkes, J. R., Jenson, J. J., Lukasewycz, M. T., and Norberg-King, T. J. (1993) The Behavior and Identification of Toxic Metals in Complex Mixtures: Examples from Effluent and Sediment Pore Water Toxicity Identification Evaluations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 298-306.
- Shaughnessy, K. S., Belknap, A. M., Hewitt, L. M., Dubé, M. G., and Maclatchy, D. L. (2007) Effects of kraft pulp mill condensates on plasma testosterone levels in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 140-148.
- Sheenan, P. J., Warmerdam, J. M., Ogle, S., Humphrey, D. N., and Patenaude, S. M. (2006) Evaluating the risk to aquatic ecosystems posed by leachate from tire shred fill in roads using toxicity tests, Toxicity Identification Evaluations, and groundwater modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(2), 400-411.
- Stronkhorst, J., Schot, M. E., Dubbeldam, M. C., and Ho, K. T. (2003) A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 56-64.

- Suzuki, G., Takigami, H., Nose, K., Takahashi, S., and Sakai, S. (2006) Dioxin-like compounds in house and office dusts: estimation of average daily dose and toxicity identification evaluation. *Organohalogen Compounds*, 68, 177-180.
- Svenson, A., Sandén, B., Dalhammar, G., Remberger, M., and Kaj, L. (2000) Toxicity Identification and Evaluation of Nitrification Inhibitors in Wastewaters. *Environmental Toxicology*, 15, 527-532.
- Thomas, K. V., Balaam, J., Barnard, N., Dyer, R., Jones, C., Lavender, J., and Mchugh, M. (2002) Characterisation of potentially genotoxic compounds in sediments collected from United Kingdom estuaries. *Chemosphere*, 49, 247-258.
- Thomas, K. V., Barnard, N., Collins, K., and Eggleton, J. (2003) Toxicity characterisation of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. *Chemosphere*, 53, 1105-1111.
- Thomas, K. V., Benstead, R., Thain, J., and Waldock, M. (1999) Toxicity characterization of organic contaminants in industrialized UK estuaries and coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 38(10), 925-932.
- Thomas, K. V., Hurst, M. R., Matthiessen, P., Sheahan, D., and Williams, R. (2001) Toxicity characterisation of organic contaminants in stormwaters from an agricultural headwater stream. *Water Research*, 35(10), 2411-2416.
- Tietge, J. E., Russell, J., Hockett, J. R., and Evans, J. M. (1997) Major ion toxicity of six produced waters to three freshwater species: application of ion toxicity models and tie procedures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(10), 2002-2008.
- Van Sprang, P. A. and Janssen, C. R. (1997) Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated sediments using a modified toxicity identification evaluation approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(12), 2501-2507.
- Van Sprang, P. A., Janssen, C. R., Sabayasachi, M., Benijts, F., and Persoone, G. (1996) Assessment of ammonia toxicity in contaminated sediments of the Upper Scheldt (Belgium): the development and application of Toxicity Identification Evaluation procedures. *Chemosphere*, 33(10), 1967-1974.

- Walsh, G. E. and Garnas, R. L. (1983) Determination of Bioactivity of Chemical Fractions. *Environmental Science & Technology*, 17(3), 180-182.
- Ward, M. L., Bitton, G., Townsend, T., and Booth, M. (2002) Determining Toxicity of Leachates from Florida Municipal Solid Waste Landfills Using a Battery-of-Tests Approach. *Environmental Toxicology*, 17, 258-266.
- Wells, M. J., Rossano Jr., A. J., and Roberts, E. C. (1994) Textile Wastewater Effluent Toxicity Identification Evaluation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27, 555-560.
- Wenholz, M. and Crunkilton, R. A. (1995) Use of Toxicity Identification Evaluation Procedures in the Assessment of Sediment Pore Water Toxicity from an Urban Stormwater Retention Pond in Madison, Wisconsin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 676-682.
- Wernersson, S. and Dave, G. (1997) Phototoxicity Identification by Solid Phase Extraction and Photoinduced Toxicity to *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32, 268-273.
- Weston, D. P. and Lydy, M. J. (2010) Focused toxicity identification evaluations to rapidly identify the cause of toxicity in environmental samples. *Chemosphere*, 78, 368-374.
- Weston, D. P., You, J., Hardwood, A. D., and Lydy, M. J. (2008) Whole sediment toxicity identification evaluations tools for pyrethroid insecticides: III. Temperature manipulation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1), 173-180.
- Weston, D. P., Zhang, M., and Lydy, M. J. (2007) Identifying the cause and source of sediment toxicity in an agriculture-influenced creek. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(4).
- Wheelock, C. E., Miller, J. L., Gee, S. J., Shan, G., and Hammock, B. D. (2004) Development of toxicity identification evaluation procedures for pyrethroid detection using esterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(11), 2699-2708.

- Wheelock, C. E., Miller, J. L., Miller, M. J., Phillips, B. M., Huntley, S. A., Gee, S. J., Tjeerdema, R. S., and Hammock, B. D. (2006) Use of carboxylesterase activity to remove pyrethroid-associated toxicity to ceriodaphnia dubia and hyalella azteca in toxicity identification evaluations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(4), 973-984.
- Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., and Hammock, B. D. (2008) " Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs)" in Whitacre, D. , *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, 117-178.
- Wik, A. and Dave, G. (2006) Acute toxicity of leachates of tire wear material to *Daphnia magna*—Variability and toxic components. *Chemosphere*, 64, 1777-1784.
- Yang, L., Yu, H., Yin, D., and Jin, H. (1999) Application of the simplified Toxicity Identification Evaluation procedures to a chemical works effluent. *Chemosphere*, 38(15), 3571-3577.
- Yi, X., Kim, E., Jo, H., Schlenk, D., and Jung, J. (2009) A toxicity monitoring study on identification and reduction of toxicants from a wastewater treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1919-1924.
- Yu, H., Cheng, J., Cui, Y., Shang, H., Ding, Z., and Jin, H. (2004) Application of toxicity identification evaluation procedures on wastewaters and sludge from a municipal sewage treatment works with industrial inputs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 426-430.
- Yu, H., Shang, H., Xu, T., Cui, Y., Yang, L., Jin, H., and Wang, L. (2003) Application of toxicity identification evaluation procedures to an effluent from a nitrogenous fertilizer plant in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 223-226.

ANEXO B

REGISTRO DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA AS AMOSTRAS DE ÁGUA DO
MÊS DE JULHO

Organismo-teste: <i>C.dubia</i>			Julho de 2008										
Pontos	Número de organismos		Sobrevivência (%)	Neonatos		pH		OD (mg L)		Condutividade (uS cm)		Dureza (mg L)	
	I	F		total	média	I	F	I	F	I	F	I	F
C.L.	10	10	100	120	12	7,4	7,81	7,39	7,52	156,2	173,3	42	44
Ref.	9	8	88,8	84	9,3	6,01	7,3	7,28	7,53	26,1	34,2	10	12
P2	9	8	88,8	59	6,5	6,32	7,16	7,72	7,67	15,4	19,3	8	8
P22	10	10	100	82	8,2	6,33	7,21	7,84	7,63	21	25,5	8	9
P24	9	9	100	90	9	6,38	7,19	7,93	7,61	28,3	33,4	12	13

REGISTRO DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA AS AMOSTRAS DE ÁGUA DO
MÊS DE NOVEMBRO

Organismo-teste: <i>C.dubia</i>			Novembro de 2008										
Pontos	Número de organismos		Sobrevivência (%)	Neonatos		pH		OD (mg L)		Condutividade (uS cm)		Dureza (mg L)	
	I	F		total	média	I	F	I	F	I	F	I	F
C.L.	10	10	100	75	7,5	7,38	7,67	7,32	7,67	157,6	171,8	40	44
P2	10	7	70	47	4,7	6,47	7,63	8,24	7,63	18,3	19,4	10	10
P22	10	7	70	28	2,8	6,36	7,28	8,9	7,66	21,6	23,2	8	8
P24	10	10	100	61	6,1	6,13	7,26	8,94	7,66	22,7	26,4	10	6

REGISTRO DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA AS AMOSTRAS DE SEDIMENTO
DO MÊS DE NOVEMBRO

Organismo-teste: <i>C.dubia</i>			Novembro de 2008										
Pontos	Número de organismos		Sobrevivência (%)	Neonatos		pH		OD (mg L)		Condutividade (uS cm)		Dureza (mg L)	
	I	F		total	média	I	F	I	F	I	F	I	F
C.L.	10	10	100	71	7,1	7,31	7,77	7,59	7,42	170,1	167,6	40	46
P2	10	10	100	77	7,7	7,09	7,22	7,51	7,41	118,9	124,8	20	12
P22	10	3	30	51	5,1	6,39	6,36	7,49	7,4	101	106,1	20	14
P24	10	7	70	75	7,5	7,01	7,08	7,43	7,35	122,7	124,5	14	20

ANEXO C

ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DA ÁGUA PELO
PROGRAMA TOXTAT 3.4 – CAMPANHA DE JULHO

```

Bom Repouso Julho 2008 Agua |
File: bpjul08      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
-----
EXPECTED      3.149      11.374      17.954      11.374      3.149
OBSERVED      6          3          25         12          1
-----
Calculated Chi-square goodness of fit test statistic = 13.0127
Table Chi-square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min var) = 22.90
Closest, conservative, Table H statistic = 13.2 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 5, df (# reps-1) = 8
Actual values ==> R (# groups) = 5, df (# avg reps-1) = 8.40
                    (average df used)
-----
Data FAIL homogeneity test. Try another transformation.

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT - Ho:Control<Treatment
-----
GROUP      IDENTIFICATION      TRANSFORMED      RANK      CRIT.      REPS      SIG
MEAN      SUM      VALUE
-----
1          Control1          12.300          -----
2          Control 2          9.333          68.50      62.00      9
3          P2          6.556          54.00      62.00      9      *
4          P22          8.200          65.00      75.00      10      *
5          P24          10.000          65.50      62.00      9
-----
critical values use k = 4, are 1 tailed, and alpha = 0.05

```


ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DA ÁGUA PELO
PROGRAMA TOXTAT 3.4 – CAMPANHA DE NOVEMBRO

Nascentes Bom Repouso Agua Novembro
File: bpnovw Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	2.680	9.680	15.280	9.680	2.680
OBSERVED	1	13	13	12	1

Calculated Chi-square goodness of fit test statistic = 4.1412
Table Chi-square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

Hartley's test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max var/min var) = 8.76
Closest, conservative, Table H statistic = 9.9 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 4, df (# reps-1) = 9
Actual values ==> R (# groups) = 4, df (# avg reps-1) = 9.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	120.875	40.292	4.489
within (Error)	36	323.100	8.975	
Total	39	443.975		

Critical F value = 2.92 (0.05,3,30)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	Control	7.500	7.500		
2	P2	4.700	4.700	2.090	
3	P22	2.800	2.800	3.508	*
4	P24	6.100	6.100	1.045	

Dunnnett table value = 2.15 (1 Tailed value, P=0.05, df=30,3)

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	Control	10			
2	P2	10	2.881	38.4	2.800
3	P22	10	2.881	38.4	4.700
4	P24	10	2.881	38.4	1.400

ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS DE TOXICIDADE CRÔNICA DO SEDIMENTO PELO
PROGRAMA TOXTAT 3.4 – CAMPANHA DE NOVEMBRO

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	0	10	10
P2	0	10	10
TOTAL	0	20	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,0) (p=0.05) IS LESS THAN 0. b VALUE IS 0.
NO SIGNIFICANT DIFFERENCE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	DEAD	ALIVE	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
P22	3	7	10
TOTAL	13	7	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 3.
Since b is less than or equal to 6 there is a significant difference
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	DEAD	ALIVE	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
P22	3	7	10
TOTAL	13	7	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 3.
Since b is less than or equal to 6 there is a significant difference
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	DEAD	ALIVE	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
P24	7	3	10
TOTAL	17	3	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 7.
Since b is greater than 6 there is no significant difference
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS				
GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG (P=, 05)
1	CONTROL	10	10	
2	P2	10	10	
2	P22	10	3	*
3	P24	10	7	

ANEXO D

PARÂMETROS INICIAIS DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA AS AMOSTRAS DE
ÁGUA – AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE TOXICIDADE

Tratamentos	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻²)	Dureza (mg L ⁻¹)
Controle	7,61	8,81	171,8	42
Branco SPE	7,53	8,77	172,7	44
Branco Filtração	7,60	8,63	179,3	42
Branco Aeração	7,61	8,66	181,2	42
Branco Ajuste pH 3	7,49	8,79	384	44
Branco Ajuste pH 11	7,67	8,92	501	46
Branco Graduação pH 6	7,35	8,71	198	46
Branco Graduação pH 9	7,75	8,81	227	44
Branco EDTA 3 mg L ⁻¹	7,67	8,64	172,9	40
Branco EDTA 8 mg L ⁻¹	7,62	8,84	169,9	38
Branco Tiosulfato 10 mg L ⁻¹	7,68	8,48	181	42
Branco Tiosulfato 25 mg L ⁻¹	7,7	7,96	180,3	42
P22 Teste Base	6,01	8,51	25,7	10
SPE	7,32	7,98	27,9	12
Filtração	7,3	8,45	28,9	8
Aeração	7,2	8,48	25,4	6
Ajuste pH 3	7,11	8,5	209	8
Ajuste pH 11	7,34	8,77	341	10
Graduação pH 7	7,53	8,75	57,4	12
Graduação pH 9	7,63	8,46	80,3	8
EDTA 3 mg L ⁻¹	7,15	8,73	29,3	6
EDTA 8 mg L ⁻¹	7,12	8,91	33,7	8
Tiosulfato 10 mg L ⁻¹	7,19	8,39	25,6	10
Tiosulfato 25 mg L ⁻¹	7,09	7,98	25,6	8

PARÂMETROS INICIAIS DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA PARA AS AMOSTRAS DE
ÁGUA – AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE TOXICIDADE

Tratamentos	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (mS cm ⁻²)	Dureza (mg L ⁻¹)
Controle	7,77	7,56	177,0	
Branco SPE	7,84	7,35	198,7	
Branco Aeração	7,86	7,37	187,7	
Branco Ajuste pH 3	7,69	7,28	423,0	
Branco Ajuste pH 11	8,11	7,28	539,0	
Branco Graduação pH 6	7,55	7,31	245,0	
Branco Graduação pH 9	7,96	7,26	208,0	
Branco EDTA 3 mg L ⁻¹	7,77	7,39	177,5	
Branco EDTA 8 mg L ⁻¹	7,79	7,19	182,1	
Branco Tiosulfato 10 mg L ⁻¹	7,75	7,00	198,1	
Branco Tiosulfato 25 mg L ⁻¹	7,70	7,35	201,0	
P22 Teste Base	6,48	7,37	123,0	
SPE	6,92	7,21	122,0	
Aeração	6,58	7,23	107,7	
Ajuste pH 3	6,55	7,57	286,0	
Ajuste pH 11	7,25	7,46	541,0	
Graduação pH 7	7,18	7,47	135,0	
Graduação pH 9	7,86	7,40	118,3	
EDTA 3 mg L ⁻¹	6,43	7,05	111,5	
EDTA 8 mg L ⁻¹	6,39	7,32	113,2	
Tiosulfato 10 mg L ⁻¹	6,12	7,26	123,4	
Tiosulfato 25 mg L ⁻¹	5,38	7,05	148,6	